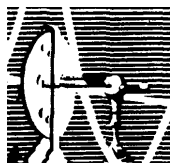


João Hermínio Martins da Silva

Análise estrutural da integrina $\alpha4\beta1$ e ligantes
específicos: estudo por modelagem molecular

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

João Hermínio Martins da Silva

Análise estrutural da integrina $\alpha4\beta1$ e ligantes
específicos: estudo por modelagem molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biofísica.

Orientadores:

Wilson Savino

Ernesto Raúl Caffarena

Rio de Janeiro
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, João Hermínio Martins da

Análise estrutural da integrina $\alpha4\beta1$ e ligantes específicos: estudo por modelagem molecular / João Hermínio Martins da Silva

Rio de Janeiro, 2006.

viii, 126 f

Dissertação (Mestrado em Biofísica)

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto De Biofísica Carlos Chagas Filho, 2006.

Orientadores: Wilson Savino e Ernesto Raúl Caffarena

1. Integrinas. 2. Estrutura De Proteínas. 3. Modelagem Molecular

Teses.

I.Savino, Wilson (Orient.). II.Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

III. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Modelagem Molecular do Programa de Computação Científica – PROCC, da Fundação Oswaldo Cruz, sob orientação dos Drs. Ernesto Raúl Caffarena e Wilson Savino, tendo recebido apoio das seguintes instituições de fomento: CAPES, CNPq, FIOCRUZ – IOC/PROCC.

Agradecimentos

Primeiro a Deus, por ter feito as coisas acontecerem.

À minha mãe, por ter agüentado firme pra ver esse trabalho pronto. Ao Antonio, neném, que suportou todas as minhas explosões e caprichos sem vacilar.

Ao Ernesto, que muito mais que um orientador, ou pai, como constantemente ele se coloca, foi um irmãozão. Valeu mesmo por todo o tempo investido em mim, pacientemente me dando toques bem “sutis” ☺. Os cafés no Odeon ajudaram a consolidar a amizade ☺.

Ao Savino, por ter acreditado nesse trabalho e fornecido as condições para que acontecesse, inclusive nossa colaboração em La Plata.

Ao coordenador da Pós Graduação do IBCCF, Pedro Pascutti, pelos conselhos e toda a ajuda. À secretária de Pós-graduação do Instituto de Biofísica, Sandra, que facilitou bastante o meu intercâmbio entre a FIOCRUZ e a UFRJ. A todos os professores, que contribuíram de alguma maneira durante as disciplinas.

À Shaila Rossle, que me ajudou a desvendar o Modeller e ao Laurent, pelo Dockthor.

Dois agradecimentos em especial vão pra Suellen, ou melhor, Sueli e pra Ana, secretárias eficientíssimas do LPT e do PROCC.

Ao Franklin, meu irmão de convívio no PROCC. Tem certeza que quer entrar nessa vida???

A toda a galera do LPT, “old and new generation”: Déa, mãezona!, Zanja, fé!!! Klayssa, marida!; Eugênia, Caio, Leandra, Pretinha, Fefê, Juju, Paulinha, Wallace, Suse, Tininha, Marco, Luiz Ricardo, Désio, Ingo, Daniella. À galera egressa do LPT: Patty; Luiz; Priscila Olsen, pelos altos papos durante os transplantes no biotério; Sandra Neves, minha dindona; The!!! A minha primeira chefinha no LPT; Kenji, Anael.

À toda a galera mais nova do LPT que não tenho nem como listar os nomes... Tem uma nova safra chegando pra renovar geral!!!

Índice Analítico

Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	8
Lista de abreviaturas	9
Lista de figuras	10
Lista de tabelas	14
1 – Introdução	15
1.1 - Receptores de matriz extracelular: integrinas	17
1.2 – Biologia estrutural de integrinas	24
1.3 - Integrinas e Fármacos	27
1.4 - Integrinas e Inflamação	32
2 – Objetivos	35
3 – Metodologia	37
3.1 - Desenho racional de fármacos baseado na estrutura do receptor	38
3.2 - Modelagem comparativa	39
3.3 - Campos de força	45
3.4 - <i>Docking</i> Molecular	46
3.4.1 - Algoritmos de <i>Docking</i>	48
3.5 – Anelamento Simulado Generalizado (GSA)	49
3.6 - Minimização de Energia	51
3.6.1 – Método de Máximo Declive	52
3.7 - Simulações computacionais de movimentos moleculares	53
3.8 - Dinâmica molecular	54
3.8.1 - Simulações de dinâmica molecular em biologia	54
3.8.2 - Algoritmo <i>Leap Frog</i>	56
3.9 - Cálculos de Energia Livre	57
4 – Resultados	61
4.1 - Modelagem Comparativa	62
4.1.1 - Construção do modelo	62
4.1.2 - Validação do modelo	71
4.2 - <i>Docking</i> Molecular	79
4.2.1 - Procedimentos	79
4.3 – Ligantes Peptídicos	81
4.3.1 - CQIDSPC	81
4.3.2 - RGDf[Me]V	82
4.3.3 - ILE-LEU-ASP-VAL	88
4.4 – Ligantes Peptídeo Miméticos	89
4.4.1 - 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-LDV (PUPA)	89
4.4.2 - Ligantes da família 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-R (PUPA)	91
4.5 - Ligante Pupa-IDS	101
5 - Discussão	105
6 – Conclusões	110
7 - Perspectivas	113
8 – Referências Bibliográficas	115

Resumo

A integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) é um alvo terapêutico em potencial devido ao seu envolvimento em uma variada gama de processos fisiopatológicos, principalmente inflamação e auto-imunidade. Várias estratégias de inibição e bloqueio da ligação do VLA-4 aos seus ligantes naturais, VCAM-1 e fibronectina em particular, já foram propostas, visando à diminuição da migração de células inflamatórias em quantidades excessivas, aos sítios de infecção ou inflamação.

No presente trabalho, analisamos a estrutura do VLA-4 e sua interação com os ligantes citados através de *docking* molecular, e seu comportamento energético através de simulações por dinâmica molecular.

Nossos resultados comprovam a eficácia do modelo construído, no sentido de reproduzir o comportamento fisiológico dessa integrina e respeitando dados experimentais descritos na literatura. As energias mais favoráveis foram obtidas pelo ligante VCAM-1 e pelo composto peptídeo-mimético 4-[N'-(2-metilfenil)ureido]fenilacetil-LDV, mostrando a fidelidade do modelo na reprodutibilidade de alguns dos resultados obtidos em experimentos *in vitro*.

A estrutura tridimensional nos permitiu analisar os resíduos relevantes e os tipos de interação mais freqüentes. Observamos que os compostos da família PUPA mantiveram uma maior estabilidade, indicando que o grupamento adicionado na extremidade N-terminal apresenta interações importantes, que devem ser consideradas no desenho de novos compostos inibidores.

Em outra fase do trabalho, simulamos através de dinâmica molecular a movimentação do complexo receptor-ligante, visando o cálculo da energia livre. Os resultados desse estudo termodinâmico também apontam o PUPA-LDV como melhor ligante, quando comparado aos outros compostos estudados.

Abstract

The $\alpha4\beta1$ integrin (VLA-4) is a potential therapeutic target due to its involvement in a wide variety of physiopathological processes, mainly inflammation and autoimmunity. Several strategies have been proposed for inhibition and blockage of VLA-4 binding to its natural ligands, VCAM-1 and fibronectin specifically, aiming the decrease of inflammatory cells migration to the infection sites in excessive quantities.

In the present work, we analyzed the VLA-4 structure and its interactions with the mentioned ligands through molecular docking strategies, and its energetics through molecular dynamics simulations.

Our results prove the efficiency of the model, whereas it reproduces the physiological behavior of this integrin, respecting the experimental data described in several papers. The most favorable energies were obtained by the VCAM-1 ligand and by the peptide-mimetic compound 4-[N'-(2-metilfenil)ureido]fenilacetil-LDV, demonstrating the accuracy of the model, reproducing a part of the *in vitro* results.

The three-dimensional structure allowed analyzing the relevant residues, and the most frequent interactions. We observed that the PUPA family compounds maintained a better stability, indicating that the chemical group added in the N-terminal extremity shows up important interactions, which must be considered in the design of new inhibitor compounds.

Through molecular dynamics, we simulated the receptor-ligand motions, aiming the free energy calculation. The results of this thermodynamic simulation point the PUPA-LDV as the better ligand, when compared to the other studied compounds.

Lista de abreviaturas

ADMIDAS – Adjacente ao midas
AGL – Algoritmo genético lamarckiano
BLAST – The Basic Local Alignment Search Tool
CD – Cluster of differentiation (grupo de diferenciação)
FAK – Quinase de adesão focal
GA – Algoritmo genético
GROMACS – Groningen machine for chemical simulation
GROMOS –Groningen molecular simulation
GSA – Anelamento simulado generalizado
ICAM – Molécula de adesão intercelular
LAD – Deficiência de adesão leucocitária
LFA – Linfócito associado a antígeno
LIE – Energia de interação linear
LIMBS – Sitio de ligação a metais induzidos por ligante
MEC/ECM – Matriz Extracelular
MIDAS – Sitio de adesão dependente de íons metálicos
MQ/MM – Mecânica quântica/mecânica molecular
PDB – Protein data bank
PUPA – 4-[N'-(2-metilfenil)ureido]fenilacetil
QSAR – Relação quantitativa estrutura-atividade
RMSD – Desvio da raiz média quadrática
SAR – Relação estrutura-atividade
TNF – Fator de necrose tumoral
VCAM – Molécula de adesão celular vascular
VLA – Antígeno de expressão tardia

Lista de figuras

- Figura 1 - Posicionamento dos domínios de interesse para estudos de relação estrutura-função e *docking*. Os outros domínios possuem também aminoácidos que, quando suprimidos ou mutados, podem interferir na ativação e transdução de sinais. Em verde a subunidade alfa, em azul, vermelho, laranja e amarelo a subunidade beta. O domínio I aparece em púrpura. Nesse trabalho, nos concentramos na extremidade da integrina (β propeller e β domínio A). Nesse esquema, as cores auxiliam na identificação dos domínios funcionais. 19
- Figura 2 – Modelo proposto para a ativação das integrinas. Após um estímulo interno (*inside-out*) ou externo (*outside-in*), a extremidade extracelular da integrina se eleva e se afasta da membrana, expondo seu sítio ativo, concomitantemente à separação da região transmembranar. A proteína de citoesqueleto talina é recrutada, ativando FAK, juntamente à fosforilação de Src e ativação de Rho (modificado a partir de Hynes, 2002). 21
- Figura 3 - Estrutura tridimensional da integrina $\alpha v\beta 3$, obtida por difração de raios-x. A) Representação gráfica por estruturas secundárias da cadeia α . B) Representação gráfica da cadeia β (Xiong et al., 2001). O código PDB dessa estrutura é 1L5G. 23
- Figura 4 – Administração do medicamento Natalizumab. O número de pacientes afetados foi reduzido drasticamente após a utilização do fármaco, comprovando sua eficácia para o tratamento da esclerose múltipla (Miller et al., 2003). O anticorpo foi administrado por via intravenosa a cada 28 dias, durante 6 meses. 26
- Figura 5 – Grupamento 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl, adicionado na extremidade N-terminal da seqüência ILDV, substituindo a isoleucina (Singh et al., 2002). Esse grupamento se liga ao átomo N da leucina. 27
- Figura 6 – Modelo de ativação e formação de cluster. Após algum estímulo, interno ou externo, a integrina se desdobra, expondo o sítio de ligação e se mantém em um estado de maior afinidade. Paralelamente, os domínios transmembranares de ambas as subunidades se separam. Nesse estágio, o heterodímero é chamado de complexo focal. Posteriormente, ocorre o deslocamento lateral e agrupamento de outras integrinas na membrana celular, formando as placas de adesão focal, modificado a partir de Qin, Vinogradova *et al.*, 2004. 31
- Figura 7 - Limites teóricos da técnica de modelagem comparativa utilizando o tamanho do alinhamento em relação à identidade calculada entre seqüências (Sander and Schneider, 1991). 38
- Figura 8 - Etapas que compõem a metodologia de modelagem comparativa (Marti

- Figura 12 – Alinhamento entre as seqüências correspondentes ao sitio de ligação das subunidades $\alpha 4$ e αV . Os resíduos ressaltados em vermelho assinalam identidade e os amarelos similaridade. 63
- Figura 13 – Alinhamento entre as seqüências correspondentes ao sitio de ligação das subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$. Os resíduos ressaltados em vermelho assinalam identidade e os amarelos similaridade. 64
- Figura 14 – A) Destaque do alinhamento da região MIDAS, mostrando que não há alterações entre as duas seqüências. B) Região que circunda o íon Mg^{2+} com os aminoácidos D150, L151, S152, Y153, S154, E249, D279, envolvidos em sua coordenação. 67
- Figura 15 - Detalhe do entorno dos íons Mg^{2+} presentes no sitio de ligação. A) Primeiro íon, coordenado pelo motivo LIMBS, que parece ter o seu entorno já comprometido com outros aminoácidos que o coordenam: OE1 e OE2 – GLU169, OE1 e OE2 - GLU249, NE2 - HIS283, O - PRO248. B) Entorno do íon coordenado pelo motivo MIDAS, descrito na literatura como o íon participante da interação com os ligantes. C) Íon coordenado pelo motivo ADMIDAS. 68
- Figura 16 Modelo do VLA-4. A) Visão do heterodímero a partir da subunidade α . B) Visão do heterodímero a partir da subunidade β . Figura C) Visão lateral, no sentido do dobramento, mostrando o contato próximo entre os monômeros. Figura D) Visão superior. Em verde a subunidade alfa e em ciano a subunidade beta. Em amarelo aparecem destacados os íons Mg^{+2} 69
- Figura 17 - Gráficos de Ramachandran correspondentes às estruturas completas das cadeias αV (A) e $\beta 3$ (B) usadas como molde. A maior parte dos resíduos de ambas as unidades se encontra em regiões permitidas (717 e 445), enquanto poucos se encontram em regiões menos favoráveis (35 e 30), respectivamente para a unidade α e β e nenhum resíduo se encontra em regiões não permitidas. 71
- Figura 18 - Gráficos de Ramachandran correspondentes às estruturas completas das cadeias $\alpha 4$ (A) e $\beta 1$ (B) geradas. A maior parte dos resíduos de ambas as unidades se encontra em regiões permitidas (739 e 571), enquanto poucos se encontram em regiões menos favoráveis (29 e 35) e poucos resíduos (11 e 10) se encontram em regiões não permitidas respectivamente para a unidade α e β . 72
- Figura 19 - Gráficos de Ramachandran correspondentes às estruturas do sitio de ligação das cadeias $\alpha 4$ (A) e $\beta 1$ (B) geradas. A maior parte dos resíduos de ambas as unidades se encontra em regiões permitidas (344 e 201), enquanto poucos se encontram em regiões menos favoráveis (16 e 5) e poucos resíduos (4 e 2) se encontram em regiões não permitidas respectivamente para a unidade α e β . Nenhum dos resíduos localizados em regiões não permitidas é relevante para a interação com os ligantes, estando posicionados em regiões distantes do sitio de encaixe. 73
- Figura 20 – Sobreposição de estruturas para o cálculo do RMSD entre os sítios de ligação do $\alpha V\beta 3$ (vermelho) e $\alpha 4\beta 1$ (verde). O RMSD foi calculado entre o melhor modelo construído após a minimização de energia e as coordenadas do molde utilizado, $\alpha V\beta 3$. O valor encontrado entre as subunidades α é de 0.75Å e entre as subunidades β é 0.57Å, considerando-se somente os $C\alpha$. 75
- Figura 21 - Perfil eletrostático da região de ligação do molde $\alpha V\beta 3$ (A) e do modelo $\alpha 4\beta 1$ (B). Observamos que no perfil do VLA-4 há uma concentração maior de resíduos carregados na fenda formada na interseção entre as subunidades, indicada pelas setas. Posteriormente essa região foi utilizada para o *docking*. Após a minimização de energia o íon coordenado pelo MIDAS se movimentou em direção ao interior da subunidade β e, portanto, não aparece com destaque na figura. 77
- Figura 22 – A) Estrutura obtida por difração de raios-X do segmento do VCAM-1 responsável pela ligação com o VLA-4 (PDB=1VCA). Em destaque, o tripeptídeo responsável pela interação com a integrina. B) Peptídeo cíclico construído a partir da seqüência de reconhecimento às 80

integrinas. Foram mantidos os dois aminoácidos nas extremidades e o primeiro e último foram mutados por cisteínas.

Figura 23 - Estrutura tridimensional do ligante RGDf[Me]V, usado como controle para os experimentos de docking. A estrutura desse pseudo-peptídeo foi obtida experimentalmente, complexado à estrutura da integrina $\alpha v\beta 3$.

81

Figura 24 – Valores de energia potencial para os ligantes RGDF[ME]V e CQIDSPC. As setas indicam as famílias que apresentam soluções aceitas, conforme os critérios adotados. A energia do peptídeo CQIDSPC apresenta valores mais favoráveis e indicam a preferência desse ligante em relação ao RGDf[Me]V.

82

Figura 25 – Valores de energia de interação para os ligantes RGDf[Me]V e CQIDSPC. As setas indicam as famílias que apresentam soluções aceitas, conforme os critérios adotados. A energia do peptídeo CQIDSPC apresenta valores mais favoráveis e indicam a preferência desse ligante em relação ao RGDf[Me]V.

84

Figura 26 - Posicionamento dos ligantes RGDf[ME]V (A,C) e CQIDSPC (B,D) em suas melhores configurações no sítio de ligação. Observa-se o importante papel dos íons intermediando o encaixe dos ligantes. Em ambos, o aspartato do aminoácido ASP se posiciona direcionado para o íon coordenado pelo MIDAS.

85

Figura 27 – Estruturas para o cálculo de energia de interação de ambos os ligantes, considerando a melhor solução aceita dos ligantes CQIDSPC (A) e RGDf[ME]V (B).

85

Figura 28 - Peptídeo linear ILDV: As coordenadas desse peptídeo foram criadas sobrepondo e alinhando essa seqüência ao segmento QIDS existente no VCAM-1. A região da fibronectina responsável pela ligação ao VLA-4, contendo essa seqüência, ainda não está resolvida experimentalmente.

86

Figura 29 - 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-LDV: A isoleucina presente no peptídeo ILDV é substituída pelo grupamento PUPA, potencializando o efeito biológico. Nos experimentos de *docking* esse ligante mostrou os melhores resultados.

89

Figura 30 - Valores de energia potencial obtidos pelo programa Dockthor. As setas indicam as famílias com soluções cujo OD1 ou OD2 do aminoácido ASP se encontram até 4.5Å do íon Mg^{2+} coordenado pelo MIDAS.

90

Figura 31 – Variação de energia de interação calculada para todos os ligantes da série PUPA, conforme a classificação em famílias cujos membros apresentam semelhança estrutural em até 3.5Å. Os números na parte superior de cada gráfico mostram o número de membros em cada família. As setas mostram as famílias que apresentam soluções onde o OD1 do aminoácido ASP se encontra até 4.5Å do íon Mg^{2+} coordenado pelo MIDAS. Nas tabelas abaixo de cada gráfico são apresentadas as interações encontradas entre cada um dos ligantes e o receptor VLA-4. Dentre os ligantes dessa série, o PUPA-LDV apresenta as energias mais favoráveis de interação, assim como um maior número de interações com a proteína.

94

Figura 32 - Valores de energia potencial e de interação obtidos mantendo-se o grupamento PUPA fixo, reproduzindo as mesmas coordenadas do PUPA-LDV nas outras moléculas. O PUPA-LDV mostrou-se como o melhor ligante no docking convencional.

95

Figura 33 - Pupa LDV no sítio de ligação, mostrando somente os resíduos envolvidos na formação de pontes de hidrogênio entre as subunidades alfa e beta e o ligante. Em ciano o ligante e em verde os íons Mg^{2+} .

96

Figura 34 – Energia Livre de Gibbs em Kcal/mol relativa ao ligante PUPA-LDV utilizado como referência. Existe uma tendência de ligação na seguinte seqüência: Pupa3, Pupa7, Pupa2, Pupa9, Pupa6, Pupa11, Pupa4. Os valores mostrados correspondem às médias \pm desvio-padrão dos cálculos realizados.

100

12

Figura 35 – A) Valores de energia de interação entre o para o ligante PUPA-IDS. As setas assinalam famílias que apresentam soluções cujo OD1 ou OD2 do aminoácido ASP se encontra até 4.5Å do íon Mg^{2+} coordenado pelo motivo MIDAS. B) Número de membros em cada uma das famílias, classificados conforme o RMSD, juntamente com a variação de energia

101

Figura 36 – Ligante proposto PUPA-IDS, mostrando seu posicionamento global entre as duas subunidades. Na tabela anterior estão explícitas as ligações feitas entre o ligante e a proteína. A energia desse ligante também se situa em uma faixa comparável com o PUPA-LDV, podendo manter a mesma eficácia na inibição do VLA-4 em ensaios biológicos futuros.

103

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1 – Relação de integrinas e respectivos ligantes naturais.....	16
Tabela 2 – Tipos de movimentos moleculares, grandezas de tempo envolvidas e amplitude de movimentos, com respectivas aplicações.....	51
Tabela 3 – Percentuais de identidade e similaridade entre as seqüências-alvo ($\alpha 4, \beta 1$) e seqüências-molde ($\alpha V, \beta 3$) obtidos usando a matriz BLOSUM62.....	62
Tabela 4 – Percentuais de identidade e similaridade da região correspondente ao sitio de ligação (α -propeller e β A-domain).....	65
Tabela 5 – Energia potencial e energia de interação para os dois ligantes, RGDF[ME]V e CQIDSPC, considerando os menores valores.....	82
Tabela 6 – Valores experimentais de IC50 (μM) para os ligantes da série PUPA utilizados.....	88
Tabela 7 - Energia potencial e de interação dos ligantes da série PUPA.....	95
Tabela 8 – Valores de energia livre de Gibbs em Kcal/mol, calculados após a dinâmica molecular nas esferas.....	99
Tabela 9 – Relação das interações encontradas entre o ligante PUPA-IDS e o VLA-4.....	102

1 – Introdução

As integrinas são glicoproteínas transmembranares do tipo II, que atuam como moléculas de adesão celular e de adesão à matriz extracelular, apresentando um papel relevante em diversos processos fisiopatológicos. A família de integrinas *very late antigen* (VLA) é composta por, pelo menos, 11 membros amplamente distribuídos nos tecidos e que interagem principalmente com proteínas de matriz extracelular.

A integrina $\alpha 4\beta 1$ é expressa em várias células do sangue, incluindo linfócitos, e medeia a ligação ao domínio CS-1 da fibronectina e ainda à molécula VCAM-1. Esse receptor é importante para o desenvolvimento dos linfócitos, recrutamento dos leucócitos, inflamação e outras situações que requerem a adesão celular ao endotélio vascular (Humphries et al., 1995; Madri et al., 1996).

Mediante o tratamento com anticorpos monoclonais contra o VLA-4 ou VCAM-1, foi descrito com clareza o papel central do VLA-4 em modelos animais para doenças inflamatórias crônicas como a doença pulmonar alérgica, o que sugere que essa integrina poderia ser um alvo terapêutico para o tratamento da asma, artrite reumatóide e esclerose múltipla, dentre outras doenças (Curley et al., 1999).

Diante das perspectivas de estudo e compreensão dos mecanismos moleculares de ligação do VLA-4 e dos resultados obtidos utilizando-se metodologias computacionais e teóricas no estudo de sistemas biológicos semelhantes (Feuston et al., 2002; Macchiarulo et al., 2004), propomos a mesma abordagem como alternativa e suporte à elucidação das interações e modos de ligação dessa integrina com compostos bioativos, visando ao auxílio na obtenção de novos inibidores do VLA-4.

Para facilitar a compreensão dos dados descritos na presente dissertação, abordaremos inicialmente uma série de aspectos relativos a essa integrina.

1.1 - Receptores de matriz extracelular: integrinas

A migração dos linfócitos é parcialmente controlada pelos componentes de matriz extracelular (MEC) e seus receptores. O direcionamento dessas células é, em parte, dependente da expressão diferencial desses componentes. Dentre as principais proteínas envolvidas nesse processo, certamente as integrinas representam um papel crucial.

As integrinas são glicoproteínas transmembranares, que atuam como moléculas de adesão celular e de adesão à matriz extracelular, apresentando um papel relevante em diversos processos fisiopatológicos. Dentre as proteínas expressas em metazoários, as integrinas são as mais abundantes e constituem uma das famílias mais estudadas e bem descritas. Cabe destacar que até os mais simples metazoários, como esponjas e cnidários apresentam integrinas (Burke, 1999; Hughes, 2001). Entre os vertebrados desempenham ainda um importante papel na adesão célula-célula. Desde sua descoberta (Hynes, 1987), essa família de proteínas se tornou uma das mais bem conhecidas e estudadas, devido a sua enorme importância como potencial agente terapêutico no tratamento de diversas patologias, como por exemplo a esclerose múltipla, asma, trombose e alguns processos inflamatórios (Buckley and Simmons, 1997).

As integrinas podem servir ainda como receptores para alguns vírus e bactérias (Graham et al., 2005). Algumas, entretanto, são expressas em uma linhagem celular ou um tipo celular específico como, por exemplo, as integrinas da família $\beta 2$, que são expressas essencialmente em células hematopoiéticas e a integrina $\alpha E\beta 7$, que é expressa primariamente por linfócitos T em tecidos de mucosa (Kilshaw, 1999).

Tabela 1 – Relação de integrinas e respectivos ligantes naturais.

Integrina	Ligante
α L* β 2	ICAM
α M* β 2	Fibrinogênio, ICAM, iC3B
α X* β 2	Fibrinogênio, iC3B
α D* β 2	VCAM, ICAM
α E* β 7	E-caderina
α 1* β 1 (VLA1)	Colágeno, Laminina
α 2* β 1 (VLA2)	Colágeno, Laminina
α 3 β 1 (VLA3)	Laminina, Fibronectina, Trombospondina
α 4 β 1 (VLA4)	Fibronectina (CS-1), VCAM-1
α 4 β 7	Fibronectina, VCAM, MAdCAM
α 5 β 1 (VLA5)	Fibronectina
α 6 β 1 (VLA6)	Laminina
α 6 β 4	Laminina
α 7 β 1	Laminina
α 8 β 1	Fibronectina, Tenascina
α 9 β 1	Tenascina
α 10* β 1	Colágeno
α 11* β 1	Colágeno
α IIb β 3	Colágeno, Fibronectina, Vitronectina, Fibrinogênio, Fator de Von Willebrand, trombospondina
α V β 1	Fibronectina, Vitronectina
α V β 3	Fibronectina, Vitronectina, Fibrinogênio, Fator de Von Willebrand, trombospondina
α V β 5	Vitronectina
α V β 6	Fibronectina, Tenascina
α V β 8	Colágeno, Laminina, Fibronectina

* Apresentam domínio I. Modificado a partir de Curley, Blum et al., 1999; Van Der Flier e Sonnenberg, 2001.

A família de integrinas VLA (very late antigen) é composta por, pelo menos, 11 membros amplamente distribuídos nos tecidos e que interagem principalmente com proteínas de matriz extracelular.

Sua estrutura quaternária é composta por duas subunidades, chamadas α e β , associadas não covalentemente. Já foram descobertas 8 subunidades β e 18 subunidades α , porém até o momento, somente 24 combinações estão descritas (Tabela 1) (Arnaout, 2002; Humphries et al., 2000; Hynes, 1992).

A tabela 1 mostra uma série de integrinas cujos ligantes naturais já foram identificados. A fração mais importante de ambas as subunidades é extracelular, com aproximadamente 1000 aminoácidos (subunidade α) e 750 aminoácidos (subunidade β), enquanto a fração citoplasmática apresenta aproximadamente 20 (subunidade α) e 50 aminoácidos (subunidade β). O comprimento do heterodímero é de aproximadamente 24 nm. A subunidade $\beta 4$ é uma exceção, com um domínio intracelular de aproximadamente 1072 aminoácidos.

O domínio N-terminal das subunidades α e β associam-se para formar a cabeça da integrina, a qual contém o sítio de ligação, enquanto o segmento C-terminal atravessa a membrana plasmática e interage com o citoesqueleto e com proteínas de sinalização (Giancotti and Ruoslahti, 1999). A cauda citoplasmática da integrina é geralmente curta, exceto em $\beta 4$, e sempre tem características enzimáticas. Portanto, a transdução de sinais por integrinas ocorre através da associação com proteínas adaptadoras que conectam a integrina ao citoesqueleto, às quinases citoplasmáticas e aos receptores transmembranares de fatores de crescimento. A sinalização pela integrina e a associação com o citoesqueleto estão intimamente ligadas (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Assim sendo, a mediação da adesão celular e a migração são as funções primárias da integrina, enquanto a expressão gênica e a proliferação celular são duas outras importantes conseqüências da sinalização desses receptores (Byzova et al., 2000).

A expressão de vários membros da subfamília $\beta 1$ integrina nos linfócitos T medeia a ligação a componentes de MEC como o colágeno e a fibronectina (Hemler, 1990). A interação entre as integrinas e os componentes de MEC pode iniciar cascatas de fosforilação intracelulares que resultam em crescimento celular, sobrevivência e migração, de modo que as células T são capazes de modular seu fenótipo adesivo através da sinalização externa, isto é, pelo controle da expressão de integrinas na superfície celular e de sua adesividade (Diamond and Springer, 1994).

A integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4; CD49d/CD29) é expressa em várias células do sangue, incluindo linfócitos, e medeia a ligação ao domínio CS-1 da fibronectina e ainda à molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) (Fong et al., 1997; Makarem et al., 1994). Esse receptor é importante para o desenvolvimento dos linfócitos, no recrutamento dos leucócitos, na inflamação e em outras situações que requerem a adesão celular ao endotélio vascular (Chigaev et al., 2003).

Um estudo com culturas de células hematopoéticas totipotentes mostra que estas células migram através da lâmina basal na medula óssea através de interações entre as integrinas VLA-4 e VLA-5 com a fibronectina (Giet et al., 2002).

O complexo do citoesqueleto e das proteínas de sinalização associados nos sítios de adesão entre integrina e MEC guiam e organizam a cascata de sinalização. Entretanto, o verdadeiro trabalho dessas associações e como os sinais são transmitidos e modulados ainda é pouco entendido (Schwartz, 2001). Tem sido proposto que a mudança de avidéz (aumento da afinidade funcional) pode estar relacionada a mudanças no número de moléculas de interação, mudanças na topografia da molécula (por exemplo a formação de placas de adesão focal) ou mudanças na afinidade das ligações individuais (Chigaev et al., 2003).

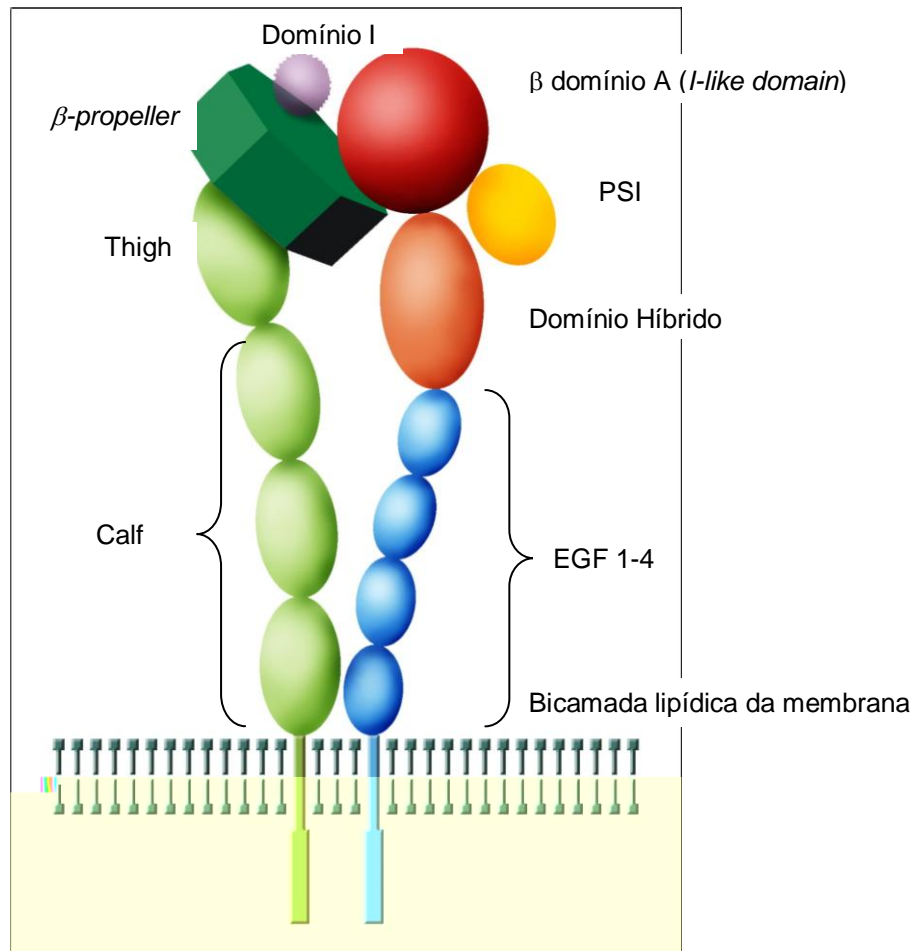


Figura 1 – Esquema dos domínios da interesse para estudos de relação estrutura-função e *docking*. A região de extremidade foi utilizada para as simulações. Os outros domínios possuem também aminoácidos que, quando suprimidos ou mutados, podem interferir na ativação e transdução de sinais. Em verde a subunidade α , em azul, vermelho, laranja e amarelo a subunidade β . O domínio I aparece em púrpura. Nesse trabalho, nos concentramos na extremidade da integrina (β propeller e β domínio A).

As integrinas se dividem ainda entre as que contêm um segmento extracelular próximo ao N-terminal chamado “Domínio Inserido” (domínio I) e as que não o contêm, sendo que aproximadamente metade das integrinas contêm o domínio I. O domínio I funciona como sítio de ligação nas integrinas que o expressam. A estrutura desse domínio é similar à encontrada em outras proteínas que sofrem modificações terciárias durante a ativação, como a proteína G (Lee et al., 1995a). Esse domínio apresenta ainda o motivo MIDAS, que coordena o íon divalente. Nas integrinas que

não apresentam o domínio I, o sítio de ligação se situa entre o domínio *-propeller*, na subunidade α e o domínio A da subunidade β .

Dentre as integrinas da família $\beta 1$, algumas interagem exclusivamente com uma proteína de matriz (VLA-6, VLA-5), algumas reconhecem mais de um ligante na matriz extracelular (VLA-1) e outras interagem com proteínas de matriz e receptores de superfície celular (VLA-4). Sabe-se que uma vez ligadas ao seu receptor fisiológico, a dissociação entre ambos é energeticamente desfavorável (Cai and Wright, 1995), embora a reversão seja possível.

A integrina VLA-4 é uma das integrinas mais amplamente estudadas devido a sua importância em processos inflamatórios e doenças auto-imunes (Springer, 1994). No sistema imune esta molécula está envolvida no transporte, adesão e infiltração dos linfócitos, durante processos inflamatórios. As integrinas *very late antigen-4* (VLA-4) e *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) já foram descritas como essenciais para a adesão dos linfócitos ao endotélio, sendo esse um passo fundamental para a migração dessas células ao sítio inflamatório (Kavanaugh et al., 1991; Lawrence and Springer, 1991).

A subunidade $\alpha 4$ se combina somente com as subunidades $\beta 1$ e $\beta 7$, formando as integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$. O VLA-4 é um receptor expresso constitutivamente em leucócitos mononucleares, monócitos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e macrófagos. Embora não seja constitutivamente expressa em neutrófilos ou polimorfonucleares (células que podem apresentar 2, 3 ou 5 lóbulos), alguns estudos sugerem que essa integrina pode ser expressa sob condições específicas de estímulo (Lobb and Adams, 1999).

Uma particularidade das integrinas é sua modificação estrutural rápida, alterando sua afinidade pelo ligante (Shimaoka et al., 2002). Essa mudança

estrutural pode ser desencadeada por um sinal intracelular, chamado *inside-out* ou extracelular denominado *outside-in*. Essa modificação é dependente da temperatura e reversível, e ainda não pode ser estudada por dinâmica molecular, com as ferramentas e algoritmos atuais.

A ligação dos linfócitos a algum dos ligantes produz mudanças significativas na morfologia celular e é crucial na regulação da mobilidade celular. Durante a transdução de sinal desencadeada a partir de sinais externos, proteínas de citoesqueleto como talina e vinculina, que ligam o domínio intracelular da integrina à actina são recrutadas (Katz et al., 2000), e posteriormente ocorrem a ativação da quinase de adesão focal (FAK) e a fosforilação de membros da família de proteínas quinase Src e Rho, uma família de GTPases (Figura 2). Essa cascata de eventos intracelulares culmina com o rearranjo morfológico da célula, entrada na fase S do ciclo celular e/ou transcrição de genes mediada por integrinas (Boudreau and Bissell, 1998).

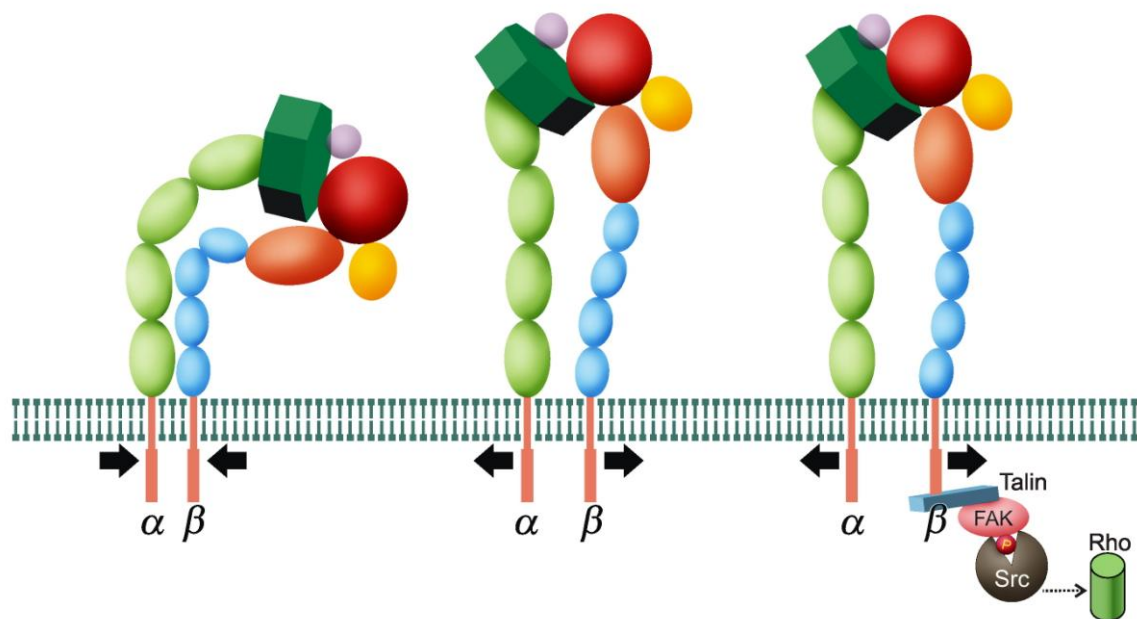


Figura 2 – Modelo proposto para a ativação das integrinas. Após um estímulo interno (*inside-out*) ou externo (*outside-in*), a extremidade extracelular da integrina se eleva e se afasta da membrana, expondo seu sítio ativo, concomitantemente à separação da região transmembranar. A proteína de citoesqueleto talina é recrutada, ativando FAK, juntamente à fosforilação de Src e ativação de Rho (modificado a partir de Hynes, 2002).

A afinidade pelos ligantes pode ser modulada mediante essa cascata intracelular. Os detalhes dessa interação e sinalização ainda não são perfeitamente compreendidos, embora muitos avanços tenham sido feitos recentemente (Yonekawa and Harlan, 2005).

Mudanças conformacionais no domínio I da subunidade α das integrinas $\beta 2$ são necessárias para um aumento da afinidade da ligação com o sítio *Metal Ion Dependent Adhesion Site* (MIDAS). Duas classes de inibidores alostéricos para o domínio I foram identificadas (Shimaoka and Springer, 2003). Algumas moléculas pequenas inibem a interação do ligante natural ao MIDAS, ligando-se a este e estabilizando a conformação fechada do domínio I, impedindo a sua alteração para a forma aberta, de alta afinidade (Last-Barney et al., 2001; Liu et al., 2001; Weitz-Schmidt et al., 2001). Outra classe de pequenas moléculas antagonistas mantém o domínio I na forma fechada, de baixa afinidade, afetando as interações entre o domínio I e o domínio A na subunidade β (Shimaoka et al., 2003; Welzenbach et al., 2002).

1.2 – Biologia estrutural de integrinas

Até recentemente, muito pouco se sabia sobre a estrutura terciária das integrinas. Seu alto peso molecular, combinado aos baixos níveis de expressão, pouca estabilidade e glicosilação extensa tornaram seu isolamento e determinação estrutural bastante difícil. Um importante passo no esclarecimento da estrutura detalhada das integrinas e sua atividade/ativação foi dado após a descrição do cristal obtido da integrina $\alpha v \beta 3$ (Xiong et al., 2001; Xiong et al., 2004; Xiong et al., 2002). Até então, somente estruturas resolvidas por microscopia eletrônica, tomografia e partes do domínio I estavam descritas. Até o presente momento, a

única estrutura disponível da fração extracelular completa de uma integrina que possa ser utilizada como referência para a construção do VLA-4 é a depositada no PDB sob código 1L5G (figura 3). Os outros cristais já obtidos referem-se a domínios isolados como, por exemplo, o domínio I do VLA-2 (Emsley et al., 2004) e de outras integrinas que apresentam essa estrutura.

Mesmo com uma resolução de 3.2Å, a estrutura proporcionou um enorme avanço no conhecimento estrutural dessa e de outras integrinas, como a localização precisa dos domínios, suas interações intramoleculares, localização de pontes dissulfeto, posicionamento dos íons divalentes, contatos hidrofílicos e hidrofóbicos e sítio ativo (Xiong et al., 2003).

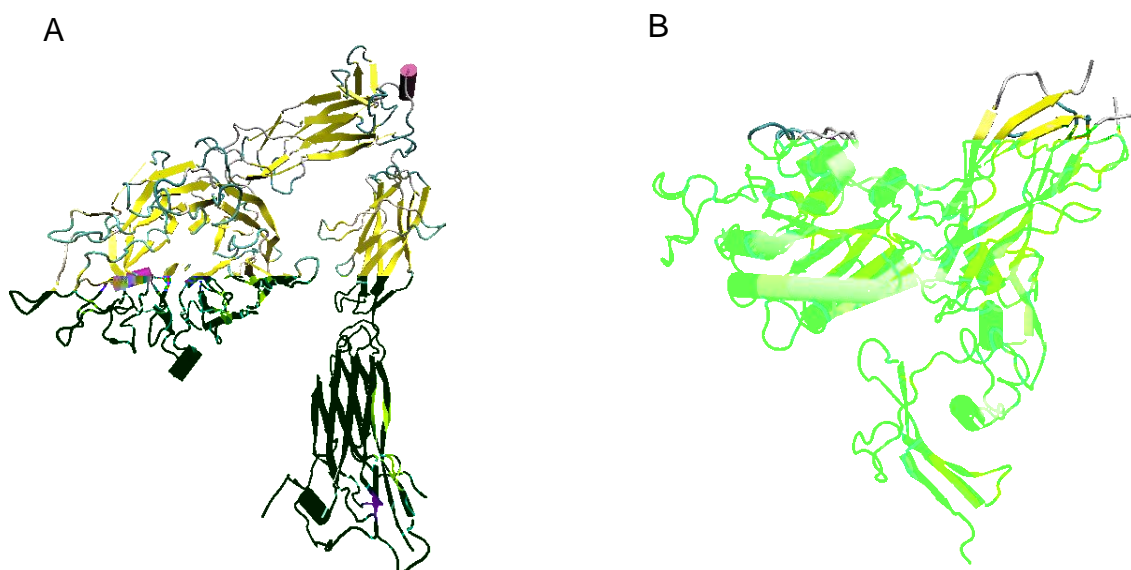


Figura 3 - Estrutura tridimensional da integrina $\alpha\beta_3$, obtida por difração de raios-x. A) Representação gráfica por estruturas secundárias da cadeia α . B) Representação gráfica da cadeia β (Xiong et al., 2001). O código PDB dessa estrutura é 1L5G.

Surpreendentemente, a estrutura obtida exibe uma conformação dobrada, o que fez com que se especulasse sobre qual seria a forma fisiologicamente ativa e inativa. Inicialmente foi sugerido que a estrutura ativada seria a dobrada, já que a

proteína não poderia estar com o sítio ativo voltado para a membrana no momento da ativação, pois seria espacialmente impossível que o ligante se ligasse ao sítio nessa posição. Mais tarde, através de estudos por mutagênese e anticorpos monoclonais, foi sugerido que a forma ativa seria na verdade a proteína estendida, e que a ativação poderia ser decorrente de uma cascata de fosforilação intracelular. Ao longo do dímero foram encontrados outros sítios que faziam com que a integrina se ativasse ou permanecesse inerte mesmo em presença de uma alta concentração do ligante. A concentração de íons ou de ligantes também é relevante para o perfeito funcionamento das integrinas. Há evidências de que a ativação também repercute nos domínios transmembranares, que se separam enquanto a integrina está ativada (Legler et al., 2001; Plow et al., 2000). A conformação dobrada se mantém estável através de uma ponte dissulfeto entre a “cabeça” e a “perna” da integrina, funcionando como um “interruptor” que pode ser modulado conforme a ação de agentes redutores. Foi proposto que esse mecanismo de ativação seria ativado por sinais intracelulares (Takagi et al., 2002).

Esse modelo de ativação não é completo, pois não explica algumas observações experimentais em integrinas ligadas à membrana. Estudos hidrodinâmicos em α IIb β 3 mostram que a ativação é rapidamente reversível, enquanto esse modelo não explica sequer como a integrina retorna ao estado inativo, especialmente quando imersa na matriz extracelular. Outra evidência de que esse modelo não explica completamente esse processo é que a ativação não está necessariamente ligada ao estiramento da integrina: a integrina α 5 β 1 pode assumir a forma esticada quando tem essa ponte desfeita, porém ainda se mantém inativa (Takagi et al., 2001).

Não há consenso sobre o mecanismo exato de ativação, no entanto, sugere-se que o desdobramento seja uma consequência da ativação, que poderia contribuir para eventos pós-ativação, consistente com a descrição de que diferentes ligantes iniciam diferentes respostas funcionais em integrinas (Cierniewski et al., 1999). Ligantes peptídeo-miméticos com alta afinidade (Du et al., 1991; Mazurov et al., 1996), Mn^{2+} (Smith et al., 1994), alguns anticorpos monoclonais e mutações no segmento extracelular (Arnaout, 2002) podem mimetizar a ativação *inside-out*, refletindo uma relação dinâmica entre a cabeça da integrina e sua cauda. As bases atômicas para essa ativação alostérica, reversível e bidirecional permanecem ainda obscuras.

1.3 - Integrinas e Fármacos

Mediante o tratamento com anticorpos monoclonais contra o VLA-4 ou VCAM-1, foi descrito o papel central dessa integrina em modelos animais para doenças inflamatórias crônicas como a doença pulmonar alérgica, o que sugere que esse heterodímero poderia ser um alvo terapêutico para a asma e artrite reumatóide. Além disso, a síndrome da deficiência de adesão leucocitária (LAD I) foi descrita antes de o defeito molecular ser descoberto (Bunting et al., 2002; Roos and Law, 2001). Os pacientes com essa síndrome exibem infecções bacterianas recorrentes e persistentes, além de pronunciada leucocitose entre os episódios de infecção. Esses pacientes foram estudados e descobriu-se que são quantitativamente deficientes quanto à expressão de integrinas $\alpha M\beta 2$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha X\beta 2$ e $\alpha D\beta 2$ como resultado de mutações heterogêneas na subunidade $\beta 2$. Recentemente, variantes de LAD I foram descritas (Harris et al., 2001; McDowall et al., 2003), e propôs-se que caracterizassem uma síndrome distinta. Esses pacientes apresentam integrinas $\beta 1$,

$\beta 2$ e $\beta 3$ disfuncionais, porém estruturalmente intactas, sugerindo uma deficiência em uma molécula sinalizadora para a ativação (Alon and Etzioni, 2003).

Atualmente há duas abordagens terapêuticas em distúrbios envolvendo o VLA-4: os anticorpos monoclonais do receptor VLA-4 e os antagonistas peptídicos e não-peptídicos sintéticos.

Já foram obtidos resultados clínicos positivos durante o tratamento da esclerose múltipla (Miller et al., 2003) com o anticorpo monoclonal Natalizumab (Antegren[®]) e doença de Crohn (Ghosh et al., 2003). Parece então perfeitamente plausível que compostos antagonistas para essa integrina possam ser utilizados no tratamento ou prevenção dessas doenças. O Natalizumab é um anticorpo monoclonal humanizado anti- $\alpha 4$ que se liga às integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$, desenvolvido por “Protein Design Labs” a partir de um anticorpo murino anti- $\alpha 4$. Os primeiros resultados do ensaio clínico foram publicados em 2003, em um estudo com 213 pacientes com esclerose múltipla, tratados com Natalizumab. A administração do medicamento se mostrou bastante eficaz, conforme evidenciado na figura 4.

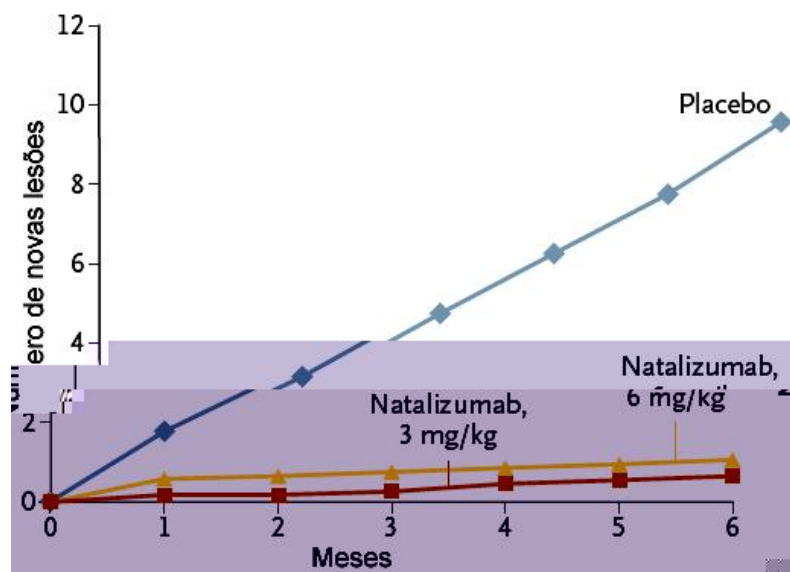


Figura 4 – Administração do medicamento Natalizumab. O número de pacientes afetados foi reduzido drasticamente após a utilização do fármaco, comprovando sua eficácia para o tratamento da esclerose múltipla (Miller et al., 2003). O anticorpo foi administrado por via intravenosa a cada 28 dias, durante 6 meses.

A maior parte das integrinas reconhece pequenos motivos peptídicos nos contra-receptores e, em geral, o componente chave é um resíduo ácido. A especificidade para o ligante depende de ambas as subunidades no heterodímero. Foi proposto que pequenos peptídeos derivados da seqüência de aminoácidos LDV e ainda moléculas não-peptídicas derivadas de N-acilfenilalanina funcionariam como potentes inibidores da ligação VLA-4/VCAM-1, o que levou a uma concentração de esforços no desenvolvimento desses fármacos potencialmente eficazes.

A partir do segmento GPEILDVPST, chegou-se ao fragmento mínimo que ainda mantinha a atividade inibitória da ligação entre a fibronectina e o VLA-4, identificado como a seqüência ILDV. Foi feito então um estudo que propôs a adição de um *cap* N-terminal ao tripeptídeo LDV, mostrado na figura 5, denominado 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl (PUPA), com um aumento realmente considerável em sua atividade inibitória.

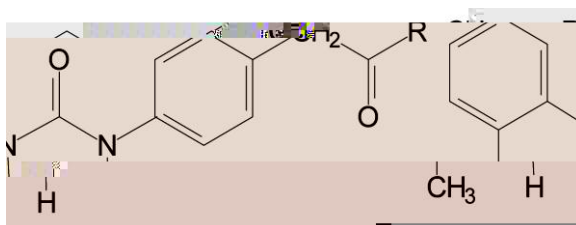


Figura 5 – Grupamento 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl, adicionado na extremidade N-terminal da seqüência ILDV, substituindo a isoleucina (Singh et al., 2002). Esse grupamento se liga ao átomo N da leucina.

As moléculas que apresentam esse *cap* formam uma nova família de compostos (Lin et al., 1999). Rapidamente, diversas companhias farmacêuticas adotaram essa estratégia para o desenho de fármacos antagonistas. O estudo que descreve os ligantes derivados do LDV utilizados em nossos experimentos (Singh et al., 2002) foi feito através de uma varredura *in silico* em um banco de dados virtual de compostos, por meio da Relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR).

Os derivados de N-acilfenilalaninas são o segundo mais avançado grupo de inibidores desenvolvidos. O núcleo da fenilalanina parece ser essencial para a atividade e suporta uma vasta gama de substituintes na posição 4 do anel aromático e no átomo de nitrogênio (Tilley et al., 2000). De maneira diferente dos peptídeos derivados de LDV, que são altamente seletivos para VLA-4, vários membros dessa família inibem tanto a interação VLA-4/VCAM-1 como $\alpha_4\beta_7$ /MadCAM. Esses compostos estão entre os mais avançados, porém o número de publicações e patentes voltados para o estudo dos antagonistas de VLA-4 tem crescido vertiginosamente, demonstrando um grande interesse comercial no desenvolvimento de moléculas inibidoras dessa integrina.

As moléculas peptídicas oferecem ainda outros problemas relativos ao rápido *clearance* e a baixa biodisponibilidade.

Ao comparar-se a potência dos antagonistas, é importante ressaltar que as afinidades relatadas geralmente não são constantes de equilíbrio. Os valores de IC50 listados podem ser dependentes da concentração dos reagentes e do método de estudo, e podem não representar adequadamente as verdadeiras afinidades dos compostos pelas integrinas. Algumas considerações devem ser feitas ao se analisar os dados de IC50: em geral, os dados de IC50 baseados em ensaios biológicos *in vitro* ou *in vivo* tendem a fornecer maiores valores devido à avidéz proporcionada por múltiplas interações na superfície celular; geralmente o IC50 relativo de compostos dentro de um mesmo conjunto de resultados, pode refletir o equilíbrio relativo da energia de ligação. Porém, conjuntos de dados de diferentes laboratórios variam extensamente e devem ser interpretados cuidadosamente (Jackson, 2002).

Outra diferença importante refere-se à seqüência reconhecida pelo VLA-4. Enquanto as integrinas VLA-5, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ reconhecem sempre a seqüência RGD,

independente de qual seja o ligante com o qual se estabelece a ligação, o VLA-4 reconhece diferentes seqüências em função do ligante (Curley et al., 1999). A seqüência de aminoácidos característica de reconhecimento da fibronectina pelo VLA-4 é ILDVP, e no VCAM-1 é QIDSP. Estudos de mutagênese sitio-dirigida sobre a alça CD do VCAM-1 confirmaram que a Pro42, Asp40 e Ile39, ao serem substituídos por Ala, inativam a ligação, mesmo em concentrações elevadas de Mn^{2+} (Chiu et al., 1995).

1.4 - Integrinas e Inflamação

Os linfócitos circulantes normalmente migram através dos espaços extravasculares em números relativamente baixos. Essa situação pode mudar a partir de algum sinal recebido pelas células endoteliais, indicando alguma infecção ou condição inflamatória. As células da superfície vascular, por outro lado, apresentam os ligantes às moléculas de adesão dos linfócitos circulantes. Nos sítios de inflamação, a liberação local de mediadores tais como citocinas ($\text{TNF}\alpha$ e interleucina-1) e quimiocinas por células T ativadas e monócitos estimula células endoteliais próximas a expressar moléculas de adesão na sua superfície. A expressão prolongada e elevada de VCAM-1 foi observada *in vivo* e *in vitro* em modelos experimentais, assim como em condições patológicas humanas como asma, aterosclerose, rinite alérgica e rejeição a transplantes (Yang and Haggmann, 2003). Após encontrar essas áreas com maior densidade dos ligantes, os linfócitos que até o momento mantinham um movimento similar a um “rolamento”, aderem mais firmemente, inicialmente via selectinas (Vanderslice et al., 2004).

Posteriormente sua velocidade de rolamento diminui até sua imobilização por interações mais fortes com integrinas, mudam sua forma e migram através dos tecidos até o sítio de infecção ou inflamação. A interação com as integrinas contribui, em parte, para a formação de placas de adesão focal (regiões de contato mais estreito entre a célula e as proteínas de matriz) rearranjo do citoesqueleto e migração para os tecidos-alvo (Figura 6). Esse processo é parte importante na fisiologia do sistema imune e em algumas condições patológicas pode ocorrer de maneira descontrolada.

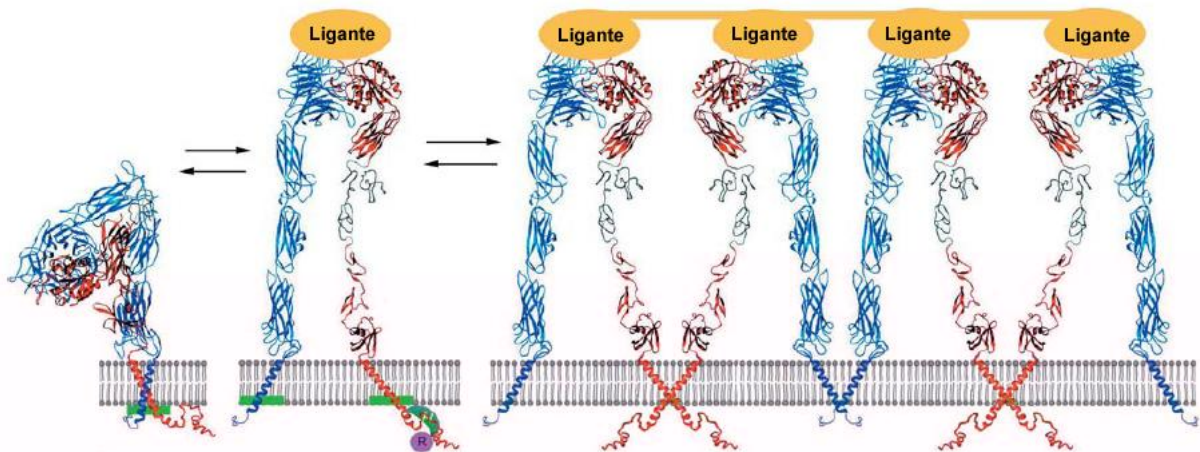


Figura 6 – Modelo de ativação e formação de cluster. Após algum estímulo, interno ou externo, a integrina se desdobra, expondo o sítio de ligação e se mantém em um estado de maior afinidade. Paralelamente, os domínios transmembranares de ambas as subunidades se separam. Nesse estágio, o heterodímero é chamado de complexo focal. Posteriormente, ocorre o deslocamento lateral e agrupamento de outras integrinas na membrana celular, formando as placas de adesão focal, modificado a partir de Qin, Vinogradova *et al.*, 2004.

Se os eventos que iniciaram o processo não forem debelados e se tornarem crônicos, pode haver um extravasamento excessivo dos linfócitos, o que pode exacerbar a condição inflamatória, o qual, por outro lado, continuará a recrutar mais células inflamatórias, podendo resultar em uma lesão tecidual.

A estratégia de tratamento de asma em cobaias, mediante o uso dos fármacos da série PUPA, já foi utilizada, através do bloqueio da migração de células inflamatórias, particularmente eosinófilos e linfócitos T, mediante o uso do anticorpo monoclonal HP1/2, havendo uma diminuição na secreção dos eosinófilos (Pretolani *et al.*, 1994). Essa diminuição reflete o bloqueio da interação entre o VLA-4 e a fibronectina.

Conforme dados obtidos por outro estudo, linfócitos T ativados podem expressar fibronectina em sua superfície, outro sítio de interação para o VLA-4. Estes dados sugerem que outras interações, além de VLA-4/VCAM-1, podem estar envolvidas na ativação e migração de leucócitos, especificamente linfócitos T, aos

sítios de inflamação. Essa interação também seria, então, alvo da terapêutica com anticorpos monoclonais anti-VLA-4 (Hauzenberger and Sundqvist, 1993).

Esses estudos conjuntamente indicam que a estratégia de bloqueio da interação do VLA-4 com seus ligantes é uma alternativa viável para o tratamento de patologias inflamatórias nas quais o VLA-4 seja a principal proteína envolvida.

2 – Objetivos

A integrina $\alpha4\beta1$ ainda não tem sua estrutura quaternária resolvida por nenhuma metodologia experimental. Nesse sentido, propusemo-nos a construir a estrutura tridimensional dessa integrina utilizando modelagem comparativa.

Os modos de ligação das moléculas utilizadas também ainda não estão completamente descritos. Utilizando a metodologia de *docking molecular*, analisaremos essas interações utilizando como matriz a estrutura do $\alpha4\beta1$ construída no passo anterior, visando à observação de grupamentos farmacologicamente importantes e ligações que possam ser exploradas em futuros inibidores. Para esse passo, os ligantes utilizados serão baseados em proteínas e outras moléculas que se liguem a integrina $\alpha4\beta1$, como VCAM-1, fibronectina e outras moléculas descritas como bons inibidores.

As coordenadas dos modos de ligação entre os ligantes e a integrina, obtidos pelo *docking* servirão como ponto de partida para as simulações de dinâmica molecular, visando o cálculo da energia livre do sistema e a observação de tendências entre os ligantes comparados.

3 – Metodologia

3.1 - Desenho racional de fármacos baseado na estrutura do receptor

As metodologias tradicionais para a descoberta de fármacos envolvem uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo* através da chamada “varredura cega”, que a grosso modo, pode ser definida como uma estratégia de tentativa e erro na testagem de substâncias em modelos animais e cultura de células, com posterior análise de seu efeito. Com essa abordagem, que além de demorada e cara, são testadas centenas ou até milhares de substâncias. Porém a eficácia é baixíssima, já que a maior parte dos fármacos testados é rejeitada.

O desenho racional de fármacos parte do pressuposto que o conhecimento da estrutura, ou parte dela, pode proporcionar indícios de quais interações devem ser bloqueadas, visando à inibição da atividade biológica, ou ainda sua ativação dependendo do efeito desejado. O conhecimento da estrutura pode ser deduzido através de metodologias experimentais, como a difração de raios-x, ressonância magnética nuclear ou então metodologias teóricas, como a modelagem comparativa ou modelagem *ab-initio*. A biologia estrutural se tornou, então, parte importante do desenvolvimento de fármacos, eliminando diversos passos entre o isolamento de uma molécula em potencial e o seu teste clínico.

Os esforços recentes mais bem sucedidos envolvem o estudo do HIV. Diversos fármacos potentes, inibidores de proteases desse vírus, foram concebidos especificamente para impedir a atividade dessa enzima, essencial para a atividade viral, e vários destes fármacos já estão em uso (Gao et al., 2006; Klumpp and Mirzadegan, 2006; Meiselbach et al., 2006).

Diante das perspectivas de estudo e compreensão dos mecanismos moleculares de ligação do VLA-4 e dos resultados obtidos utilizando-se

metodologias computacionais e teóricas no estudo de sistemas biológicos semelhantes, propomos a mesma abordagem como alternativa e suporte à elucidação das interações e modos de ligação dessa integrina, visando ao auxílio no desenho de novos fármacos inibidores do VLA-4.

3.2 - Modelagem comparativa

As integrinas apresentam como limitação à ressonância magnética o seu tamanho (subunidade α ~1000 aminoácidos, β ~750 aminoácidos). Sua cristalização também oferece dificuldades por tratar-se de uma proteína transmembranar heterodimérica. A modelagem comparativa foi então utilizada para a obtenção de um modelo de estrutura tridimensional da integrina $\alpha4\beta1$, visando à sua utilização em estudos de interação com fármacos e dinâmica molecular.

Proteínas que ainda não possuem suas coordenadas tridimensionais determinadas experimentalmente podem ter sua estrutura construída a partir de sua seqüência de aminoácidos utilizando o método de modelagem comparativa, também conhecido como modelagem por homologia (Branden and Tooze, 1999; Sternberg, 1996). Essa técnica se baseia no princípio evolutivo de que proteínas de uma mesma família, mesmo que possuam seqüências diversas, mantêm sua estrutura global conservada (Sanchez et al., 2000). Para a utilização dessa técnica, é necessário que a estrutura de pelo menos uma proteína relacionada (molde), obtida experimentalmente, esteja disponível. Esse é o método teórico com maior confiabilidade para a predição da estrutura de uma proteína que ainda não tenha sido resolvida experimentalmente.

A técnica depende diretamente do alinhamento entre as seqüências alvo e molde. A identidade seqüencial é a ocorrência de um mesmo aminoácido na mesma

posição em seqüências alinhadas. A similaridade seqüencial leva em consideração também o pareamento de aminoácidos diferentes constituindo substituições conservativas, geralmente substituições por aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Quando a identidade entre as seqüências é alta, em geral acima de 30%, pode-se afirmar que as duas proteínas possuem estruturas tridimensionais similares. A curva representada no gráfico da figura 7 indica os limites existentes entre alinhamentos que possibilitem a construção de modelos utilizando esse método e alinhamentos que transmitiriam pouca informação estrutural para a construção do modelo. Pela análise do gráfico, pode-se concluir que quanto menor o tamanho do alinhamento, maior deve ser a similaridade seqüencial.

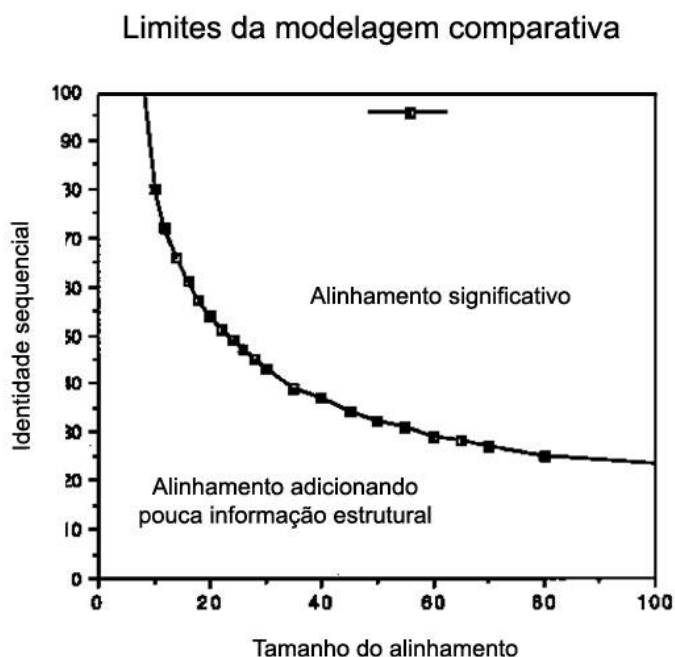


Figura 7 - Limites teóricos da técnica de modelagem comparativa utilizando o tamanho do alinhamento em relação à identidade calculada entre seqüências (Sander and Schneider, 1991).

Através da análise do gráfico, verifica-se que existem valores de confiança para o alinhamento. Estes valores variam de 25% a 30% de identidade, dependendo do tamanho do alinhamento construído.

A metodologia para a predição da estrutura tridimensional de uma proteína utilizando modelagem comparativa consiste em quatro etapas básicas (Sanchez and Sali, 1998), conforme ilustrado esquematicamente na figura 8:

- i) identificação de referências
- ii) alinhamento entre seqüências
- iii) construção do modelo
- iv) validação do modelo

Cada etapa pode ser realizada utilizando uma determinada técnica ou a combinação de diferentes técnicas.

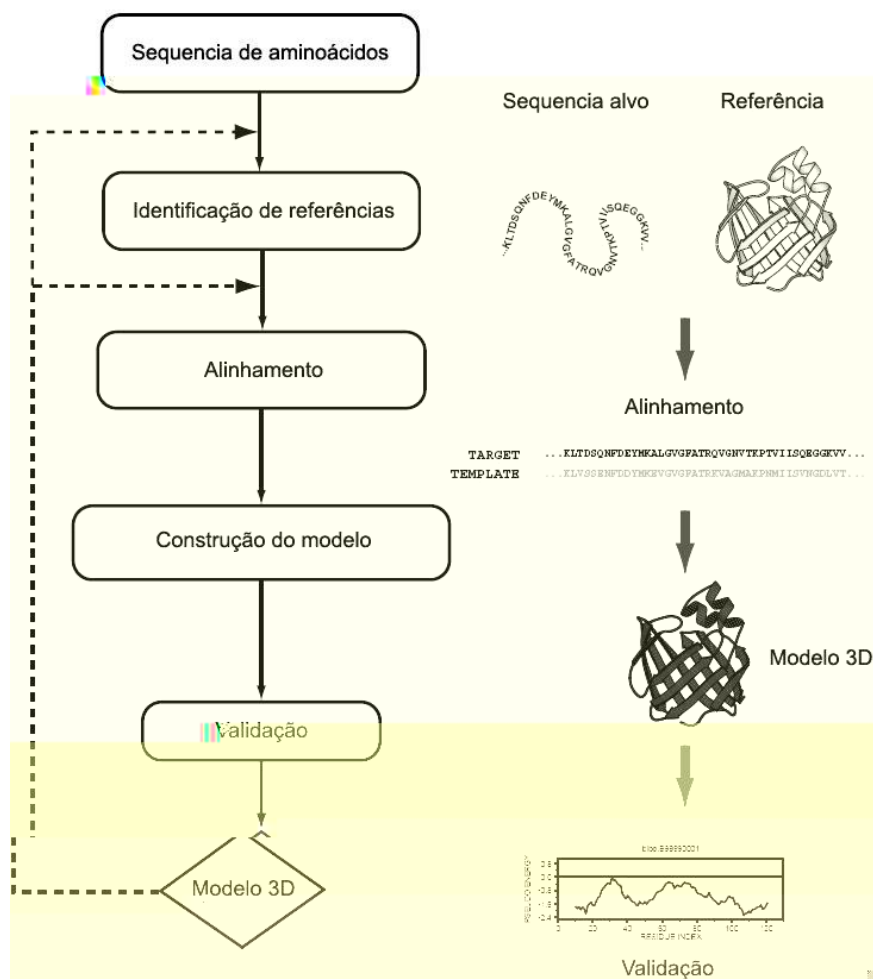


Figura 8 - Etapas que compõem a metodologia de modelagem comparativa (Marti-Renom et al., 2000). De poã m6BT9B1 (e)-üem d1 1(-)1 0 0 1 1197(m)-3(h)16oá(m)c loBT9B,102(D)8(e)8BT9Bälom6be BT9B

As referências (ou moldes) utilizadas para a construção dos modelos geralmente se encontram depositadas no banco de dados chamado Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000), porém podem também constar em outros bancos de acesso restrito.

O programa de domínio público mais utilizado para comparação de seqüências protéicas é o BLAST. A qualidade de um modelo aumenta proporcionalmente à identidade calculada entre a seqüência da referência e a seqüência alvo.

Para o cálculo do melhor alinhamento são utilizadas matrizes de substituição. Essas matrizes são tabelas de valores que descrevem a probabilidade de ocorrência do pareamento entre aminoácidos ou nucleotídeos num alinhamento que possua significância biológica. A matriz BLOSUM (Henikoff and Henikoff, 1992) é a mais utilizada atualmente e foi construída a partir de seqüências de ocorrência freqüente em seqüências relacionadas. Estas seqüências de ocorrência freqüente foram obtidas no banco de dados BLOCKS (Henikoff and Henikoff, 1991).

Para identificar os resultados com maior significância, é utilizado um parâmetro chamado de “valor esperado”. Esse valor fornece informações sobre a probabilidade de um alinhamento seqüencial ter sido obtido ao acaso. Quanto menor esse valor, mais significativo será o alinhamento. O “valor esperado” é calculado por $E = mn2^S$, onde m é o tamanho do banco de dados de seqüências, n o tamanho da seqüência alvo e S , o “escore” calculado no alinhamento utilizando uma matriz de substituição e as penalidades dos “gaps” introduzidos no alinhamento. O alinhamento global tem como objetivo alinhar duas seqüências em toda a sua extensão e pode ser feito utilizando o algoritmo Needleman-Wunch. Esse algoritmo constrói o alinhamento resultante do melhor escore, que é um valor calculado de acordo com os aminoácidos idênticos, alinhados, e que deve ser maior do que o valor calculado dos aminoácidos que são substituídos (Needleman and Wunsch, 1970). Quando o

objetivo é encontrar em bancos de dados seqüências relacionadas à seqüência de interesse, segmentos podem indicar homologia entre elas. Este tipo de busca é feita pelo algoritmo de alinhamento local conhecido como algoritmo de Smith-Waterman (Smith and Waterman, 1981b).

A construção do modelo é baseada completamente nas informações contidas no alinhamento entre as seqüências. Para tal finalidade, utilizamos o programa MODELLER 7.0 (Sali and Blundell, 1993). O método empregado por esse programa é o de satisfação das restrições espaciais (figura 9), que utiliza distâncias geométricas euclidianas e técnicas de otimização para satisfazer as restrições espaciais das proteínas-molde, dadas através do alinhamento (Srinivasan et al., 1993).

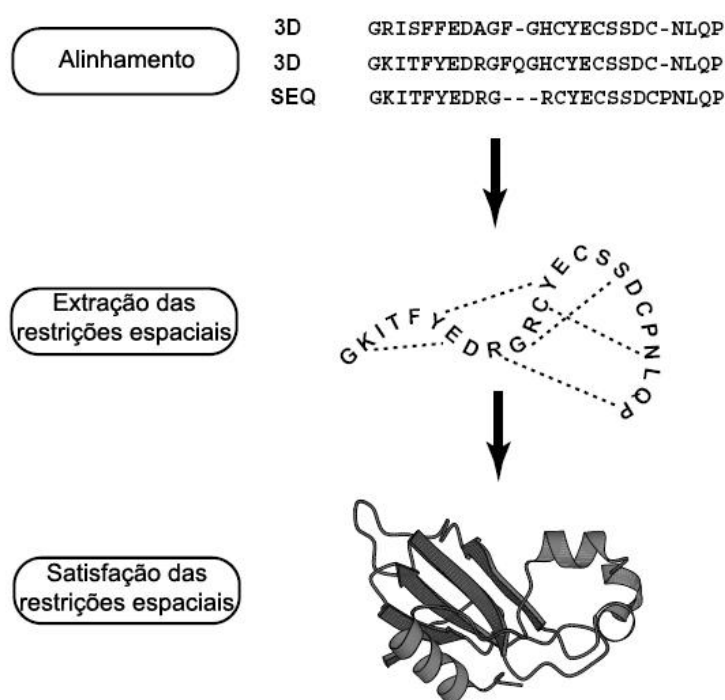


Figura 9 - Modelagem por satisfação das restrições espaciais. As restrições espaciais das distâncias entre átomos e de ângulos diedrais são extraídas das estruturas molde. As restrições espaciais e as restrições estereoquímicas são combinadas em uma função objetiva (baseada em Fiser & Sali, 2001).

A validação, além de avaliar a qualidade do modelo, determina a precisão da estrutura tridimensional e identifica possíveis erros da estrutura tridimensional que podem ser resultado da escolha das referências ou do alinhamento construído.

Existem vários programas que avaliam a estrutura tridimensional da proteína (Laskowski et al., 1993b; Sippl, 1993), indicando a sua qualidade. A avaliação inicial, quase sempre é feita através da análise estereoquímica. O programa PROCHECK (Laskowski et al., 1993b) verifica as ligações entre átomos, os ângulos formados, a ligação peptídica, a planaridade dos anéis e os ângulos de torção formados na cadeia principal e nas cadeias laterais. Dentre essas avaliações, a principal é o cálculo dos ângulos PHI (Φ) e PSI (Ψ) (Ramachandran et al., 1963). Na cadeia polipeptídica os ângulos no eixo entre as ligações N-C α e C α -C possuem liberdade de rotação e estão representados na figura 10:

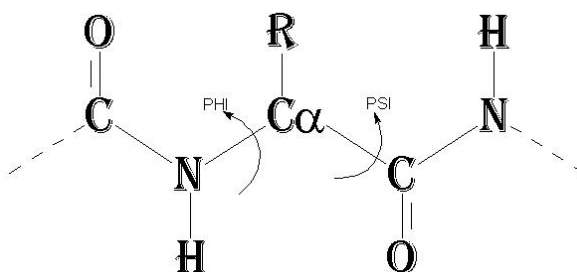


Figura 10 - Localização dos ângulo Φ e Ψ no esqueleto peptídico. Para a construção do gráfico de Ramachandran, esses ângulos são calculados para todos os aminoácidos que compõem a proteína, e os valores atribuídos são mostrados na forma de um gráfico, mostrando quais estão em posições permitidas e quais não estão.

Outros programas avaliam a posição de cada resíduo em relação ao meio em que ele está localizado e seu enovelamento, como o VERIFY3D (Luthy et al., 1992).

A sobreposição da estrutura construída e da estrutura molde não deve variar muito, já que ambas são relacionados estruturalmente. Um valor utilizado para se certificar de que o modelo construído não possui regiões muito diferentes do molde,

o que indicaria uma má escolha da referência ou um alinhamento com muitos erros, é em torno de 1Å a 2Å de raiz do desvio quadrático médio (RMSD) (Michael and Sternberg, 1996). Os valores de RMSD podem ser obtidos utilizando-se o programa SPDB-VIEWER (Guex and Peitsch, 1997). Para a inspeção visual rápida do posicionamento dos aminoácidos na estrutura da proteína, usamos o programa RASMOL (Sayle and Milner-White, 1995), em sua versão modificada, OPENRASMOL (www.openrasmol.org).

3.3 - Campos de força

A representação de um sistema de partículas, através de simulações computacionais, pode ser feita por meio de uma função potencial ou campo de forças. O campo de forças descreve um sistema através da sobreposição de termos simples, que representam as interações entre os átomos. Para o tratamento de centenas ou milhares de átomos, são introduzidos conjuntos de funções potenciais empíricas, calibradas por meio de informações experimentais e cálculos quânticos em pequenas moléculas (Van Gunsteren *et al*, 1990).

A escolha do campo de forças adequado está relacionada diretamente com as propriedades do sistema em estudo. Deve haver um equilíbrio entre a acurácia e o refinamento nas diferentes partes do sistema.

A função de energia potencial utilizada reúne diversos parâmetros que descrevem os movimentos atômicos e as interações intermoleculares, como por exemplo o potencial de *Hooke*, ângulos planares, ângulos torcionais, diedrais impróprios, potencial de *Lennard-Jones* e potencial de *Coulomb*, sendo que esses

dois últimos termos descrevem interações entre átomos não ligados (equação 1). O campo de forças utilizado na dinâmica molecular foi o Gromos96.

$$\begin{aligned}
 U(r) = & \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} K_{b_i} (r_i - r_{0_i})^2 + \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} K_{\theta_i} (\theta_i - \theta_{0_i})^2 + \\
 & + \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} K_{\xi_i} (\xi_i - \xi_{0_i})^2 + \sum_{i=1}^N K_{\varphi_i} [1 + \cos(n_i \varphi_i - \delta_i)] + \\
 & + \sum_{i < j}^N \left[\frac{C_{12}(i, j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i, j)}{r_{ij}^6} \right] + \sum_{i < j}^N \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}
 \end{aligned}
 \tag{Equação 1}$$

3.4 - Docking Molecular

O docking molecular pode ser definido como uma metodologia computacional usada para geração, predição e avaliação de complexos receptor-ligante, sendo o receptor normalmente uma proteína e o ligante podendo ser tanto uma molécula pequena quanto uma outra proteína (Brooijmans and Kuntz, 2003; Grant and Richards, 1995; Krumrine et al., 2003). Esta técnica é bastante utilizada no desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura do receptor, com duas abordagens diferentes:

- i) Previsão da melhor conformação de interação de um ligante com a proteína alvo. Identificada a melhor conformação ligante/receptor, podem ser identificados os sítios de interação (aminoácidos ou grupos de aminoácidos) existentes e aqueles possíveis de serem explorados, permitindo assim que modificações possam ser introduzidas no ligante, com o objetivo de obter-se uma maior afinidade com o receptor (McConkey et al., 2002).

ii) Realização de varredura de bancos de dados *in silico*. Esta varredura consiste na busca, entre várias moléculas conhecidas, daquelas que tenham as características químicas adequadas para se ligar ao sítio de interesse (Gane and Dean, 2000). A busca deve ser extensa o suficiente de modo a abranger o maior número de possibilidades de ligação. Esta técnica se assemelha à varredura convencional, *in vitro*. A diferença crucial é que é realizada computacionalmente, ao invés de em bioensaios ou modelos animais.

A realização do *docking* requer uma amostragem/busca eficiente entre as possibilidades posicionais, orientacionais e conformacionais de um ligante flexível na proteína. A busca conformacional durante o *docking* é necessária, pois normalmente não se sabe com qual conformação o ligante interage mais favoravelmente com o receptor. A proteína é considerada, usualmente, rígida (Brooijmans and Kuntz, 2003), embora recentes modificações adicionadas ao software AUTODOCK (Morris et al., 1996) sejam capazes de lidar com a flexibilidade conformacional do receptor, porém essa abordagem ainda está em estágio inicial de testes. Os comprimentos de ligação e ângulos entre ligações são considerados fixos na molécula do ligante, mas podem ser modificados os graus de liberdade rotacionais e translacionais (movimento de corpo rígido do ligante), além dos graus conformacionais.

No *docking* rígido,

translacionais, os graus de liberdade conformacionais do ligante (McConkey et al., 2002).

A capacidade de lidar adequadamente com a rigidez do receptor e a dificuldade de lidar com solvatação explícita são os dois maiores desafios dos programas de docking. A inclusão dessas duas variáveis geraria um custo operacional ainda muito grande para os recursos computacionais existentes (Carlson, 2002a; Carlson, 2002b; Carlson and McCammon, 2000).

Os algoritmos de busca precisam ser capazes de fazer uma amostragem significativa das regiões no espaço de busca próximas à solução correta, sem uma análise exaustiva de todas as conformações (McConkey et al., 2002), o que tornaria seu custo computacional proibitivo.

3.4.1 - Algoritmos de Docking

O algoritmo genético (GA) usa princípios baseados na genética e evolução. Eventos genéticos como pressão evolucionária, "crossover" e mutações, podem ser simulados por esse algoritmo, de modo a se otimizar soluções para uma grande variedade de problemas. O GA é atualmente um dos mais completos algoritmos de otimização para encontrar soluções próximas às ótimas em complexas simulações de *docking* receptor-ligante. Já foi mostrado ser possível conseguir bons resultados de *docking* através do GA com ligantes com até 18 graus de liberdade torcionais (Morris et al., 1998).

O Algoritmo Genético Lamarckiano (AGL) se baseia nos princípios evolucionários de Lamarck, que dizia que as adaptações ao meio seriam transmitidas para os genes e poderiam ser transmitidas para seus descendentes (através da mudança dos valores dos graus de liberdade do ligante no

"cromossoma"). Resultados da literatura mostram que o desempenho do AGL é melhor do que o do GA (Brooijmans and Kuntz, 2003; Morris et al., 1998; Parril, 1996).

3.5 – Anelamento Simulado Generalizado (GSA)

O método GSA (*Tsallis Machine*) foi descrito inicialmente em 1995 (Tsallis and Stariolo, 1995; Tsallis and Stariolo, 1996). Esse algoritmo é implementado no programa *DOCKTHOR* (Júnior et al., 2004). O princípio desse método se baseia em processos de metalurgia, onde o metal derretido é gradualmente resfriado até atingir sua estrutura cristalina, o mínimo global de energia. De modo semelhante, é introduzido um parâmetro que descreve o decaimento da temperatura no método de otimização. Esse parâmetro aumenta e diminui a temperatura gradualmente. Esse método se mostra eficaz, ultrapassando mínimos locais e alcançando o mínimo global ao fim do processo, geralmente em menos passos que outros métodos estocásticos convencionais. Outra vantagem desse método é sua independência em relação à configuração inicial e se aplica a sistemas onde o mínimo global seja desconhecido. Esse algoritmo também é bastante apropriado para o estudo de ligantes com muitos graus de liberdade conformacionais, como as moléculas escolhidas para nossa análise.

Esse procedimento se baseia nos métodos de anelamento simulado *Annealing* clássico (Kirkpatrick et al., 1983) e rápido (Szu and Hartley, 1987), baseados na mecânica estatística, e pode ser mais rápido que ambos os métodos, dependendo da escolha correta dos parâmetros. O método GSA já foi aplicado em uma gama de processos variados, como algoritmos genéticos, otimização molecular

usando campos de força clássicos e métodos semi-empíricos. A eficácia não depende somente da escolha correta dos parâmetros, mas também da aplicação da estratégia correta.

Os algoritmos da família de anelamento simulado (AS) dependem de duas funções: função de visita, que determina como o domínio da função é varrido e função de aceitação que diz se um resultado de maior energia deve ser aceito ou rejeitado. O GSA usa a equação 2 como função de aceitação:

$$P_{q_a}(\Delta E(x)) = \frac{1}{1 + \left\{ 1 + \frac{(q_a - 1)[E(x_{t+1}) - E(x_t)]}{T_{q_a}(t)} \right\}} \quad \text{Equação 2}$$

onde q_a é o parâmetro de aceitação.

A função de visita depende da função de densidade de probabilidade de Tsallis (equação 3):

$$g_{q_v}(x) = \left(\frac{q_v - 1}{\pi}\right)^{D/2} \times \frac{\Gamma\left(\frac{1}{q_v - 1} + \frac{D-1}{2}\right)}{\Gamma\left(\frac{1}{q_v - 1} - \frac{1}{2}\right)} \times \frac{T^{D/(q_v-3)}}{\left[1 + \frac{(q_v - 1)x^2}{T_{q_v}^{2/(q_v-3)}}\right]^{\frac{1}{q_v-1} + \frac{D-1}{2}}}$$

Equação 3

onde D é a dimensão da função de custo e q_v é o parâmetro de visita. Da função de distribuição de probabilidades, $G(x_t)$,

$$G(\Delta x_t) = \int_{-\infty}^{\Delta x_t} g_{q_v}(x) dx \quad \text{Equação 4}$$

para a qual um valor aleatório é atribuído, e a perturbação x_t é determinada em cada interação (equação 5):

$$x_{t+1} = x_t + \Delta x_t, \Delta x_t = G^{-1}(\Delta x_t) \quad \text{Equação 5}$$

com a diminuição da temperatura controlada pela equação 6:

$$T_{qv}(t) = \left\{ \begin{array}{l} \frac{T_{qv}(1)}{1+t} \\ T_{qv}(t) \frac{2^{qv-1} - 1}{(1+t)^{qv-1} - 1} \end{array} \right\} \quad \text{Equação 6}$$

3.6 - Minimização de Energia

A análise conformacional de uma molécula pode ser realizada através de rotações de ligações, com mudança simultânea dos ângulos torcionais ou diedrais das ligações e cálculos correspondentes do comportamento estérico.

As moléculas construídas manualmente através de programas de modelagem não estão, *a priori*, na conformação mais estável. Durante a construção e geração de uma estrutura, podem ocorrer distorções na molécula, com formações energeticamente desfavoráveis de comprimentos e ângulos de ligações e ângulos diedrais. Átomos não-ligados podem também interagir em uma mesma região do espaço e provocar repulsão estérica ou eletrostática. Para que essas distorções sejam corrigidas, as moléculas são otimizadas pelo processo de minimização de energia.

Há duas maneiras mais comuns para minimizar a energia de uma molécula:

(I) mecânica molecular

(II) mecânica quântica.

A minimização de energia, juntamente com a análise conformacional podem ser usadas conjuntamente para otimizar a geometria de uma molécula.

A escolha do método de minimização depende diretamente de fatores como o tamanho da molécula e a disponibilidade de recursos computacionais para o armazenamento de dados, cálculo e processamento. Geralmente os algoritmos de minimização são utilizados visando a eliminação de tensões locais, fazendo o ajuste apropriado das distâncias de ligações, espaços não preenchidos durante a solvatação do sistema e sobreposição dos átomos, dentre outros fatores.

Os processos de minimização de energia apresentados fornecem conformações tridimensionais estáveis, que não representam, necessariamente, a estrutura mais estável de determinada molécula, ou complexo. Geralmente, a estrutura com a energia mais estável, ou mínimo global, somente pode ser encontrada após um longo tempo de simulação. Na minimização, os cálculos de energia são interrompidos quando a molécula atinge a primeira conformação estável e levam a uma estrutura semelhante à original, com energia mínima local. Nesse ponto, a minimização não é continuada, já que as variações na estrutura resultam em mudanças pequenas de energia.

3.6.1 – Método de Máximo Declive

Em função da equação de forças resultantes sobre cada átomo de um sistema, provenientes do gradiente da energia potencial total, que é representado pela equação 7,

$$\vec{F}_i = \frac{-\delta V(\{r_i\})}{\delta r_i} \quad \text{Equação 7}$$

pode-se utilizar o método *steepest descent*, que é representado pela equação 8:

$$\vec{r}(i, n + 1) = \vec{r}(i, n) + k_n \left(\frac{\vec{F}(i, n)}{|\vec{F}(i, n)|} \right) \quad \text{Equação 8}$$

onde r calcula a nova posição do átomo i no passo $n+1$ e k_n é o parâmetro de ajuste do tamanho do passo. O que se obtém ao final da minimização é um conjunto de coordenadas $[r_i]$, representando um mínimo local de energia ao se aproximar a força de zero.

3.7 - Simulações computacionais de movimentos moleculares

Recentemente as simulações de interações e movimentos protéicos começaram a ser exploradas com maior afinco. Somando-se esse fato com o desenvolvimento de novos algoritmos e o crescimento significativo da capacidade computacional, possibilitou-se que fenômenos complexos envolvendo sistemas compostos por milhares de átomos pudessem ser estudados detalhadamente.

As proteínas podem sofrer diferentes tipos de movimentos e forças, em diferentes escalas de grandeza e de tempo (ver tabela 2).

Uma das características dos movimentos biomoleculares é que esses tipos de movimentos geralmente são interdependentes e acoplados uns aos outros. As simulações computacionais lidam com esses movimentos, particularmente a dinâmica molecular, que monitora os processos dependentes do tempo, em sistemas moleculares, de modo a estudar suas propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas, resolvendo numericamente as equações de movimento de Newton.

Tabela 2 – Tipos de movimentos moleculares, grandezas de tempo envolvidas e amplitude de movimentos, com respectivas aplicações.

Tipo de movimento	Exemplos de aplicação e funcionalidade	Escala de tempo e amplitude
Movimentos locais Flutuação atômica Movimentos das cadeias laterais	Flexibilidade do ligante na ligação Trajetos de difusão temporal	De fs a ps menos que 1Å
Movimentos em média escala Movimentos dos laços Movimentos de corpos rígidos	Adaptação de conformação do sítio ativo Especificidade de ligação	De ns a μs de 1 a 5Å
Movimentos em grande escala Movimentos de domínios protéicos Movimentos de subunidades protéicas	Transição alostérica Movimento “em dobradiça”	De μs a ms de 5 a 10Å
Movimentos globais Transição hélice-alça Dobramento-desdobramento Associação de subunidades	Ativação de hormônios Funcionalidade de proteínas	De ms a horas mais que 10Å

Uma grande vantagem das simulações computacionais é que a função de energia pode ser modificada e manipulada livremente, permitindo que um sistema possa ser transformado e modificado através de uma gama de variáveis de maneira relativamente fácil.

3.8 - Dinâmica molecular

3.8.1 - Simulações de dinâmica molecular em biologia

O primeiro trabalho publicado utilizando dinâmica molecular para o estudo de sistemas biológicos, mostrou estudos complementares sobre o inibidor de tripsina pancreática bovina (McCammon et al., 1977). Desde então, os algoritmos que compõem essas ferramentas evoluíram e, junto ao crescimento considerável da velocidade dos computadores, o tratamento de sistemas maiores e mais complexos se tornou possível, mesmo que através das descrições clássicas ou então métodos de Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (MQ/MM). Apesar dessa evolução e com esse novo tratamento, o tamanho dos sistemas continua restrito a poucas centenas de milhares de átomos e a abordagem de alguns fenômenos longos como o desdobramento relacionado à ativação das integrinas, que ocorre em cerca de 2s, torna-se praticamente inviável com as técnicas atuais.

As simulações auxiliam na compreensão de processos bioquímicos complexos. Diante das limitações e vantagens impostas pelo método, torna-se claro que sistemas macromoleculares podem ser restritos aos átomos essenciais, que no nosso caso, estão na extremidade da integrina.

Nas simulações de dinâmica molecular, as equações clássicas do movimento, de Newton, são resolvidas para um conjunto de átomos, em função do tempo. Calcula-se inicialmente a força F_i que atua sobre uma partícula i , componente de um sistema, partindo da primeira derivada da função da energia potencial $V(1)$, que descreve a interações entre as partículas:

$$\vec{F}_i = \frac{-\delta V(\{ri\})}{\delta r_i} \quad \text{Equação 9}$$

onde $i=1, 2, 3...N$, sendo N o número total de partículas do sistema. Ao dividir-se a força F_i pela massa m_i de cada partícula, obtém-se a aceleração a que ela está submetida (equação 10):

$$\vec{a}_i = \frac{\vec{F}_i}{m_i} \quad \text{Equação 10}$$

A aceleração é então utilizada no algoritmo de integração (Verlet, 1967), para que seja determinada a propagação das posições com incremento de tempo δt :

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = 2\vec{r}_i - \vec{r}_i(t - \delta t) + \vec{a}_i \quad \text{Equação 11}$$

As novas posições das partículas são preditas no instante $t+\delta t$, partindo das posições nos instantes t e $t-\delta t$ e das forças F_i sobre cada partícula no instante t . As velocidades são necessárias para o cálculo da energia cinética do sistema, que somada à energia potencial, apresentam a energia total do sistema.

$$\vec{v}_i(t) = \frac{[\vec{r}_i(t + \delta t) - \vec{r}_i(t - \delta t)]}{2\delta t} \quad \text{Equação 12}$$

As velocidades também são utilizadas para o cálculo da temperatura do sistema, definida em função da energia cinética média. Geralmente, a obtenção das acelerações é a fase mais dispendiosa computacionalmente e depende do cálculo das forças. O tempo gasto nesses cálculos varia conforme o tamanho do sistema e de sua complexidade, assim como do campo de forças empregado.

3.8.2 - Algoritmo Leap Frog

O algoritmo implementado no programa GROMACS (Lindahl et al., 2001), utilizado nesse trabalho é o algoritmo *Leap Frog* (Hockney, 1970). Nesse algoritmo, a velocidade é calculada no tempo $t+1/2\delta t$, e é usada para o cálculo da posição, r , no tempo $t+\delta t$. Dessa maneira, as velocidades “saltam” sobre as posições e as posições “saltam” sobre as velocidades (equação 13).

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t)\delta t \quad \text{Equação 13}$$

$$\vec{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) = \vec{v}(t - \frac{1}{2}\delta t) + \vec{a}(t)\delta t$$

Como vantagem apresentada por esse método, as velocidades são explicitamente calculadas, porém essas velocidades não são calculadas ao mesmo tempo que as posições. As velocidades nos tempos t podem ser aproximadas pela seguinte equação:

$$\vec{v}(t) = \frac{1}{2} \left[v\left(t - \frac{1}{2} \delta t\right) + v\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) \right] \quad \text{Equação 14}$$

3.9 - Cálculos de Energia Livre

A espontaneidade de um processo químico é dado pela entropia e entalpia. Os processos que ocorrem com a diminuição da entalpia e aumento da entropia são considerados espontâneos em todas as temperaturas. A energia livre de Gibbs relaciona a entalpia e entropia, auxiliando na previsão da espontaneidade de uma reação química e é dada pela equação 15:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad \text{Equação 15}$$

Para o método de cálculo da energia livre de ligação, é necessário que existam dois estados, independente da maneira como o equilíbrio é atingido. O estado inicial geralmente é uma molécula (ligante) em solução e o estado final é a mesma molécula ligada a um receptor.

Utilizamos o método de Energia de Interação Linear (LIE) (Aqvist et al., 1994) para o cálculo de energia livre. Esse método, empírico, se baseia no cálculo da energia de interação entre o ligante e o meio (proteína, solvente etc...), dividida em potencial eletrostática e de *Lennard-Jones* (equação 16), utilizando valores médios temporais dessas interações intermoleculares (figura 11). Essa variação é calculada para os dois estados termodinâmicos do equilíbrio. Para o cálculo da energia livre

para todos os ligantes, fizemos as simulações em duas esferas de 28Å: na primeira, a simulação é feita somente com o ligante e o solvente, enquanto na segunda além do solvente e do ligante, também está presente a região do sítio de ligação compreendida no interior da esfera, sem raio de corte para ambas. Como centro da esfera, consideramos o íon Mg^{2+} .

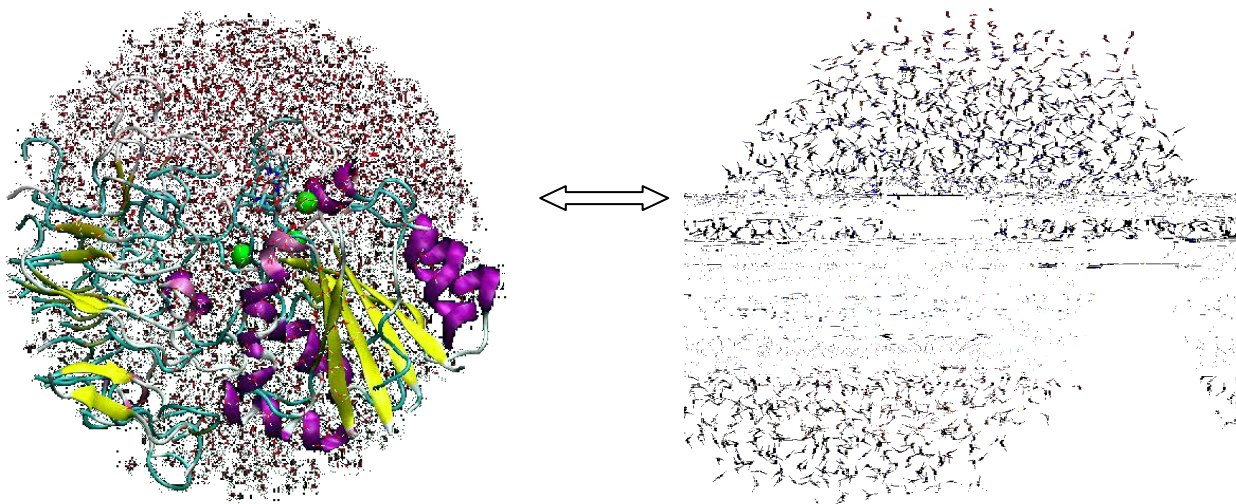


Figura 11 – Esquema simplificado da metodologia de cálculo da energia livre. O mesmo ligante tem sua energia de interação calculada em dois ambientes diferentes e a variação relativa de energia é medida.

$$\Delta G_{lig} = \alpha \Delta \langle U_{l-s}^{vdW} \rangle + \beta \langle U_{l-s}^{el} \rangle + \gamma \quad \text{Equação 16}$$

A energia livre do ligante é calculada na presença do solvente e posteriormente em complexo com o receptor, VLA-4 (equação 16), sendo α , β e γ parâmetros de calibração empíricos. Consideramos 0.5 para compostos iônicos e 0.3 para compostos não iônicos.

$$\Delta \Delta G_{lig} = \Delta G_1 - \Delta G_2 \quad \text{Equação 17}$$

Para a comparação dos ligantes da família PUPA, calculamos a diferença entre o ΔG de todos os ligantes (equação 17), utilizando o PUPA-LDV como

referência. O volume do sistema para essas simulações permanece inalterado. Em função dos resultados, pode-se notar a tendência de ligação entre os ligantes comparados e inferir a relação entre suas constantes de inibição.

$$\frac{K_1}{K_2} = e^{-(\Delta G_1 - \Delta G_2)/RT} \quad \text{Equação 18}$$

Utilizamos as configurações aceitas, segundo os critérios de seleção aplicados (ver resultados), como ponto de partida para os experimentos de dinâmica molecular.

Os experimentos de *docking* molecular foram feitos utilizando o programa DOCKTHOR, com o algoritmo GSA. Para os ligantes da família PUPA, permitimos que os ligantes se movessem com todos os seus graus de liberdade, dentro dos limites da grade. Os resultados foram selecionados conforme os menores valores de energia de interação e agrupados em famílias. Os membros das primeiras famílias foram considerados como soluções aceitas.

Executamos o seguinte fluxograma para o cálculo de energia livre: Após os experimentos de *docking*, a conformação de melhor energia teve suas coordenadas utilizadas como entrada para a minimização de energia, inseridas no sítio de ligação, utilizando o algoritmo *Steepest Descent* até o momento de convergência ou até 1000 passos (o que acontecesse primeiro). Após a minimização, realizamos uma dinâmica molecular de 1.5 ns em um cubo de dimensões 85x100x80 Å, usando o algoritmo *Leap-Frog* para cada um dos ligantes no sítio de ligação. Dividimos essa dinâmica em dois passos: durante os primeiros 500ps permitimos que somente as moléculas de água se movimentassem, de modo a acomodar o solvente. Durante a segunda

parte dessa dinâmica, permitimos que todo o sistema, incluindo as moléculas de água, se movimentasse por 1ns.

Terminados esses dois passos, após a confirmação do equilíbrio do sistema pela visualização direta do gráfico de energia total, utilizamos as coordenadas referentes ao ligante como entrada para duas novas simulações de dinâmica molecular: a primeira em água e a segunda no sítio de ligação do receptor, em uma esfera de 28Å de raio, mantendo como centro da esfera o íon correspondente ao MIDAS. Nessa esfera foi permitido que todo o sistema se movesse, considerando o solvente explícito, e não limitamos o alcance dos átomos com nenhum raio de corte. Essa etapa durou 1ns, e para a análise dos resultados, visando ao cálculo de energia livre, utilizamos somente os últimos 500ps, após nova verificação da energia total do sistema e a confirmação de seu equilíbrio. Esses passos foram repetidos para todos os ligantes.

4 – Resultados

Nesse capítulo apresentaremos os resultados obtidos mediante o uso de três técnicas computacionais: modelagem comparativa, *docking* molecular e dinâmica molecular, para analisar as interações entre a integrina VLA-4 e inibidores específicos.

4.1 - Modelagem Comparativa

4.1.1 - Construção do modelo

Para elucidar a estrutura espacial da integrina $\alpha 4\beta 1$ lançamos mão da integrina $\alpha v\beta 3$, relacionada estrutural e evolutivamente, utilizando para isso a metodologia computacional de modelagem comparativa. O modelo criado provê um melhor entendimento sobre a conformação espacial e possivelmente um melhor esclarecimento sobre as interações com ligantes naturais e moléculas antagonistas, auxiliando no desenvolvimento de fármacos potencialmente mais eficazes.

A integrina VLA-4 foi modelada usando como molde a estrutura cristalográfica da integrina $\alpha v\beta 3$ (CD51/CD61), com código PDB=1L5G (Xiong et al., 2002).

Até o presente momento, essa é a única integrina com a estrutura integral dos seus domínios extracelulares resolvidos experimentalmente que pode ser usada como molde. É importante ainda ressaltar que são observadas poucas mudanças na estrutura quaternária ao se sobrepor às estruturas cristalográficas dessa integrina no seu estado ligado com a estrutura sem o ligante (PDB=1JV2). Durante o processo de cristalização, o domínio extracelular da integrina foi imerso em uma solução contendo o pentapeptídeo cíclico (RGDf[Me]V) (Xiong et al., 2002). Durante esse processo algumas mudanças conformacionais podem ter ocorrido, por exemplo, a própria reestruturação molecular do receptor devido à inclusão do ligante.

É importante ressaltar que o cristal utilizado como molde foi obtido por difração de raios-X com uma resolução de 3.2 Å, sendo essa, portanto, uma resolução relativamente baixa, mas ainda assim aceitável para a construção de modelos por homologia (Baker and Sali, 2001). Embora a estrutura tridimensional de todos os domínios extracelulares da integrina utilizada como molde esteja resolvida, alguns não apresentam uma grande definição devido à baixa eletrodensidade, como os domínios PSI, EGF-1 e EGF-2 da subunidade β . Em alguns casos, algumas coordenadas não foram determinadas diretamente provocando descontinuidade na determinação da estrutura desses domínios particulares. Posteriormente, o mesmo laboratório que determinou as coordenadas da integrina $\alpha V\beta 3$, publicou a estrutura do domínio PSI, com uma resolução de 3.1 Å, elucidando mais detalhadamente a estrutura desse domínio (Xiong et al., 2004).

A primeira fase para a construção do modelo demanda a disponibilidade das seqüências do receptor a ser modelado e as que serão usadas como molde. No nosso caso, as seqüências-alvo utilizadas para a construção do modelo (Takada et al., 1989), foram obtidas do banco de dados do Entrez Protein (Schuler et al., 1996), sob os números de acesso NP000876 (ITGA4 humana) e P05556 (ITB1 humana), para as unidades α e β respectivamente.

Para o alinhamento local (Smith and Waterman, 1981a) entre as seqüências das integrinas alvo VLA-4 e molde $\alpha V\beta 3$, empregamos o servidor BLAST (Altschul et al., 1997), porém esse alinhamento foi otimizado manualmente, de modo a preservar ou reposicionar alguns aminoácidos importantes, como os envolvidos no laço SDL (LYS190-PHE215), no motivo MIDAS (D150,L151,S152,Y153,S154,E249,D279), LIMBS e ADMIDAS, assim como algumas pontes dissulfeto (CYS207-CYS213 da cadeia β e CYS183-CYS198 da cadeia α).

O alinhamento entre as seqüências das unidades α e β da proteína-alvo e a proteína-molde é mostrado nas figuras 12 e 13.

Para a obtenção dos percentuais de identidade e similaridade entre as seqüências alvo e molde utilizamos a matriz de substituição BLOSUM62, obtendo os resultados descritos nas tabelas 3 e 4. Os valores obtidos encontram-se acima dos considerados mínimos para a construção de um modelo confiável (~25% ID)

Tabela 3. Percentuais de identidade e similaridade entre as seqüências-alvo ($\alpha 4, \beta 1$) e seqüências-molde ($\alpha V, \beta 3$) obtidos usando a matriz BLOSUM62.

	Identidade	Similaridade	Gaps
$\alpha 4 \times \alpha v$	27.9%	45.3%	14.2%
$\beta 1 \times \beta 3$	43%	60%	3%

A identidade seqüencial é a ocorrência de um mesmo aminoácido na mesma posição em seqüências alinhadas. A similaridade seqüencial leva em conta substituições conservativas, ou seja, aminoácidos com características físico-químicas similares, conforme diferentes critérios adotados pelas matrizes de substituição. As regiões de *gap* são espaços abertos entre as seqüências, que não encontram similares na seqüência alinhada.

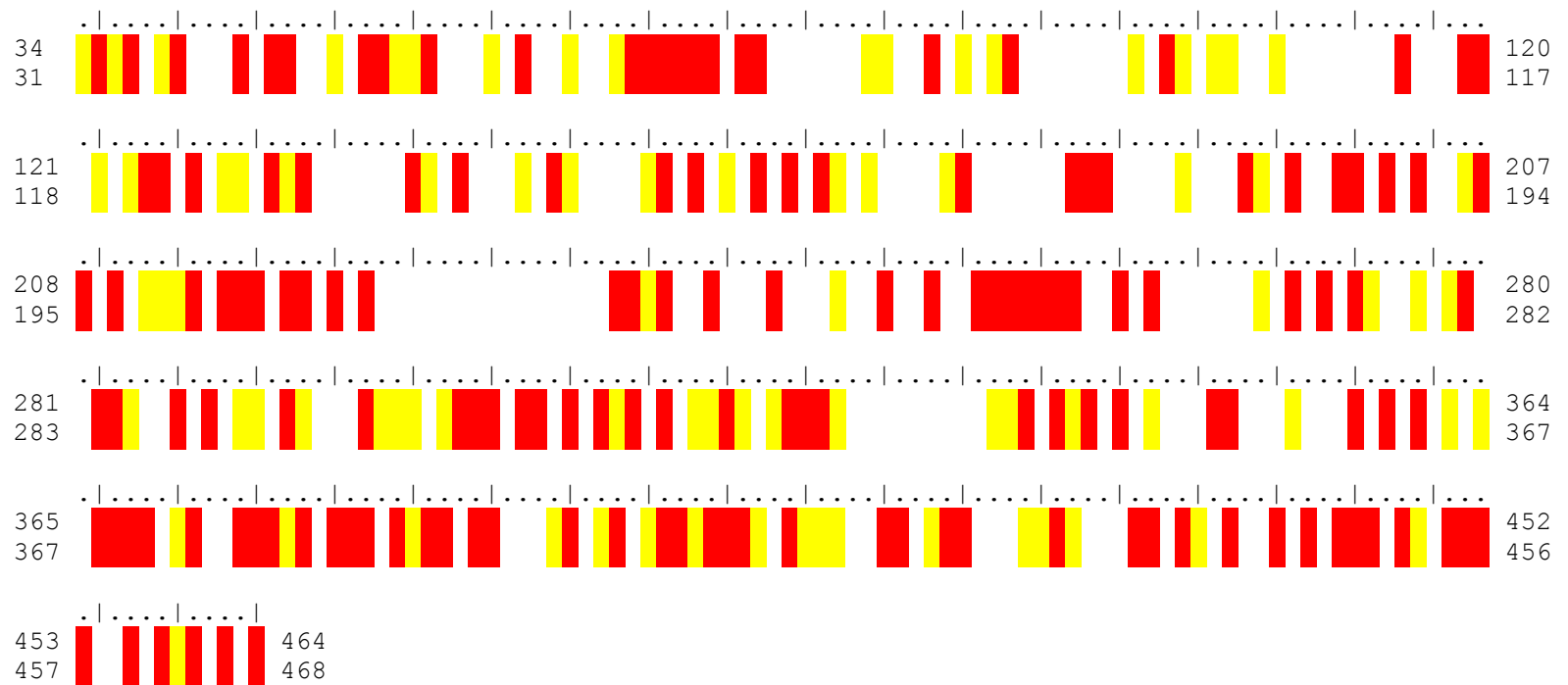


Figura 12 – Alinhamento entre as seqüências correspondentes ao sitio de ligação das subunidades $\alpha 4$ e αV . Os resíduos ressaltados em vermelho assinalam identidade e os amarelos similaridade.

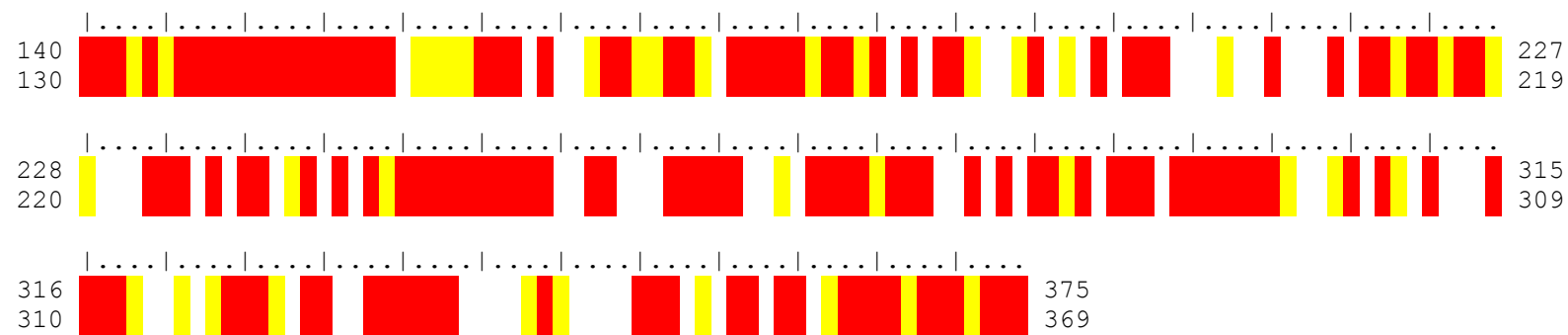


Figura 13 – Alinhamento entre as seqüências correspondentes ao sitio de ligação das subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$. Os resíduos ressaltados em vermelho assinalam identidade e os amarelos similaridade.

Quando considerado somente o sítio de interação entre o ligante e o receptor, que é nosso sítio de interesse, definido pelos aminoácidos 34 a 464 e 140 a 376, das cadeias α e β respectivamente, esses valores melhoram significativamente o que garante uma maior confiabilidade do modelo, ao menos nessa região (tabela 4).

Tabela 4 - Percentuais de identidade e similaridade da região correspondente ao sítio de ligação (β -propeller e β A-domain)

	Identidade	Similaridade	Gaps
$\alpha 4$ x αv	33.5%	51.3%	11.9%
$\beta 1$ x $\beta 3$	55.8%	71.7%	1.7%

Quando calculado o percentual somente na região de interesse, os valores de identidade e similaridade aumentam, indicando que a maioria dos resíduos que não encontra correspondente no alinhamento entre a seqüência inteira se localizam em regiões periféricas à região de ligação.

Após o alinhamento entre as seqüências do $\alpha 4$ e αv , o “escore” calculado foi de 273 e o “valor esperado” foi de 1×10^{-73} , enquanto no alinhamento entre as seqüências $\beta 1$ e $\beta 3$ o “escore” foi de 605 e o “valor esperado” foi de 1×10^{-173} . A significância do escore é confirmada pelo baixo valor esperado, o que elimina a possibilidade de que o alinhamento tenha sido encontrado ao acaso. O escore é calculado através das matrizes de substituição, onde o valor dos aminoácidos alinhados que têm equivalentes nas sequencias comparadas deve ser maior do que o valor obtido pelas substituições.

Na construção dos domínios mais importantes, como o α *β -propeller* e o β *A-domain*, caracterizados em conjunto como sítio de ligação dos ligantes, alguns cuidados foram tomados de maneira a preservar as estruturas secundárias e manter conservadas as posições daqueles aminoácidos responsáveis pela coordenação dos íons imprescindíveis para o processo de ligação (MIDAS, ADMIDAS).

Para algumas regiões de laço do VLA-4 que apresentaram baixa similaridade, quando comparadas com o molde, fizemos outras buscas no BLAST, usando somente

a seqüência correspondente à alça, na tentativa de encontrar modelos mais apropriados. Porém em todas elas, encontramos como resultado sempre o mesmo molde já utilizado (PDB=1L5G).

Inicialmente geramos 30 modelos de cada subunidade e após a construção, selecionamos o melhor modelo de cada uma, levando em consideração o valor da função objetiva, que é bastante eficiente para a seleção e ranking dos modelos construídos (Sali et al., 1995). O valor da função objetiva não é absoluto, já que somente pode ser usado para a comparação de modelos gerados pelo mesmo alinhamento. Devido à complexidade do heterodímero, decidimos que 30 modelos seria uma quantidade aceitável, dado que para outros modelos construídos a partir de estruturas com melhor resolução, o número de modelos construídos é de 20, em média.

As estruturas dos domínios EGF-1 e EGF-2, precariamente definidas no molde, puderam ser reconstruídas utilizando-se as estruturas dos domínios vizinhos EGF-3 e EGF-4, devido à sua considerável similaridade (32,1% ID e 41% similaridade). Essas regiões, por não participarem diretamente da ligação com os ligantes, não foram construídas com grande acurácia, porém sua importância não deve ser descartada, já que certamente participam da transmissão de sinais intra/extracelulares (Arnaout et al., 2005).

As coordenadas dos oito íons Mn^{2+} presentes na estrutura-molde foram conservadas também no modelo, porém os átomos foram trocados por Mg^{2+} , já que os programas utilizados neste trabalho não estão parametrizados para lidar com átomos de Mn^{2+} . Dado que os aminoácidos da região MIDAS, envolvidos na sua coordenação, são idênticos entre o alvo e o molde, pudemos manter as mesmas coordenadas, embora somente sete estejam presentes no sítio de ligação (três no $\beta 1$ e quatro no $\alpha 4$).

Após a inserção dos íons, o próximo passo foi realizar uma minimização de energia de 1000 passos com o algoritmo de Máximo Declive, de modo a acomodá-los em posições energeticamente mais favoráveis.

O motivo MIDAS se repete em todas as integrinas descritas, sendo bastante conservado evolutivamente. Na integrina VLA-4, os resíduos que compõem o motivo MIDAS são os seguintes: D150, L151, S152, Y153, S154, E249, D279 (figuras 14 e 15).

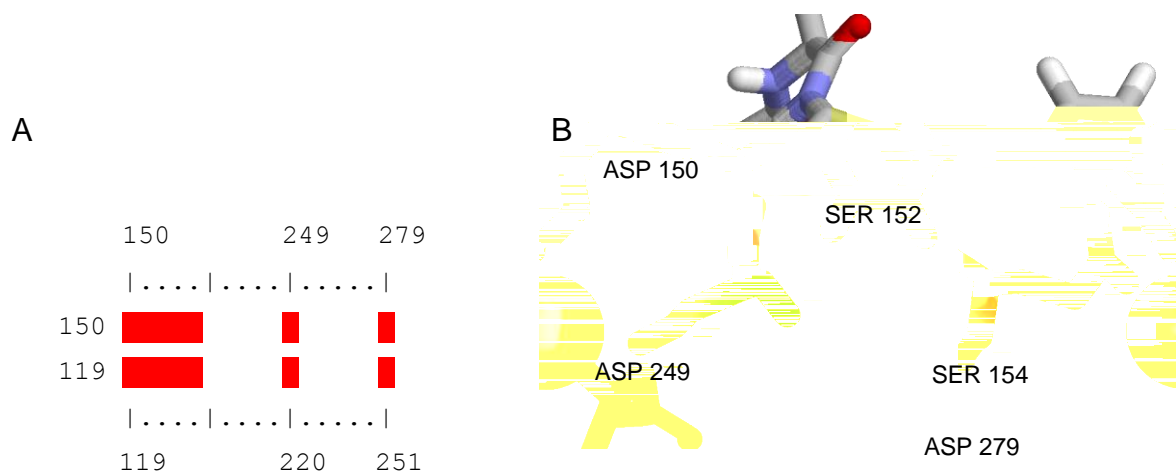


Figura 14 – A) Destaque do alinhamento da região MIDAS, mostrando que não há alterações entre as duas seqüências. B) Região que circunda o íon Mg^{2+} com os aminoácidos D150, L151, S152, Y153, S154, E249, D279, envolvidos em sua coordenação.

Dessa maneira, foi possível construir toda a estrutura de superfície do VLA-4 utilizando conjuntamente as coordenadas do $\alpha V\beta 3$ e também dos domínios separadamente. A figura 16 mostra a estrutura tridimensional do heterodímero VLA-4.

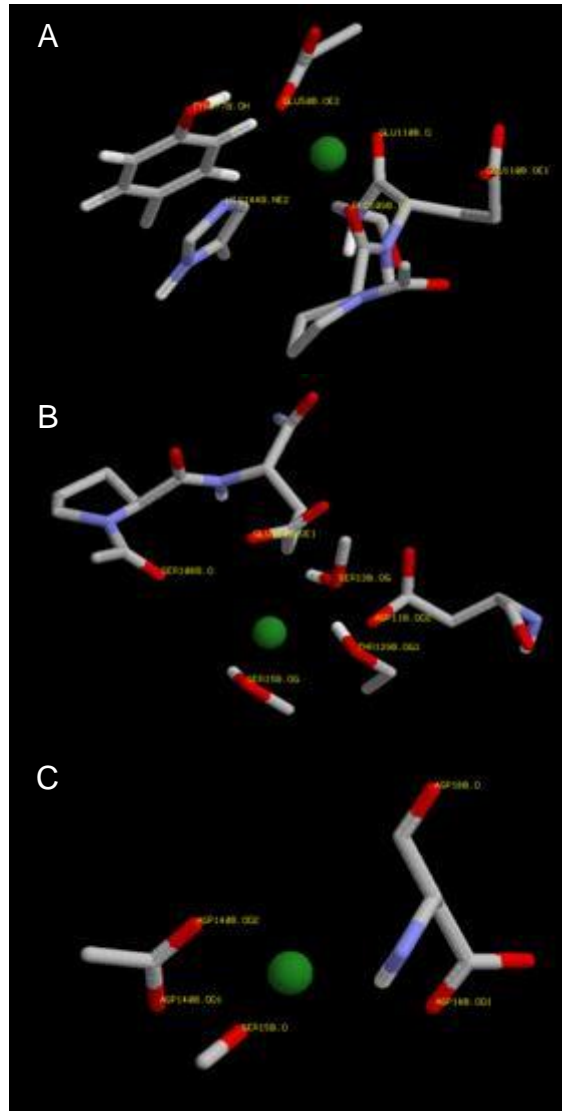


Figura 15 - Detalhe do entorno dos íons Mg^{2+} presentes no sítio de ligação. A) Primeiro íon, coordenado pelo motivo LIMBS, que parece ter o seu entorno já comprometido com outros aminoácidos que o coordenam: OE1 e OE2 – GLU169, OE1 e OE2 - GLU249, NE2 - HIS283, O - PRO248. B) Entorno do íon coordenado pelo motivo MIDAS, descrito na literatura como o íon participante da interação com os ligantes. C) Íon coordenado pelo motivo ADMIDAS.

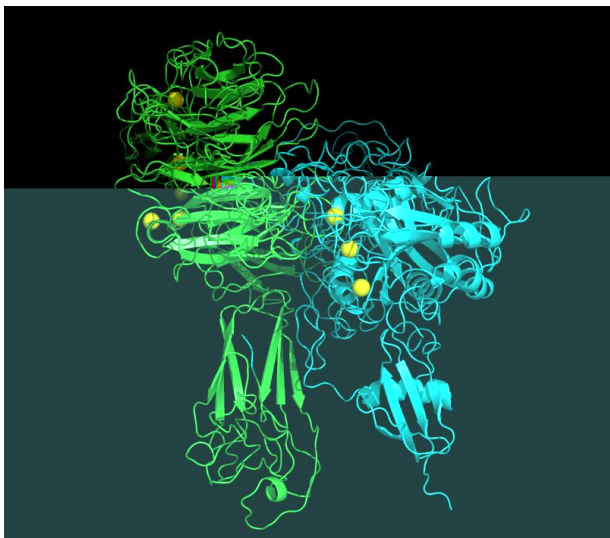
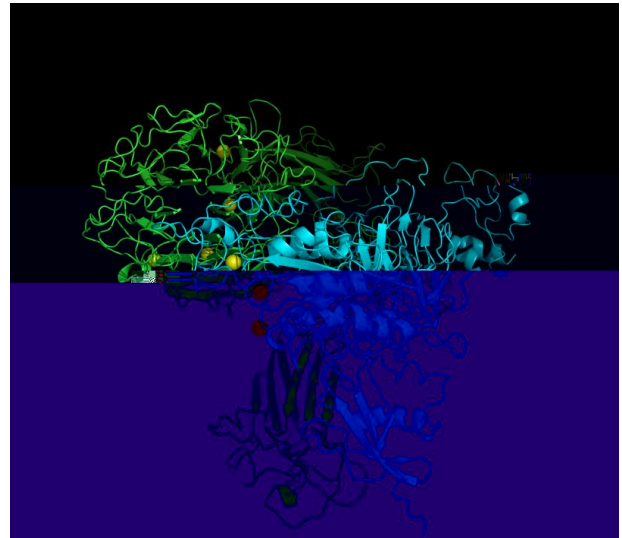
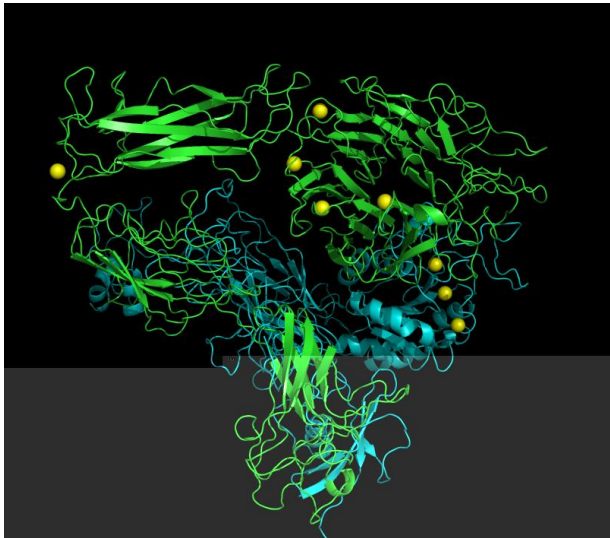


Figura 16 Modelo do VLA-4. A) Visão do heterodímero a partir da subunidade α . B) Visão do heterodímero a partir da subunidade β . Figura C) Visão lateral, no sentido do dobramento, mostrando o contato próximo entre os monômeros. Figura D) Visão superior. Em verde a subunidade alfa e em ciano

base em estudos estatísticos realizados no Protein Data Bank. Os resultados providos pelo programa PROCHECK (Laskowski et al., 1993a) são detalhados nos chamados gráficos de Ramachandran. As figuras 17-19 mostram a validação do molde e dos modelos pelo PROCHECK.

O modelo tridimensional final gerado do VLA-4 apresenta uma boa qualidade estereoquímica, apresentando um valor do parâmetro G (G -factor) global de -0.36 para a cadeia α e -0.11 para a cadeia β , enquanto valores acima de -0.50 são considerados aceitáveis e valores entre -0.5 e -1.0 são considerados pobres. O valor total do parâmetro G para a estrutura representa uma média cuidadosamente ponderada de todas as análises realizadas pelo PROCHECK, como a combinação dos ângulos ϕ - ψ , χ_1 - χ_2 , comprimento das ligações e ângulos da cadeia principal, dentre outras. Proteínas que apresentam resíduos com valores muito baixos do parâmetro G podem ter problemas com sua estrutura global.

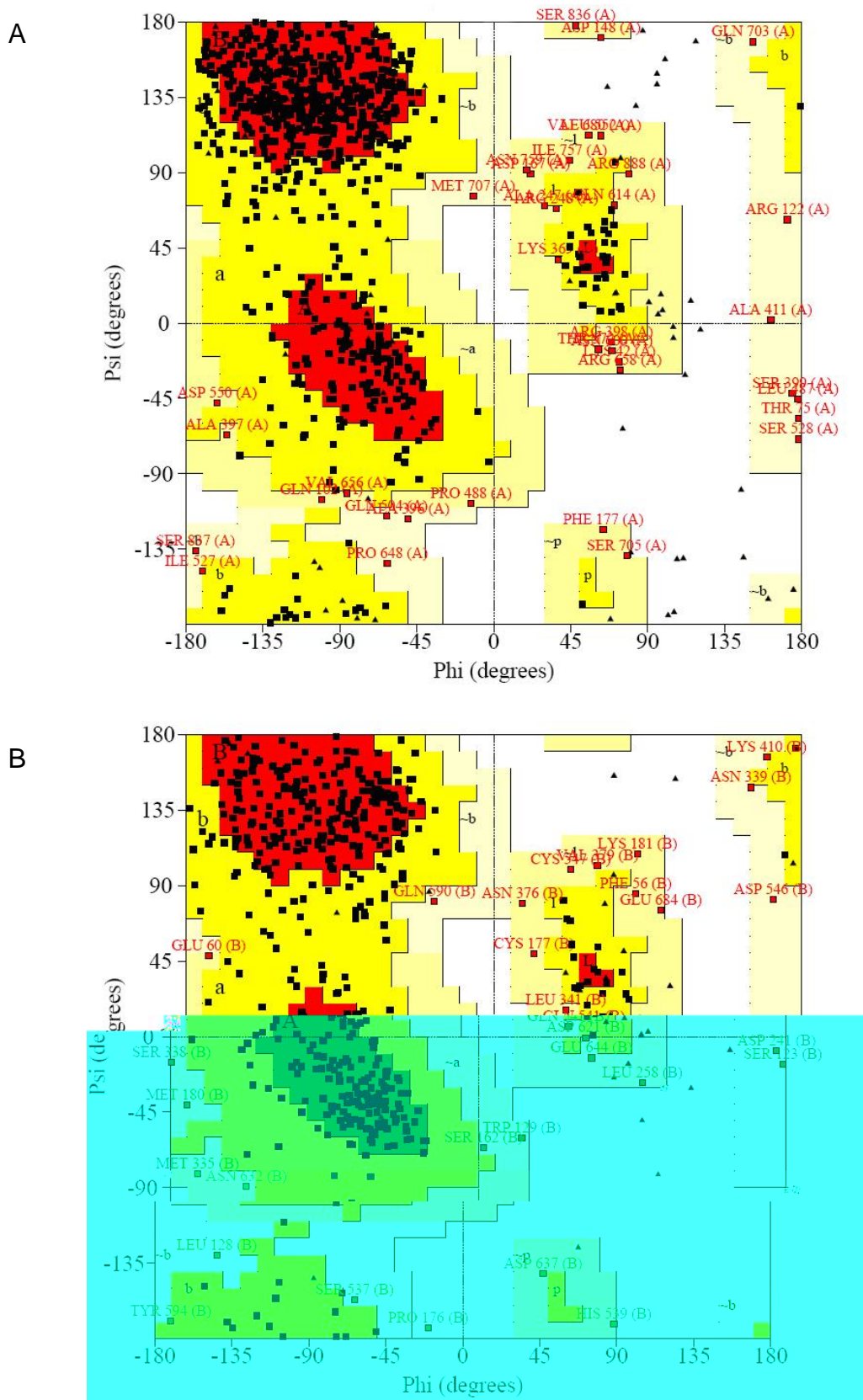
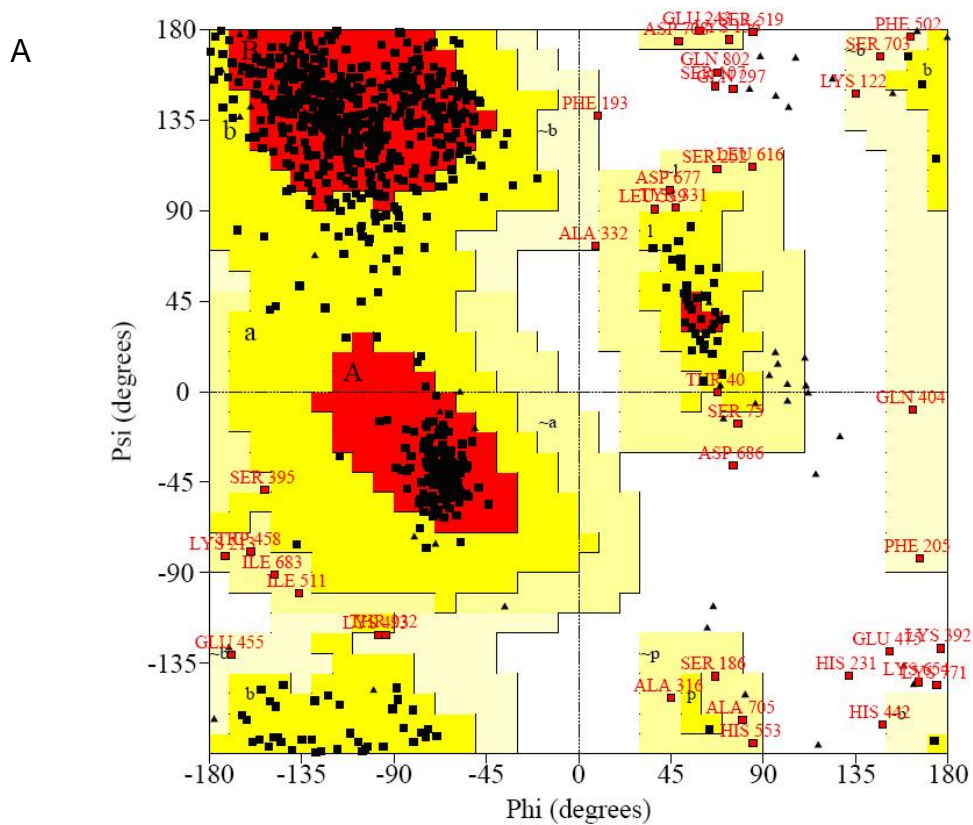


Figura 17 - Gráficos de Ramachandran correspondentes às estruturas completas das cadeias αV (A) e $\beta 3$ (B) usadas como molde. A maior parte dos resíduos de ambas as unidades se encontra em regiões permitidas (717 e 445), enquanto poucos se encontram em regiões menos favoráveis (35 e 30), respectivamente para a unidade α e β e nenhum resíduo se encontra em regiões não permitidas.



B

Figura 18 - Gráficos de Ramachandran correspondentes às estruturas completas das cadeias $\alpha 4$ (A) e $\beta 1$ (B) geradas. A maior parte dos resíduos de ambas as unidades se encontra em regiões permitidas (739 e 571), enquanto poucos se encontram em regiões menos favoráveis (29 e 35) e poucos resíduos (11 e 10) se encontram em regiões não permitidas respectivamente para a unidade α e β .

A

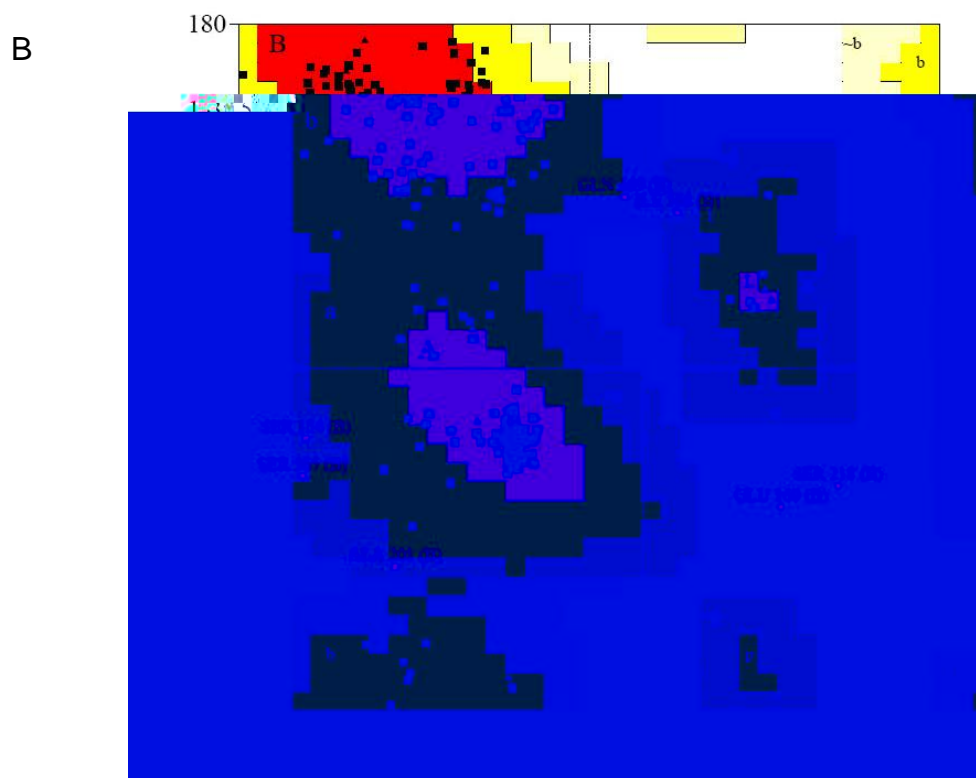


Figura 19 - Gráficos de Ramachandran correspondentes às estruturas do sitio de ligação das cadeias $\alpha 4$ (A) e $\beta 1$ (B) geradas. A maior parte dos resíduos de ambas as unidades se encontra em regiões permitidas (344 e 201), enquanto poucos se encontram em regiões menos favoráveis (16 e 5) e poucos resíduos (4 e 2) se encontram em regiões não permitidas respectivamente para a unidade α e β . Nenhum dos resíduos localizados em regiões não permitidas é relevante para a interação com os ligantes, estando posicionados em regiões distantes do sitio de encaixe.

Conforme a validação feita com o programa VERIFY3D (Luthy et al., 1992), que mede a compatibilidade da estrutura tridimensional com sua seqüência, detectando possíveis erros de enovelamento, 85,42% dos resíduos da unidade α e 85,71% da unidade β tiveram um escore 3D-1D médio maior que 0.2, atestando para uma boa qualidade no enovelamento na região do sitio de ligação.

As análises feitas pelo programa WHATCHECK (Hooft et al., 1996) também atestaram quanto à qualidade estereoquímica, formação de regiões centrais hidrofóbicas, comprimentos de ligações, ângulos diedrais e planaridade dos anéis das cadeias laterais.

Uma consequência do alinhamento manual, utilizado para a otimização da estrutura é a de inevitavelmente ocorrerem conflitos entre as cadeias laterais da proteína construída. Isso ocorre devido a mudanças de tamanho e distribuição de cargas das cadeias laterais. Alguns resíduos se posicionaram fora das regiões permitidas. Optamos por minimizar a estrutura modelada utilizando o algoritmo gradiente conjugado por 30.000 passos, como tentativa de reposicionar esses resíduos em ângulos aceitos. Após a minimização, apenas 4 aminoácidos da subunidade α e 2 da subunidade β estavam em regiões não permitidas.

O RMSD entre o cristal do *-propeller* da subunidade αV e o mesmo domínio da $\alpha 4$ é de 0.75 Å, enquanto entre o domínio A da $\beta 3$ e o domínio A do $\beta 1$ é de 0.57 Å, calculado para os carbonos α , mostrando uma grande semelhança estrutural entre a integrina molde e o modelo construído (Figura 20). Em modelos teóricos gerados por diferentes metodologias, incluindo modelagem comparativa, pode-se aceitar um RMSD de aproximadamente 1Å entre o molde e o modelo. Nossa estrutura apresenta um valor abaixo de 1Å e, portanto, mais confiável, do valor que se pode considerar como um bom resultado (Chothia and Lesk, 1986), utilizando esse parâmetro como referencial. A

grande maioria das estruturas secundárias se mantém conservadas estruturalmente, embora algumas diferenças possam ser observados, correspondendo a regiões de alta flexibilidade. As regiões críticas, como as que circundam os íons, a região SDL e o sítio de ligação se mantêm conservadas.

A região de interesse da integrina VLA-4 utilizada compreende 431 resíduos da subunidade α e 237 da subunidade β e desse total, 48 resíduos da α e 37 da beta estão na interface entre eles, conforme calculado utilizando o servidor PISA - Protein Interfaces, surfaces and assemblies (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) (Krissinel and Henrick, 2005).

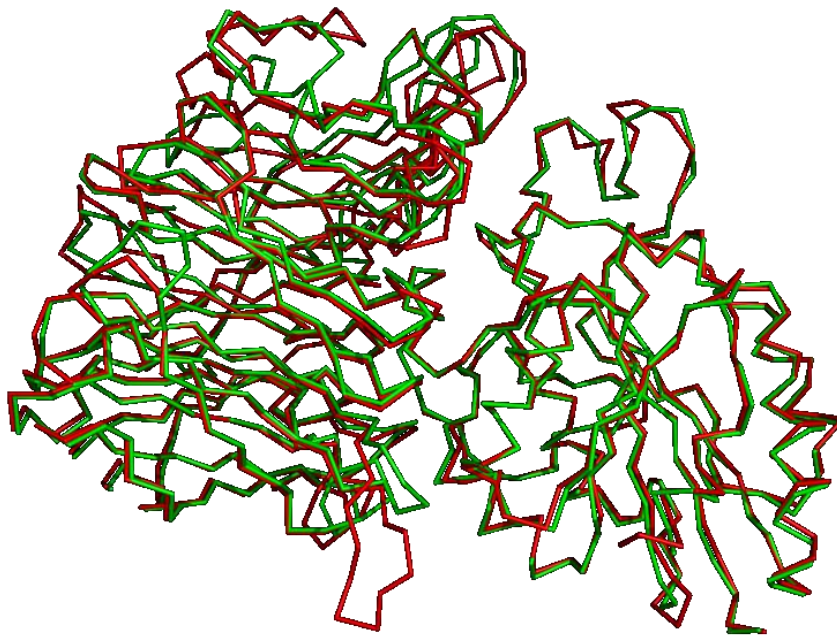


Figura 20 – Sobreposição de estruturas para o cálculo do RMSD entre os sítios de ligação do $\alpha\beta3$ (vermelho) e $\alpha4\beta1$ (verde). O RMSD foi calculado entre o melhor modelo construído após a minimização de energia e as coordenadas do molde utilizado, $\alpha\beta3$. O valor encontrado entre as subunidades α é de 0.75Å e entre as subunidades β é 0.57Å, considerando-se somente os C α .

Conforme análise do modelo gerado, somente três pontes de hidrogênio se fazem presentes entre as cadeias α e β (TYR253A-GLY286B, TYR364A-ALA320,

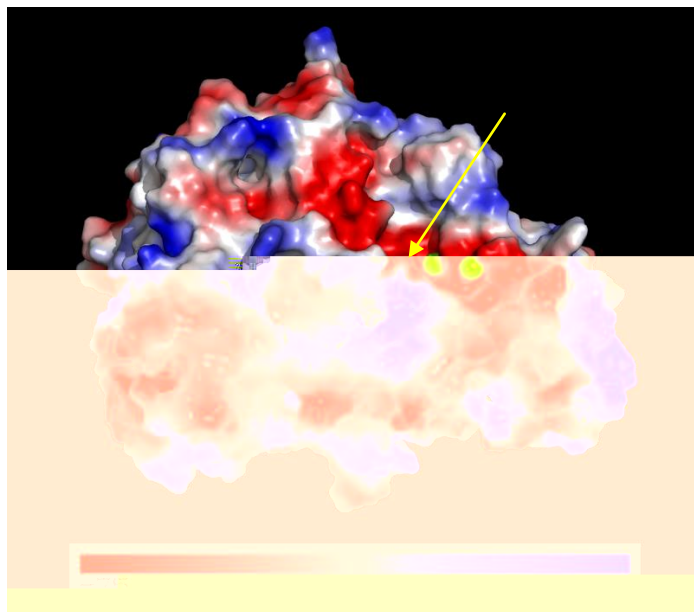
GLU370-LYS289). A área acessível ao solvente é de aproximadamente 29975,9 Å². No entanto, desse total, 2977,1 Å² se encontram na região da interface, em uma região inacessível ao solvente.

A sobreposição das estruturas do modelo e do molde auxilia na verificação de regiões discrepantes entre o molde e o modelo. O RMSD foi calculado entre o melhor modelo construído após a minimização de energia e as coordenadas do molde, $\alpha\beta$. O valor encontrado entre as subunidades α é de 0.75Å e entre as subunidades β é 0.57Å, considerando-se somente os C α (Figura 20). Esses baixos valores indicam uma grande similaridade estrutural entre os sítios de ligação dessas integrinas. Essa observação era esperada, já que, em modelos contruídos por modelagem comparativa, as características estruturais são herdadas da proteína molde.

De modo a observar as possíveis interações complementares aos ligantes, também analisamos o perfil eletrostático dessa região observando que a região que circunda os sítios MIDAS, ADMIDAS e LIMBS é bastante eletronegativa, devido a uma grande concentração de resíduos carregados negativamente nessa região e, necessária para a ligação dos íons Mg²⁺, desempenhando um papel importante nos grupos carregados dos ligantes (figura 21).

Ainda que os ligantes pudessem encaixar em outras regiões da proteína, sabe-se, através de experimentos de mutagênese sitio-dirigida em outras integrinas, que o sitio de ligação se encontra na interface formada entre as duas subunidades e que os

A



B

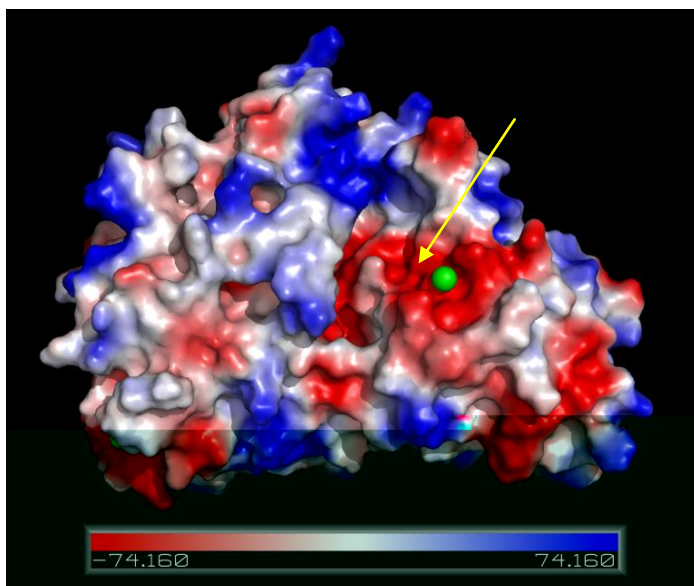


Figura 21 - Perfil eletrostático da região de ligação do molde $\alpha\beta3$ (A) e do modelo $\alpha4\beta1$ (B). Observamos que no perfil do VLA-4 há uma concentração maior de resíduos carregados na fenda formada na interseção entre as subunidades, indicada pelas setas. Posteriormente essa região foi utilizada para o *docking*. Após a minimização de energia o íon coordenado pelo MIDAS se movimentou em direção ao interior da subunidade β e, portanto, não aparece com destaque na figura.

4.2 - Docking Molecular

4.2.1 - Procedimentos

Metodologias teóricas e computacionais podem ser utilizadas para analisar e prever interações entre ligantes e macromoléculas. Tendo em mãos o modelo já

validado e aprovado, demos prosseguimento à análise da interação entre VLA-4 e seus ligantes, utilizando para isso a metodologia de *docking* molecular.

Sabe-se que as integrinas são proteínas dependentes de íons divalentes (Dransfield et al., 1992; Qu and Leahy, 1996; Shimizu et al., 1990). Dessa maneira, mantivemos a região que compreende esses íons e outros resíduos críticos, assim como aqueles envolvidos em sua coordenação como a região principal para o *docking*. Os experimentos de *docking* foram realizados utilizando a região que compreende a extremidade N-terminal de ambas as subunidades (α - β -propeller e β domínio A). Delimitamos a área do sítio de ligação em um cubo de 35Åx55Åx57Å, com uma discretização de 0.25Å para o grid, sendo essa uma região que compreende o sítio de interesse. A discretização corresponde ao espaçamento existente entre cada ponto formado pela matriz que substitui a proteína para o *docking*.

O procedimento de *docking* resultou em 240 modelos possíveis de cada um dos ligantes. A primeira escolha das melhores soluções apresentadas pela metodologia, foi baseada no critério de menor energia potencial do complexo integrina–ligante. Em seguida, separamos todos os 240 resultados obtidos em famílias estruturalmente semelhantes, mantendo um RMSD de 3.5 Å entre os ligantes pertencentes à mesma família como limite máximo para a divisão. O expoente de menor energia de cada família foi escolhido como o elemento representativo do grupo.

Os fármacos testados foram selecionados tendo como base a sua eficácia biológica no tratamento de patologias associadas ao VLA-4, e outras seqüências derivadas de ligantes naturais descritas na literatura cuja utilização é promissora no desenho de antagonistas específicos e seletivos para essa integrina (Pepinsky et al., 2002).

Utilizamos como ligantes fragmentos de moléculas que se ligam fisiologicamente ao VLA-4, fármacos sintetizados com base na sequência ILDV, e ainda uma seqüência utilizada experimentalmente como controle negativo.

O próximo critério estabelecido para selecionar as soluções significativas foi a distância máxima de 4,5 Å entre o íon do motivo MIDAS e qualquer um dos átomos de oxigênio do resíduo ácido dos ligantes RGDf[Me]V, CQIDSPC, ILDV e 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-R.

Inicialmente resolvemos estudar o comportamento de dois desses ligantes no sítio de ligação do VLA-4. Para isso escolhemos os peptídeos cíclicos RGDf[Me]V e CQIDSPC, mantendo fixos os ângulos torcionais da cadeia principal (*backbone*).

4.3 – Ligantes Peptídicos

4.3.1 - CQIDSPC

O receptor de integrina VCAM-1 é expresso normalmente no endotélio vascular e sua interação com o VLA-4 é um dos pilares iniciais do processo de migração linfocitária para a corrente sanguínea. A seqüência TQIDSPL encontra-se especificamente na alça C-D do VCAM-1 e experimentalmente já foi testada sua importância no bloqueio do VLA-4 (Spring et al., 2001). A estrutura obtida por difração de raios-x do VCAM-1 mostra que o tripeptídeo IDS, também reconhecida como uma das seqüências de ligação ao VLA-4, se encontra em uma região altamente exposta ao solvente e se projeta para fora do receptor (Wang et al., 1995), com o resíduo funcional ASP40 no topo dessa região, em uma posição ideal para a interação com a integrina.

Foi mostrado que a seqüência QIDSP linear não apresenta atividade biológica (Jones et al., 1995), sugerindo que para conservar a afinidade, a estrutura espacial desse segmento deva ser estruturalmente o mais próxima possível daquela contida na

região da alça C-D. Os percentuais de inibição obtidos experimentalmente em células Ramos foram $81\pm 3\%$ e $3\pm 3\%$ para o peptídeo cíclico e linear, respectivamente. Com base nessa informação, construímos o peptídeo cíclico CQIDSPQ a partir da estrutura do VCAM-1 (PDB=1VCA), mutando computacionalmente os resíduos das extremidades (T e L) por cisteínas, tentando preservar ao máximo a estrutura dessa alça (figura 22) (Jones et al., 1995).

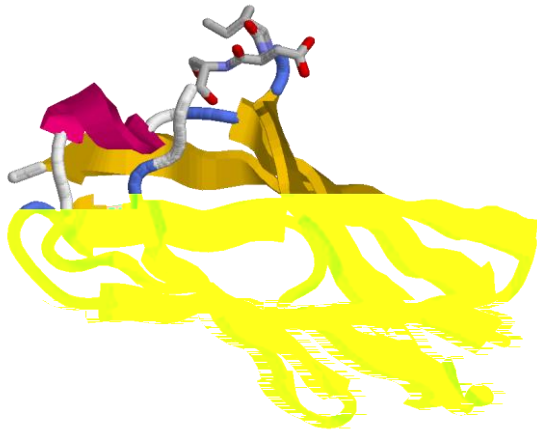


Figura 22 – A) Estrutura obtida por difração de raios-X do segmento do VCAM-1 responsável pela ligação com o VLA-4 (PDB=1VCA). Em destaque, o tripeptídeo responsável pela interação com a

Estudos prévios de dinâmica molecular utilizando esse peptídeo em solução constataram que após a simulação a disposição pentagonal se mostrou mais regular com uma distância aproximadamente igual entre os C α (Xiong et al., 2002). Então, a distorção na sua estrutura em complexo com integrina $\alpha\beta 3$ está aparentemente relacionada à interação com o íon Mn, presente nesse cristal, e os aminoácidos do sítio de ligação do $\alpha\beta 3$. A conformação da cadeia principal desse pentapeptídeo é bastante similar (RMSD=1.25Å) à existente na desintegrina equistatina, um ligante natural de algumas integrinas (Saudek et al., 1991).

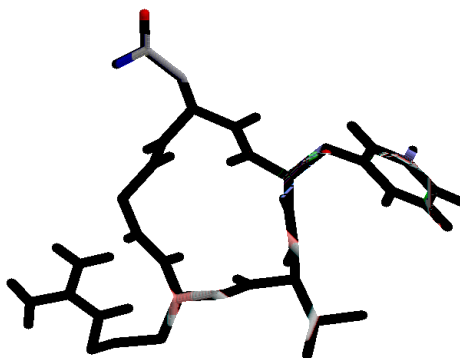


Figura 23 - Estrutura tridimensional do ligante RGDf[Me]V, usado como controle negativo para os experimentos de docking. A estrutura desse pseudo-peptídeo foi obtida experimentalmente, complexado à estrutura da integrina $\alpha\beta 3$.

A figura 24 mostra os valores de energia potencial e energia de interação das famílias dos ligantes CQIDSPC e RGDf[Me]V, obtidas com o programa DOCKTHOR (Júnior and Dardenne, 2005). As setas indicam soluções aceitas, conforme os critérios adotados para os ligantes com o aspartato na sua composição. A primeira família aceita de RGDf[Me]V aparece somente no 10^o grupo de soluções, mostrando que outras soluções de menor energia foram encontradas, porém sem cumprir a condição de coordenação do ácido aspártico com o íon da região MIDAS, importante para a ligação. Já no caso do peptídeo CQIDSPC, as soluções que satisfazem as condições de escolha se acham em pontos de energia mais baixos.

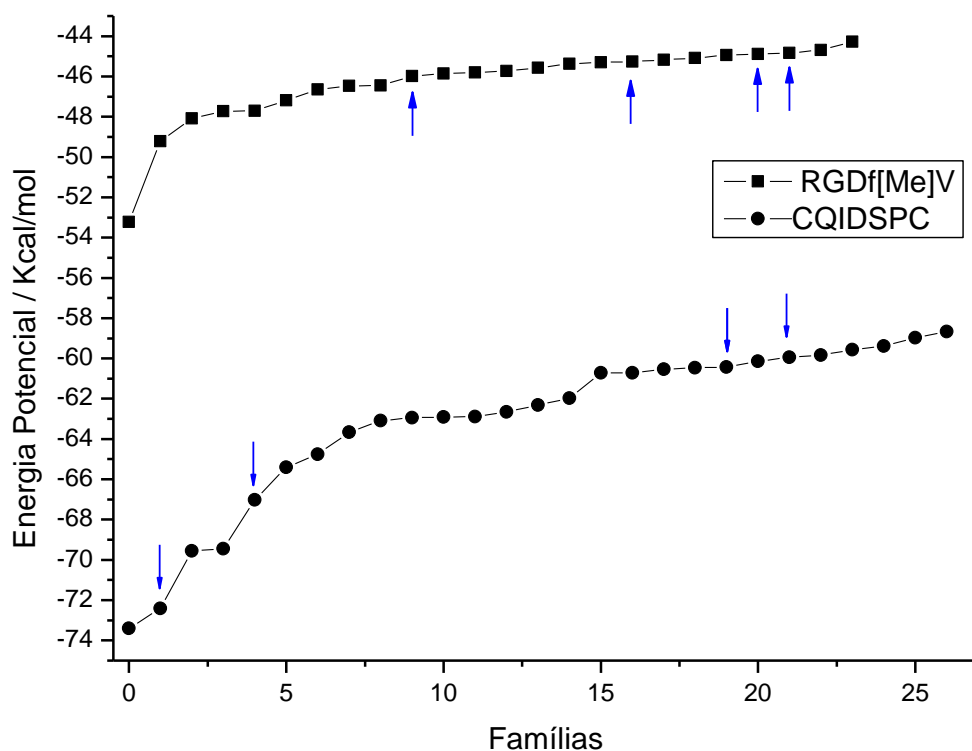


Figura 24 – Valores de energia potencial para os ligantes RGDF[ME]V e CQIDSPC. As setas indicam as famílias que apresentam soluções aceitas, conforme os critérios adotados. A energia do peptídeo CQIDSPC apresenta valores mais favoráveis e indicam a preferência desse ligante em relação ao RGDF[Me]V.

Os resultados correspondentes às soluções de menor energia das famílias aceitas são mostrados na tabela 5.

Tabela 5 – Energia potencial e energia de interação para os dois ligantes, RGDF[ME]V e CQIDSPC, considerando os menores valores.

	Energia Potencial / kcal mol ⁻¹	Energia de Interação/ kcal mol ⁻¹	RMSD / Å *
RGDF[Me]V	-53,2	-65,4	2.11
CQIDSPC	-73,4	-71,3	1.08

*Na quarta coluna o RMSD calculado entre a solução de menor energia potencial e a de menor energia de interação.

O ligante CQIDSPC relacionado com a seqüência do VCAM apresenta valores de energia mais favoráveis que o RGDF[Me]V, tanto para a energia potencial como de interação molecular. Notamos a formação de uma ponte de hidrogênio entre o HE2-

GLN do ligante e O-VAL245 da cadeia alfa, além de outras três entre o ligante e a cadeia beta (O-CYS7 do ligante- OD1-ASP157B, N-CYS1 do ligante-OE1-GLU340B, O-GLN2 do ligante-HG-SER247B), concomitantemente à forte interação eletrostática entre o ASP do QIDS e o íon pertencente ao MIDAS.

No caso do ligante RGDf[Me]V, observa-se somente uma forte interação eletrostática entre o átomo OD2 do ASP com o íon de Mg⁺² localizado no MIDAS da subunidade β 1. Esse mesmo ligante, quando ligado ao α v β 3, além de interagir com as duas subunidades, ligando o aspartato ao íon do MIDAS, forma pelo menos duas pontes de hidrogênio com resíduos na cadeia alfa, tais como NH1:ARG-OD2:ASP150 e NH2:ARG-OD2:ASP216. Essas interações se perdem no caso do VLA-4, devido a substituições ocorridas por outros aminoácidos.

As energias de interação são -71.3 Kcal/mol e -65.4 Kcal/mol, enquanto a distância entre o oxigênio do aspartato ao íon Mg²⁺ foi de 2.25Å e 2.66Å, respectivamente para os ligantes RGDf[Me]V e CQIDSPC (figuras 25-27). Essa diferença de energias de interação entre as soluções poderia explicar a diferença de afinidades entre ambos ligantes.

A ligação favorável do ligante RGDf[Me]V ao α v β 3 e desfavorável ao VLA-4 pode ser explicada por alterações presentes no sitio de ligação do α v β 3 e que são substituídos por outros dois com características físico-químicas distintas: o ASP150, presente na subunidade α V é substituído, na posição equivalente na α 4, pelo aminoácido PHE158 e o aminoácido GLN180 da α V é substituído pelo aminoácido THR189 na α 4. A energia de interação desse ligante, com o sitio de ligação da integrina α v β 3 é de -80.014 Kcal/mol, confirmando a sua preferência por esse ligante. A cadeia lateral da ARG, presente no tripeptídeo RGD forma duas pontes de hidrogênio com a subunidade α , ligando esses dois aminoácidos específicos (Xiong et al., 2002).

A alteração desses dois aminoácidos descritos pode ser importante para a seletividade de ligantes do VLA-4.

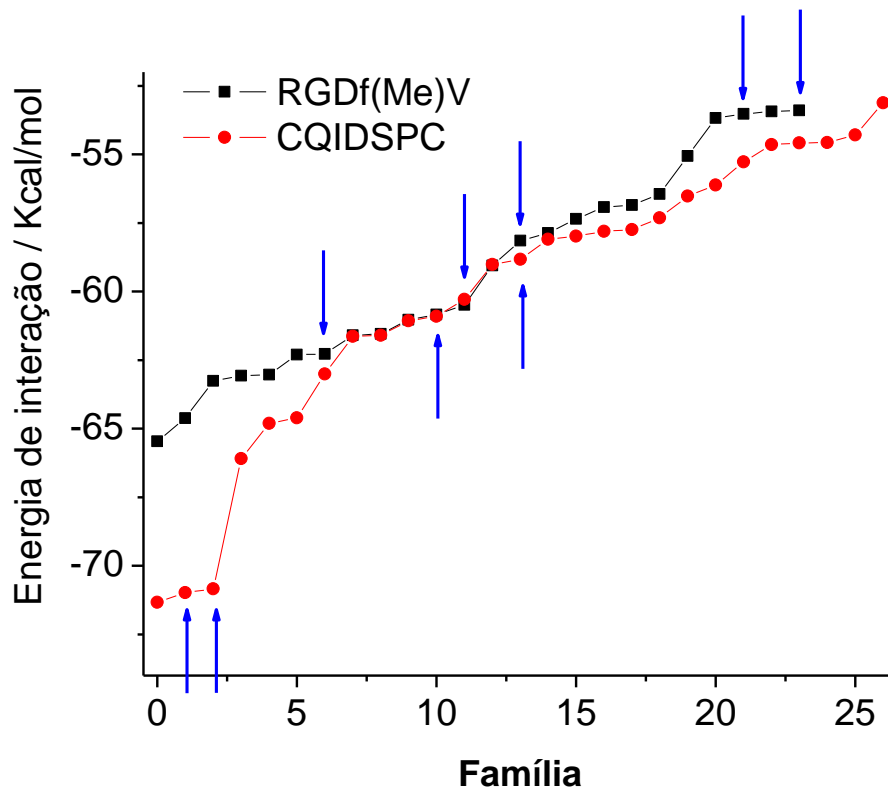


Figura 25 – Valores de energia de interação para os ligantes RGDf[Me]V e CQIDSPC no sítio de ligação do $\alpha v\beta 3$. As setas indicam as famílias que apresentam soluções aceitas, conforme os critérios adotados. A energia do peptídeo CQIDSPC apresenta valores mais favoráveis e indicam a preferência desse ligante em relação ao RGDf[Me]V.

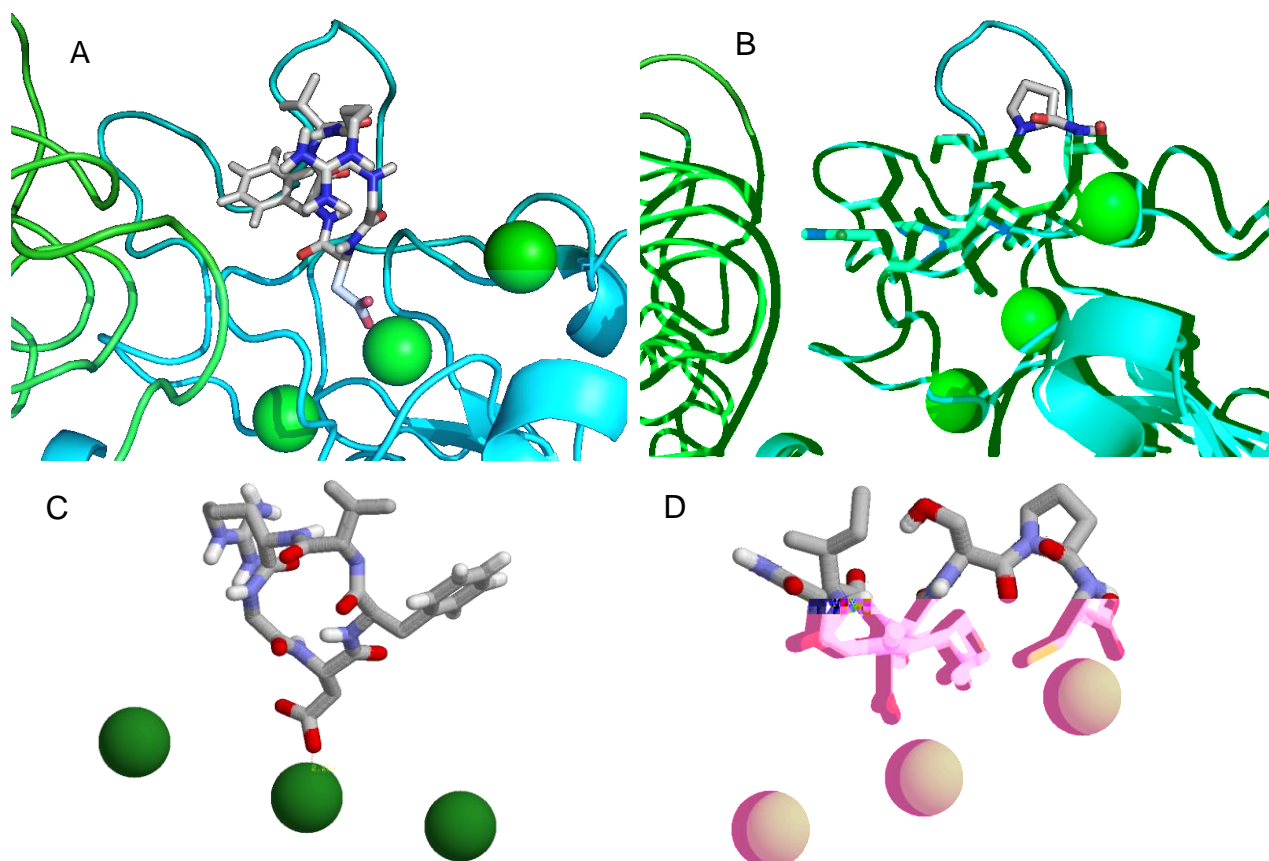
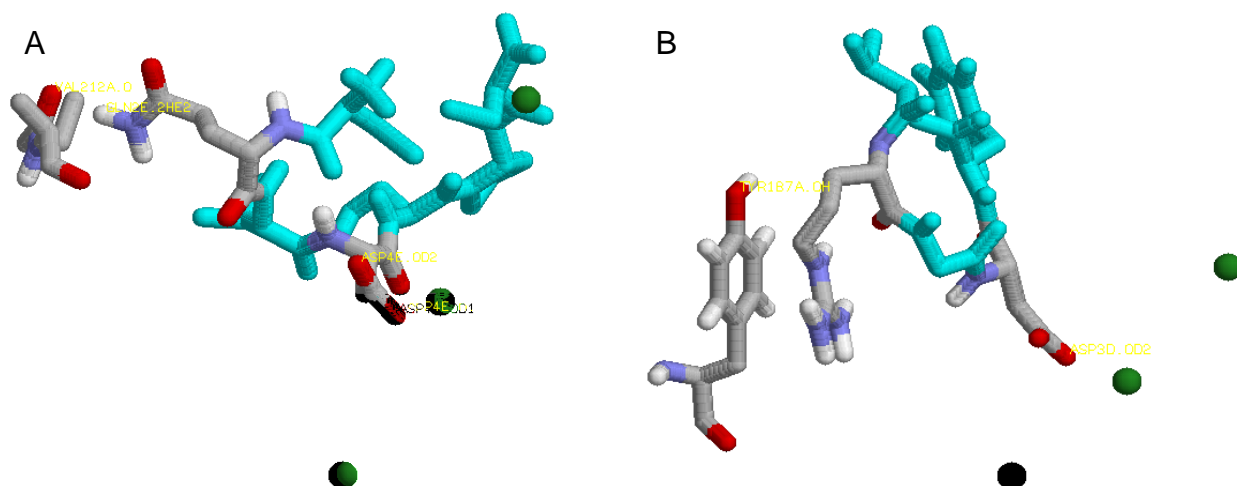


Figura 26 - Posicionamento dos ligantes RGDf[ME]V (A,C) e CQIDSPC (B,D) em suas melhores configurações no sitio de ligação do $\alpha 4\beta 1$. Observa-se o importante papel dos íons intermediando o encaixe dos ligantes. Em ambos, o aspartato do aminoácido ASP se posiciona direcionado para o íon coordenado pelo MIDAS.



Energia de Interação do peptídeo CQIDSPC:
-72,4 Kcal / mol

Energia de Interação do peptídeo RGDf[ME]V:
-45.9 Kcal / mol

Figura 27 – Estruturas para o cálculo de energia de interação de ambos os ligantes, considerando a melhor solução aceita dos ligantes CQIDSPC (A) e RGDf[ME]V (B).

Os valores de energia potencial e de interação do ligante RGDf[Me]V, indicam que essa ligação também é possível. Ainda assim, esses valores, quando comparados aos outros ligantes utilizados, (CQIDSPC, PUPA e derivados), apresentam maiores energias e é, portanto, mais provável que esses últimos ligantes se encaixem no sítio de ligação com conformações estruturais energéticas mais adequadas.

4.3.3 - ILE-LEU-ASP-VAL

O tetrapeptídeo ILDV está presente no domínio CSIII da fibronectina (FN). Como a estrutura desse domínio ainda não é conhecida, suas coordenadas foram construídas utilizando o programa Spdbv (Guex and Peitsch, 1997), com base no domínio QIDS do VCAM-1 (Jones et al., 1995), conforme mostrado na figura 28. Esse peptídeo compartilha um ácido aspártico conservado em relação à seqüência RGD, porém essas duas seqüências não são relacionadas evolutivamente. A seqüência ILDV é homóloga e essencialmente isostérica da seqüência QIDS (Wang et al., 1995). Ao contrário do tripeptídeo RGD, cuja seqüência de aminoácidos é invariável, a seqüência LDV tem variabilidade limitada, em torno de uma seqüência consenso (L/I-D/E-S/T/V) (Curley et al., 1999).

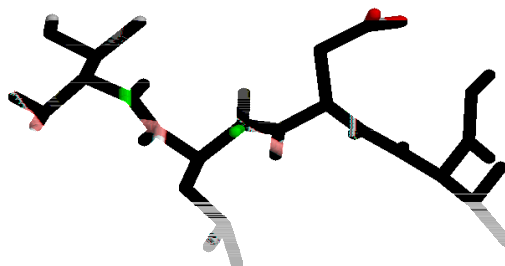
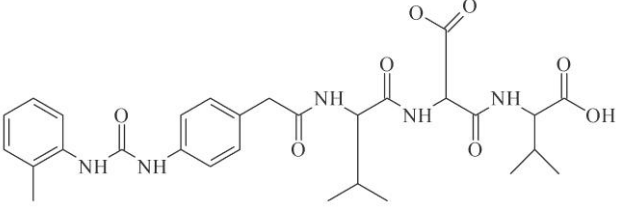
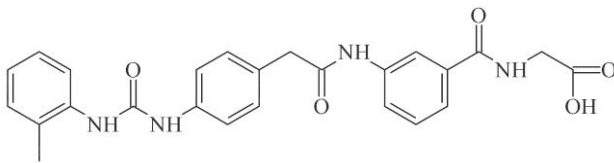
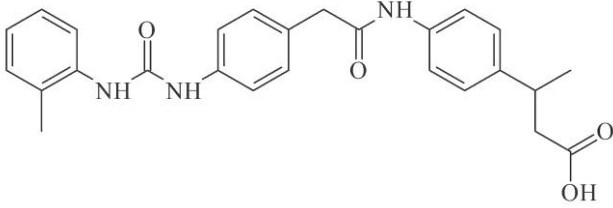
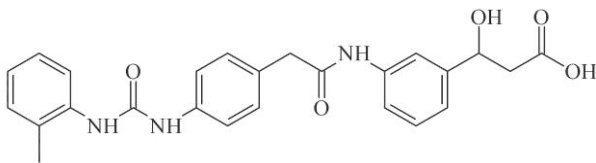
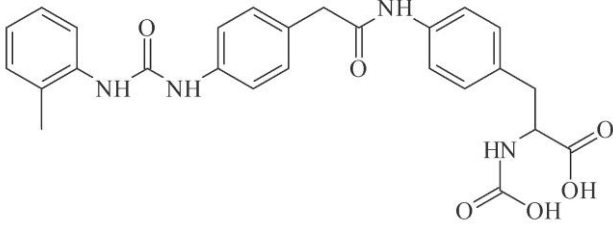
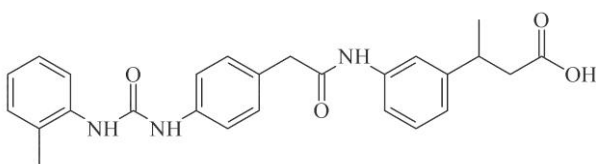
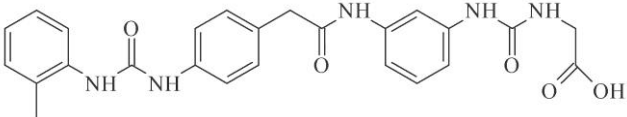
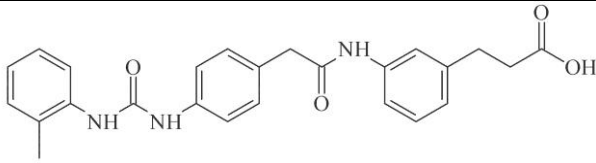
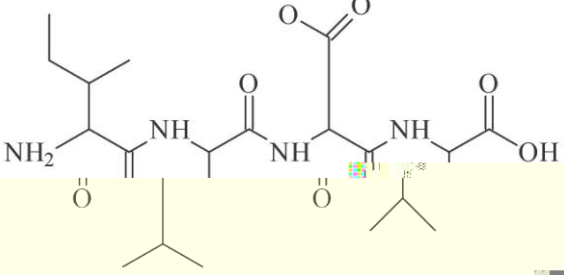


Figura 28 - Peptídeo linear ILDV: As coordenadas desse peptídeo foram criadas sobrepondo e alinhando essa seqüência ao segmento QIDS existente no VCAM-1. A região da fibronectina responsável pela ligação ao VLA-4, contendo essa seqüência, ainda não está resolvida experimentalmente.

4.4 – Ligantes Peptídeo Miméticos

4.4.1 - 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-LDV (PUPA)

 <p>PUPA-LDV: 0.0006</p>	 <p>PUPA-6: 1.2</p>
 <p>PUPA-2: 0.0013</p>	 <p>PUPA-7: 2.0</p>
 <p>PUPA-3: 0.058</p>	 <p>PUPA-9: 2.5</p>
 <p>PUPA-4: 0.067</p>	 <p>PUPA-11: 11.4</p>
	 <p>ILDV: 66</p>
<p>Tabela 6 - Ligantes da família 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-R (PUPA), com os respectivos valores de IC50 obtidos experimentalmente (Singh et al., 2002).</p>	

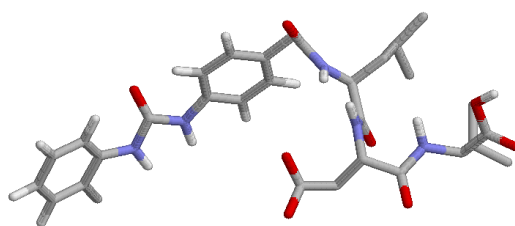


Figura 29 - 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-LDV: A isoleucina presente no peptídeo ILDV é substituída pelo grupamento PUPA, potencializando o efeito biológico. Nos experimentos de *docking* esse ligante mostrou os melhores resultados.

4.4.2 - Ligantes da família 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-R (PUPA)

Os ligantes membros dessa família foram descritos como bons inibidores de VLA-4, e sua eficácia no tratamento de asma foi testada experimentalmente em ovelhas. Suas estruturas foram identificadas através de uma varredura *in silico* em um banco de dados de estruturas moleculares utilizando QSAR (Singh et al., 2002).

Inicialmente, procedemos com o *docking* convencional, admitindo que todos os ângulos passíveis de torções se movimentassem, respeitando os limites estabelecidos. A partir dessa abordagem, os resultados não reproduziram o mesmo comportamento obtido pelos ensaios experimentais de IC50, com exceção do composto original 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-LDV (figura 30), que manteve valores de energia potencial e de interação compatíveis com sua eficácia biológica, em relação aos outros compostos derivados.

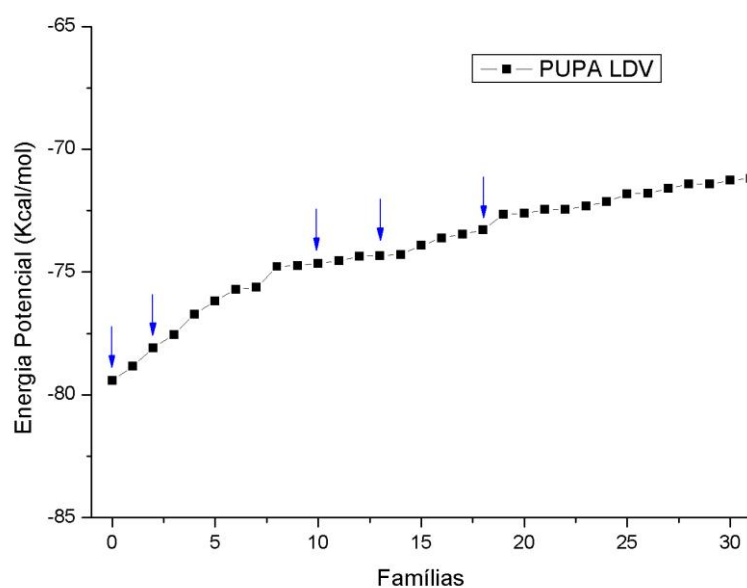
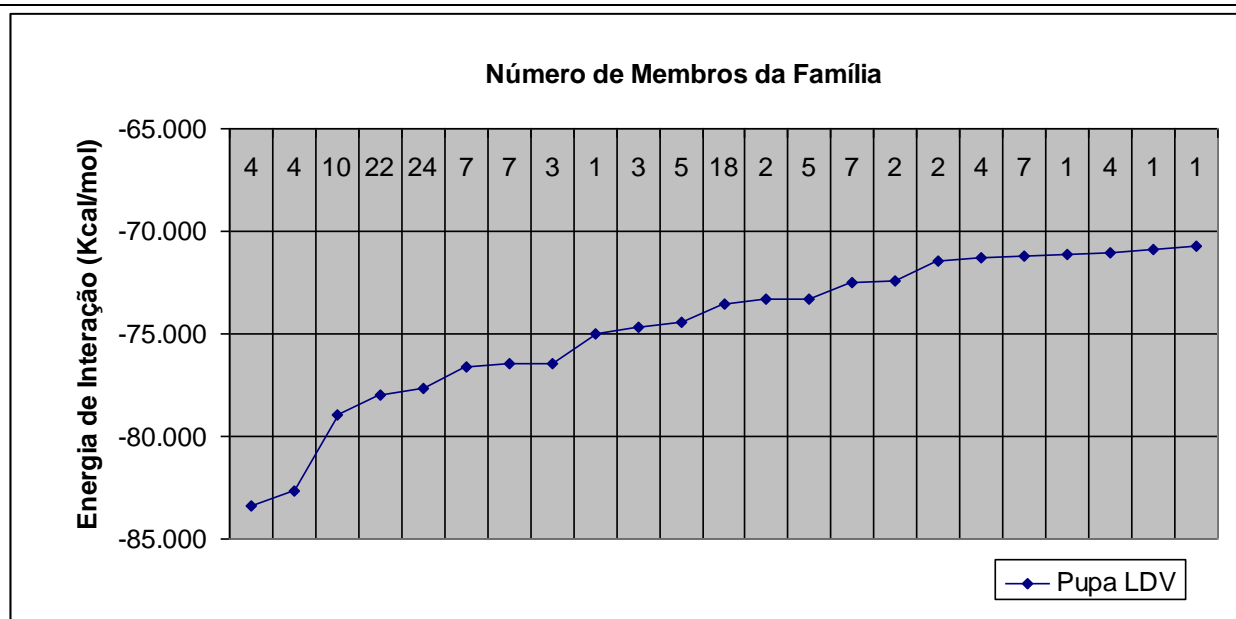


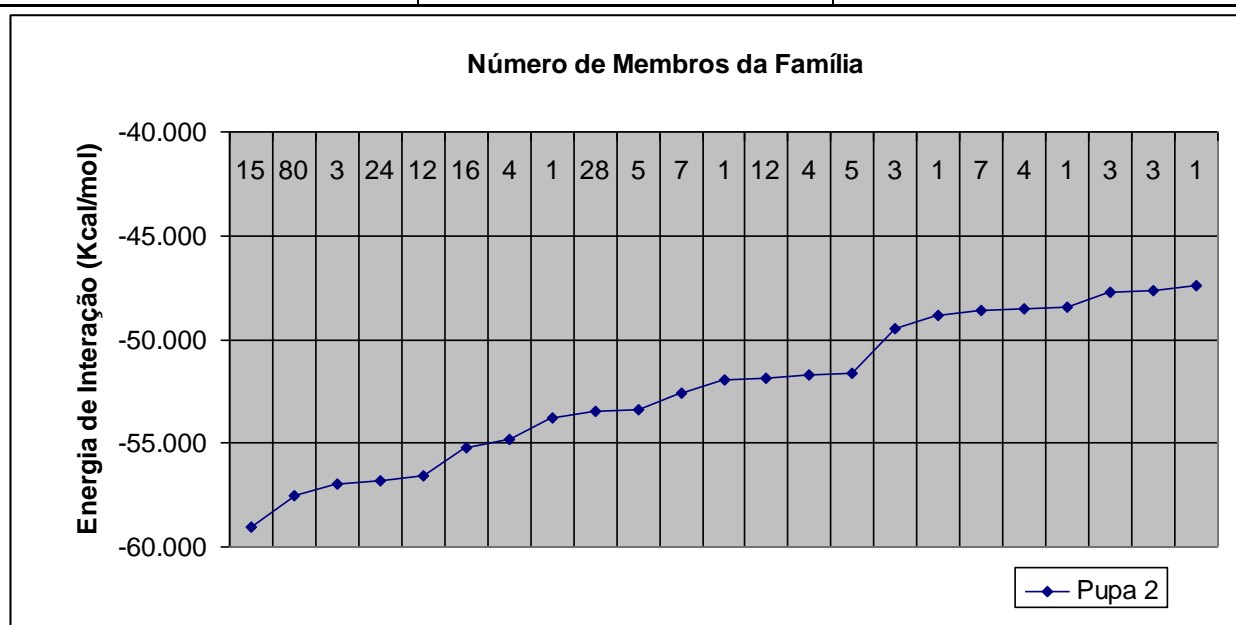
Figura 30 - Valores de energia potencial obtidos pelo programa Dockthor. As setas indicam as famílias com soluções cujo OD1 ou OD2 do aminoácido ASP se encontram até 4.5Å do íon Mg^{2+} coordenado pelo MIDAS.

A seqüência peptídica inicial, ILDV, apresenta atividade biológica comprovada experimentalmente, e ao se adicionar o cap N-terminal, essa atividade é potencializada. A partir dessa estratégia, outros inibidores foram desenhados (Singh et al., 2002), mantendo-se o cap N-terminal e adicionando, como radical, outros grupamentos obtidos a partir de um screening in silico. Os ligantes dessa família, portanto, têm um grupamento químico constante. Baseado nessas informações, a estratégia elaborada foi a de manter esse grupamento restrito espacialmente, preservando as mesmas coordenadas obtidas no melhor resultado aceito do composto original da família (4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-LDV). A partir de então, todos os membros dessa família têm um grupamento constante e restrito no processo de *docking*, com as mesmas coordenadas, variando-se somente o radical adicionado.

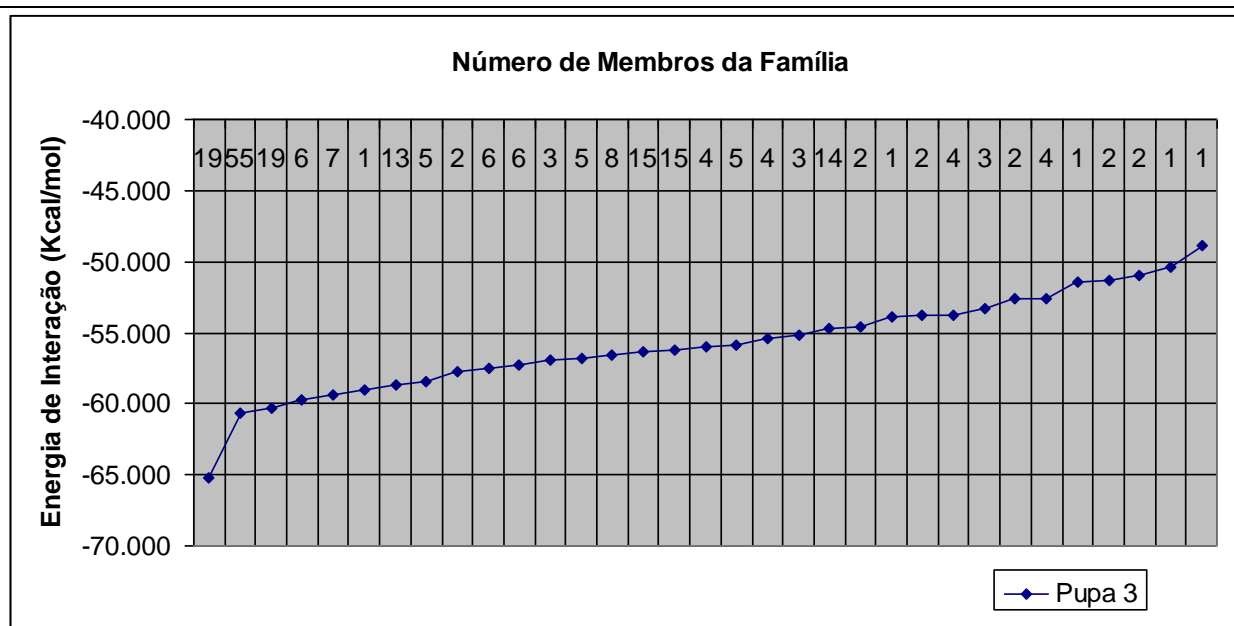
Para os ligantes da família PUPA, o critério mantido foi o valor de energia de interação da molécula. Utilizando então esses critérios, obtivemos os seguintes números de famílias e energias, mostrados abaixo, nas figuras 30-31 e tabela 7:



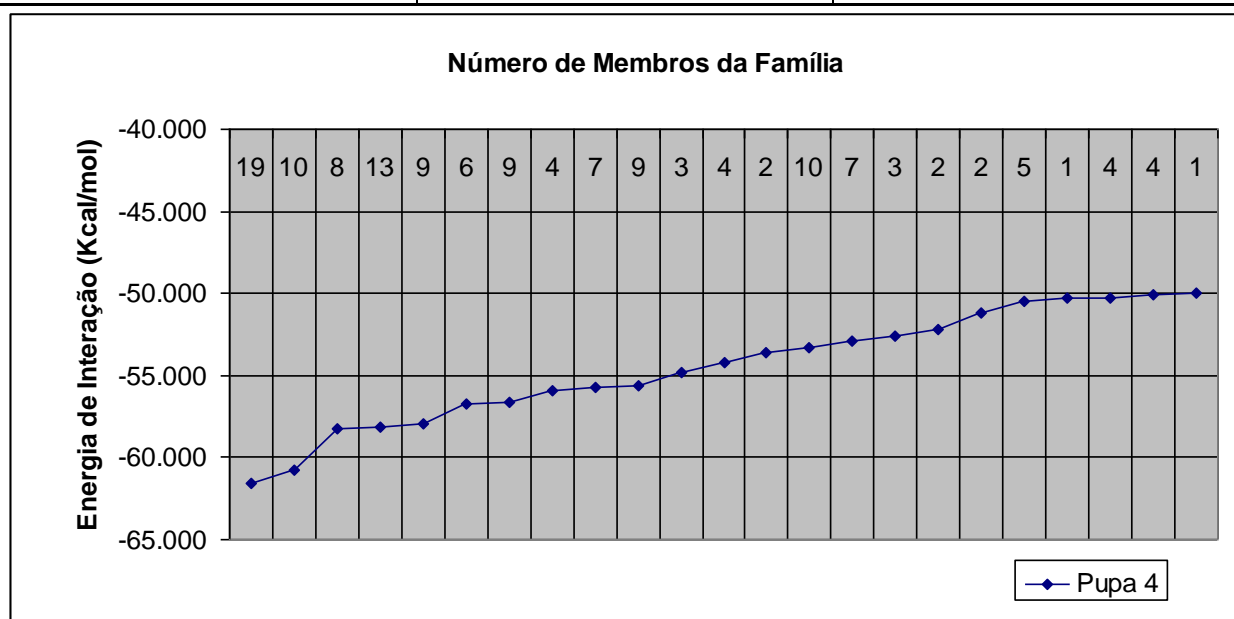
Ligante	Receptor	Interação
Anel 2-metilfenil	PHE195A - NZ	T Stacking
O da carbonila	LYS190A - NZ	Ponte H
Átomo 45 – ASP-OD1	MIDAS	Eletrostática
Átomo 46 – ASP-OD2	MIDAS	Eletrostática
Átomo 46 – ASP OD2	SER152B – OG	Ponte H
Átomo 41	TYR153B - O	Ponte H
Átomo 41	SER154 - OG	Ponte H
Átomo 45	SER154 - OG	Ponte H
Átomo 50	SER247 - OG	Ponte H



Ligante	Receptor	Interação
Anel 2-metilfenil	PHE195A	T Stacking
O da carbonila	LYS190A - NZ	Ponte H
Átomo 47	ADMIDAS	Eletrostática
Átomo 48	ADMIDAS	Eletrostática
Átomo 49	GLU340B - OE1 e OE2	Ponte H

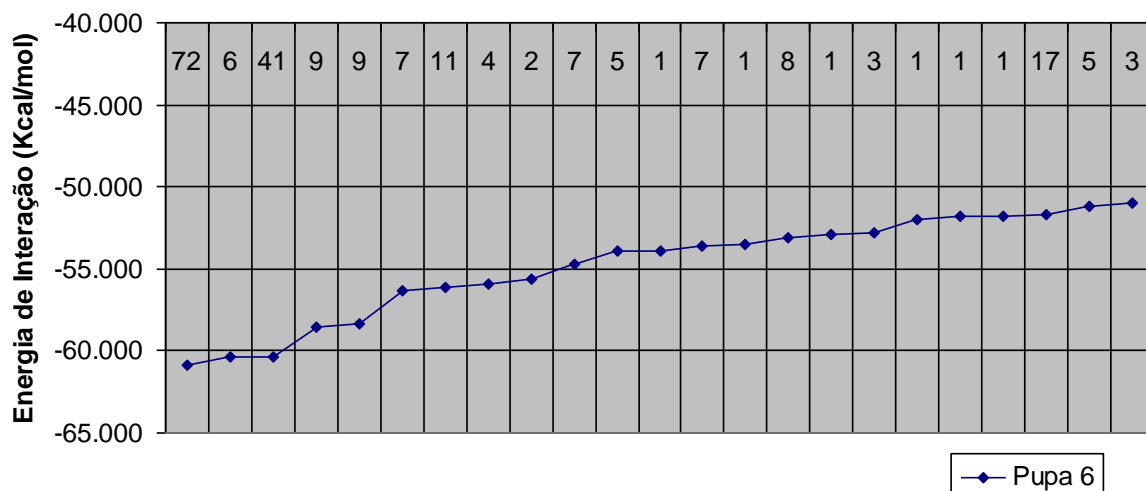


Ligante	Receptor	Interação
Anel 2-metilfenil	PHE195A	T Stacking
O da carbonila	LYS190A - NZ	Ponte H
Átomo 52	ADMIDAS	Eletrostática
Átomo 48	GLU340B - OE1	Ponte H
Átomo 50	GLU340B - OE1	Ponte H



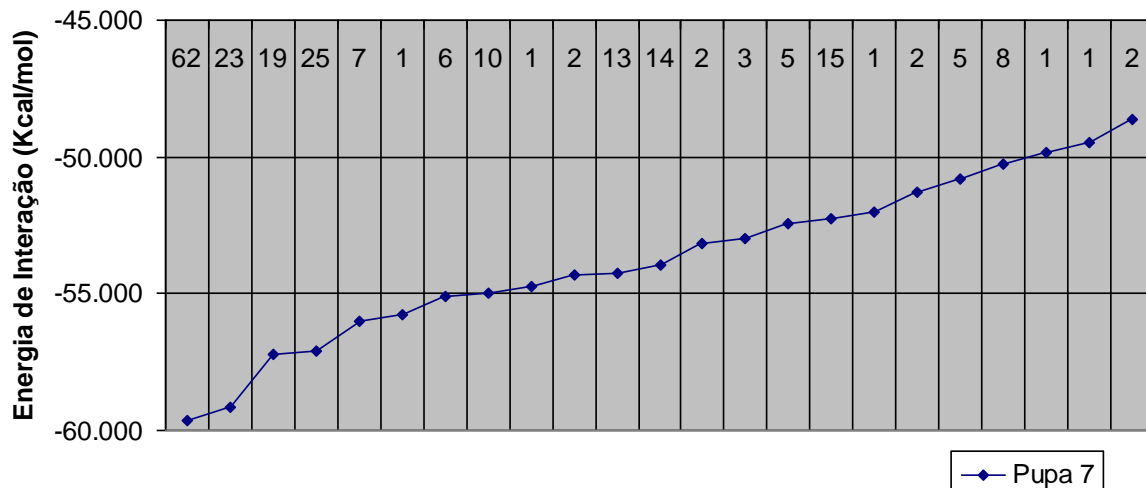
Ligante	Receptor	Interação
Anel 2-metilfenil	PHE195A	T Stacking
O da carbonila	LYS190A - NZ	Ponte H
Átomo 32	TYR153O	Ponte H
Átomo 43	SER154B - OG	Ponte H
Átomo 53	GLU340B - OE2	Ponte H
Átomo 48	ASP279B - OD1	Ponte H
Átomo 52	ADMIDAS	Eletrostática

Número de Membros da Família

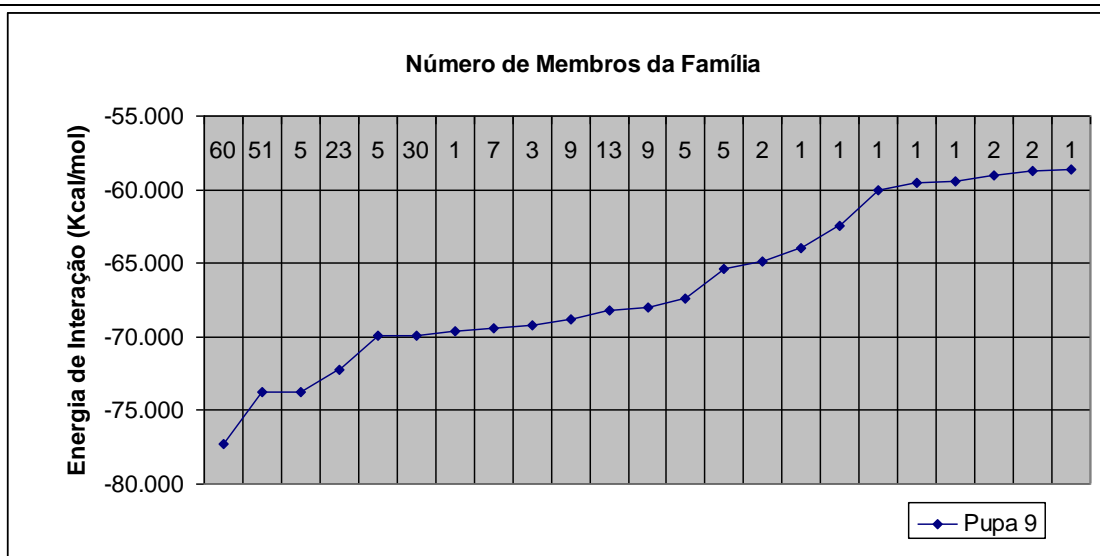


Ligante	Receptor	Interação
Anel 2-metilfenil	PHE195A	T Stacking
O da carbonila	LYS190A - NZ	Ponte H
Átomo 51	ASP279B – OD2	Ponte H
Átomo 44	ADMIDAS	Eletrostática
Átomo 50	ADMIDAS	Eletrostática

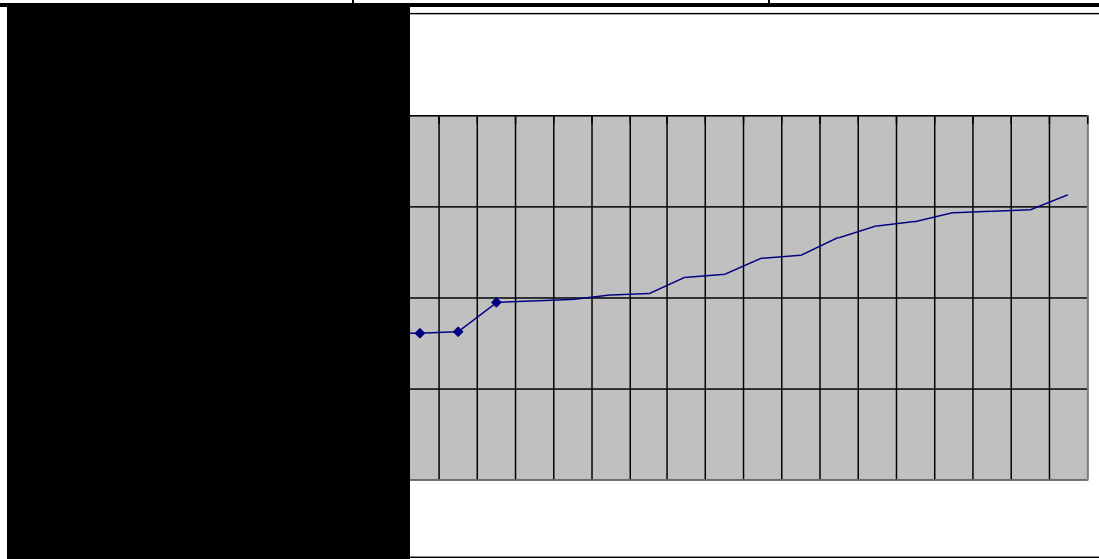
Número de Membros da Família



Ligante	Receptor	Interação
Anel 2-metilfenil	PHE195A	T Stacking
O da carbonila	LYS190A - NZ	Ponte H
Átomo 50	GLU340B – OE1	Ponte H
Átomo 45	SER154B - O	Ponte H
Átomo 44	ADMIDAS	Eletrostática
Átomo 48	ADMIDAS	Eletrostática



Ligante	Receptor	Interação
Anel 2-metilfenil	PHE195A	T Stacking
O da carbonila	LYS190A - NZ	Ponte H
Átomo 49	GLU340B – OE2	Ponte H
Átomo 47	ADMIDAS	Eletrostática
Átomo 48	ADMIDAS	Eletrostática



Ligante	Receptor	Interação
Anel 2-metilfenil	PHE195A	T Stacking
O da carbonila	LYS190A - NZ	Ponte H
Átomo 48	GLU340B – OE2	Ponte H
Átomo 46	ADMIDAS	Eletrostática
Átomo 47	ADMIDAS	Eletrostática

Figura 31 – Variação de energia de interação calculada para todos os ligantes da série PUPA, conforme a classificação em famílias cujos membros apresentam semelhança estrutural em até 3.5Å. Os números na parte superior de cada gráfico mostram o número de membros em cada família. Nas tabelas abaixo de cada gráfico são apresentadas as interações encontradas entre cada um dos ligantes e o receptor VLA-4. Dentre os ligantes dessa série, o PUPA-LDV apresenta as energias mais favoráveis de interação, assim como um maior número de interações com a proteína. A numeração do átomo segue de acordo com a tabela 6.

Utilizando a estratégia de docking parcial, mantendo o grupamento PUPA fixo, os valores de menor energia obtidos são mostrados na tabela 7.

Tabela 7 - Energia potencial e de interação dos ligantes da série PUPA

Ligante	Energia Potencial	Energia de Interação
Pupa LDV	-78.934	-78.086
Pupa 2	-30.388	-39.362
Pupa 3	-29.842	-45.747
Pupa 4	-25.563	-47.809
Pupa 6	-37.426	-48.564
Pupa 7	-38.064	-45.736
Pupa 9	-33.433	-42.909
Pupa 11	-33.110	-41.847

*Energias em Kcal/mol; mantendo-se o grupamento PUPA fixo.

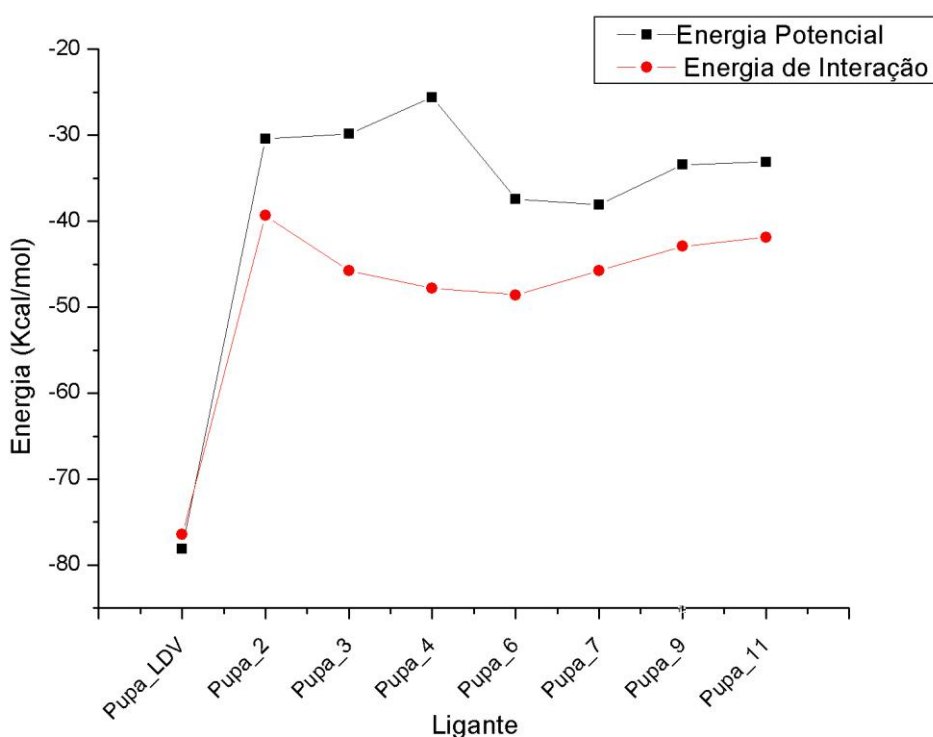


Figura 32 - Valores de energia potencial e de interação obtidos mantendo-se o grupamento PUPA fixo, reproduzindo as mesmas coordenadas do PUPA-LDV nas outras moléculas. O PUPA-LDV mostrou-se como o melhor ligante no docking convencional. Essas melhores energias podem estar relacionadas a presença do resíduo ácido ASP. Quando esse resíduo é removido, ou substituído por outros grupos químicos sem a mesma característica, a energia aumenta drasticamente.

Observamos que utilizando essa estratégia, os valores de energia de interação apresentaram qualitativamente uma melhor correlação com os resultados obtidos pelos experimentos de inibição, exceto para o ligante Pupa 2.

Na análise da interação do ligante PUPA LDV com o receptor VLA-4 (figura 33), observamos um número maior de pontes de hidrogênio (Átomo 41-O:TYR153B, Átomo 46-OG:SER152B, Átomo 41-OG:SER154B, Átomo 45-OG:SER154B, Átomo 50-OG:SER247B, Átomo 15-NZ:LYS190A), quando comparado ao RGDf[ME]V ligado ao VLA-4, concomitante à sua interação com o íon coordenado pelo MIDAS. Esses fatores, em conjunto, proporcionaram uma diminuição na energia de interação e conferiram uma maior estabilidade no complexo VLA-4/ligante.

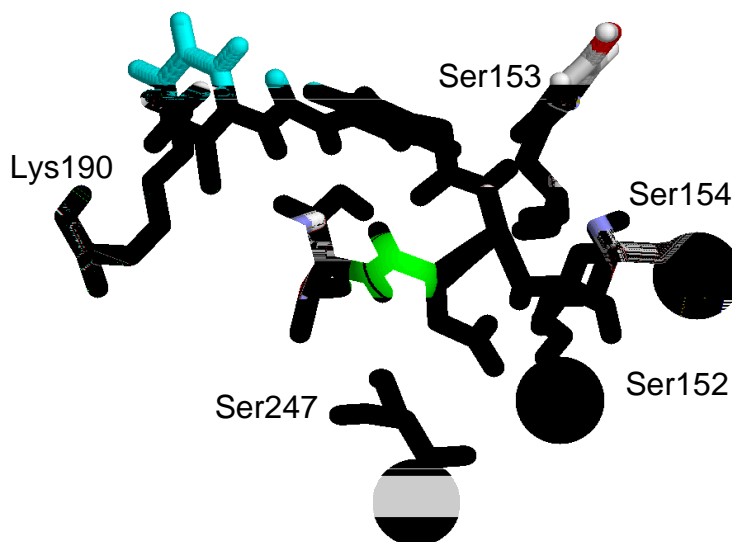
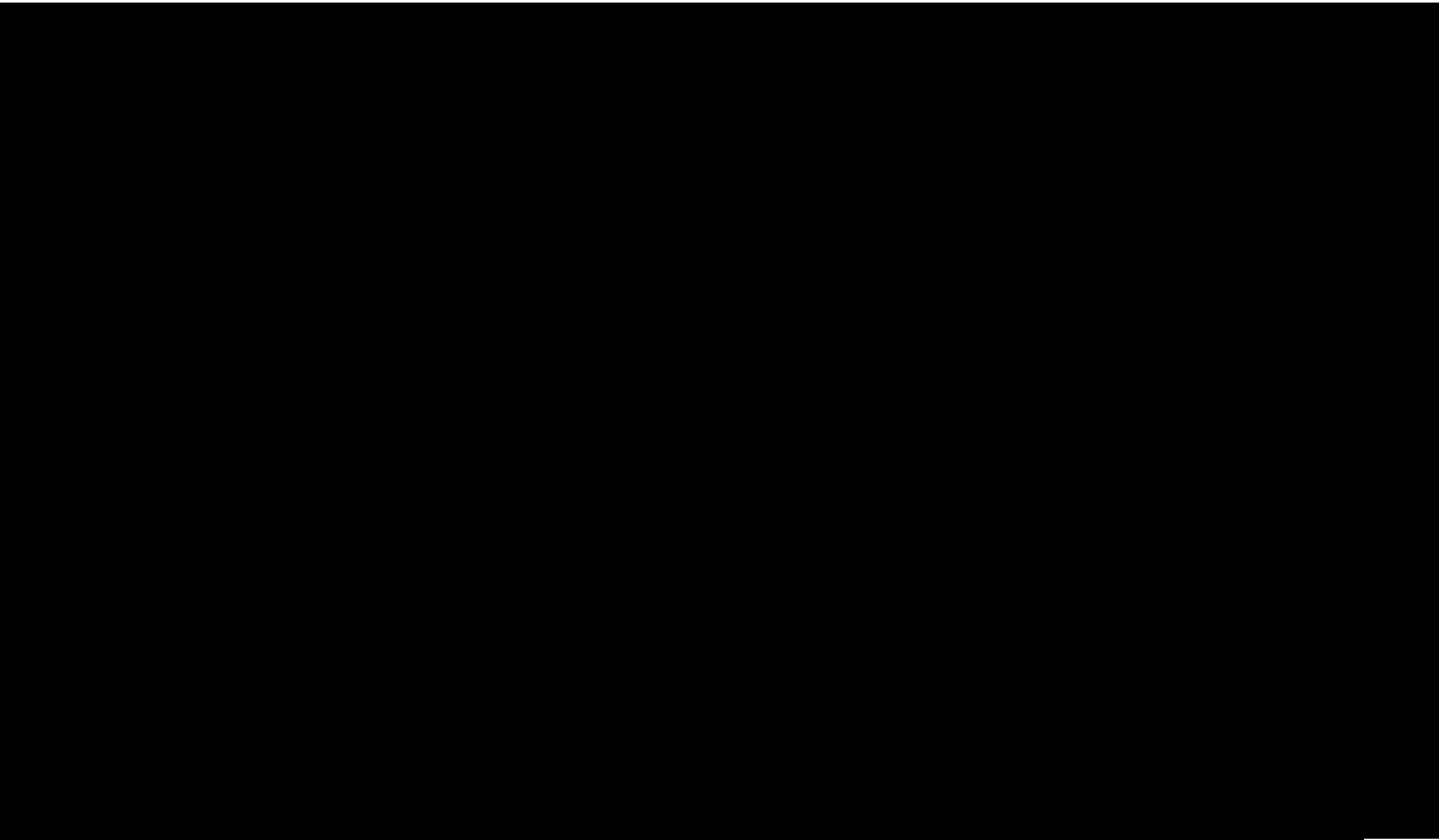
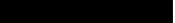
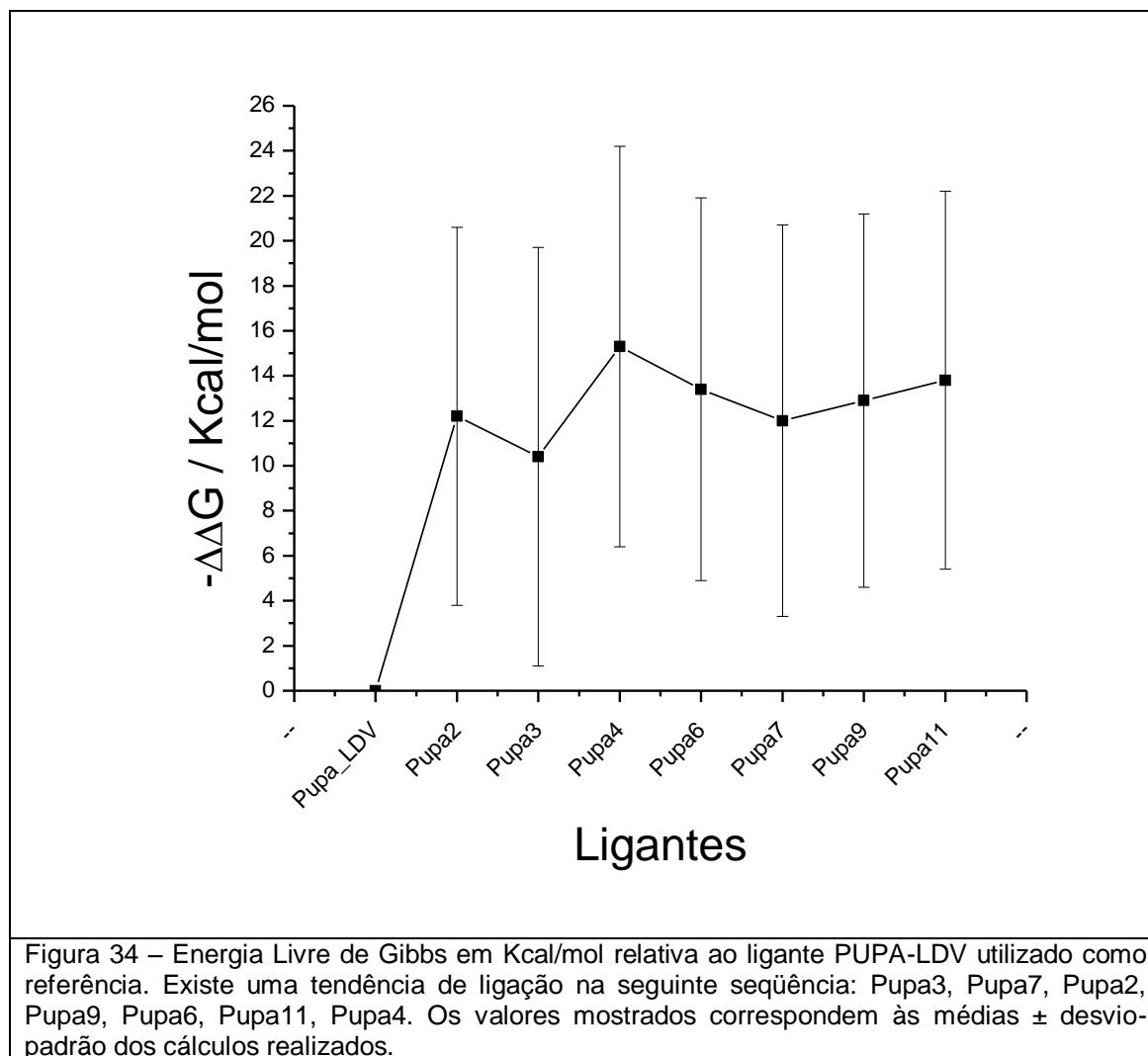


Figura 33 - Pupa LDV no sítio de ligação, mostrando somente os resíduos envolvidos na formação de pontes de hidrogênio entre as subunidades alfa e beta e o ligante. Em ciano o ligante e em verde os íons Mg^{2+} .

As diferenças de ligação entre as moléculas analisadas e a não existência de correlação direta com os resultados experimentais podem ser explicadas pela ausência dos açúcares nos sítios de glicosilação do modelo construído, que mesmo distantes da região da grade, podem atuar durante a ancoragem de proteínas maiores, como a fibronectina, estabilizando a interação. Como estudado em modelo murino, ocorrem mudanças na expressão, estado de glicosilação e função durante a ontogenia das

células T (Wadsworth et al., 1993)





4.5 - Ligante Pupa-IDS

Testamos ainda *in silico* a eficácia de um ligante hipotético ainda não sintetizado, mantendo o grupamento 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl juntamente com o tripeptídeo ILE-ASP-SER existente na sequencia do VCAM, conservando a mesma estrutura espacial do cristal, em uma estratégia similar à utilizada para a construção do peptídeo CQIDSPC e do inibidor PUPA-LDV. Fizemos o *docking* com o ligante PUPA-IDS construído mantendo as mesmas configurações anteriores do programa, e utilizando como contra-ligante o VLA-4. Os resultados estão mostrados na figura 35.

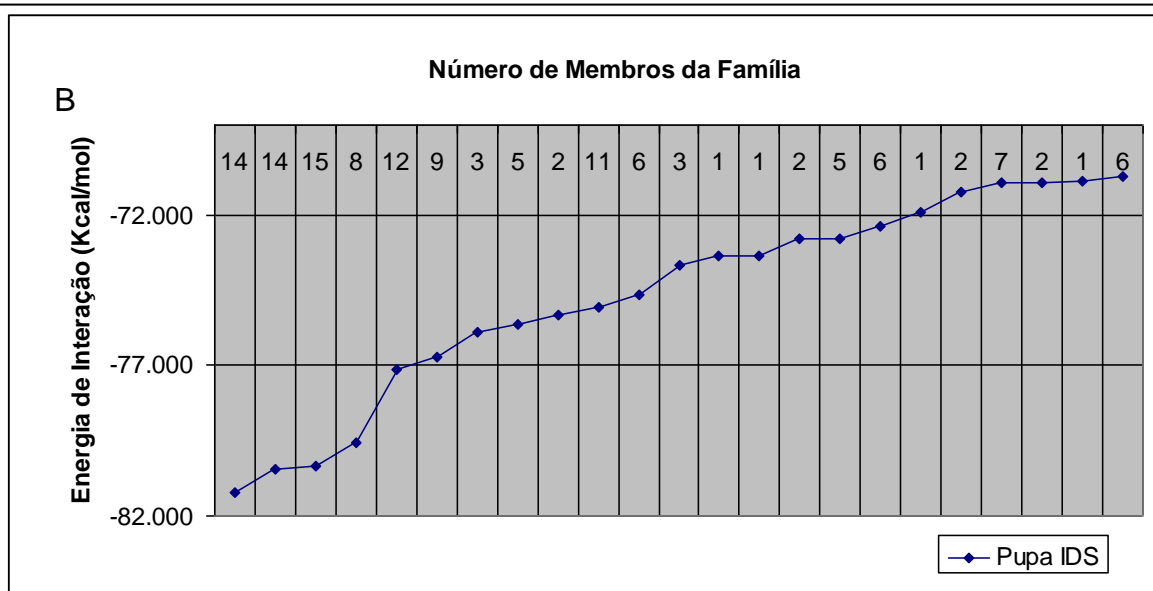
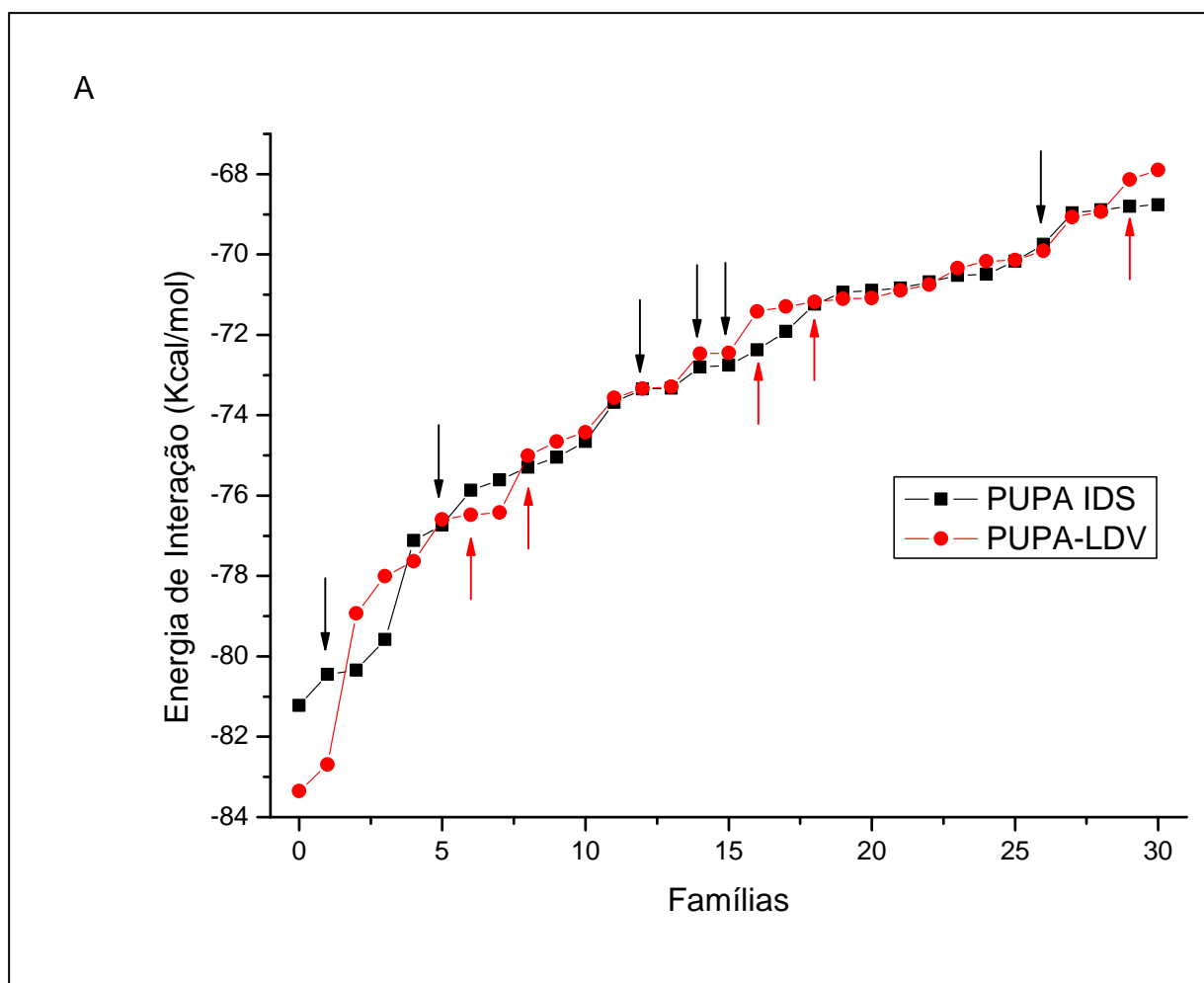


Figura 35 – A) Valores de energia de interação entre o para o ligante PUPA-IDS. As setas assinalam famílias que apresentam soluções cujo OD1 ou OD2 do aminoácido ASP se encontra até 4.5Å do íon Mg^{2+} coordenado pelo motivo MIDAS. B) Número de membros em cada uma das famílias, classificados conforme o RMSD, juntamente com a variação de energia .

A energia de interação parece se situar no mesmo patamar do ligante PUPA-LDV, apresentando valores próximos, e indicando que esse ligante também poderia ser

utilizado em uma estratégia de inibição da atividade do VLA-4, ou então servir como

Figura 36 – Ligante proposto PUPA-IDS, mostrando seu posicionamento global entre as duas subunidades. Na tabela anterior estão explícitas as ligações feitas entre o ligante e a proteína. A energia desse ligante também se situa em uma faixa comparável com o PUPA-LDV, podendo manter a mesma eficácia na inibição do VLA-4 em ensaios biológicos futuros.

Os resíduos listados podem estar envolvidos na seletividade dos ligantes. A comprovação dessa afirmação poderia ser feita através do docking de outras moléculas experimentalmente utilizadas como controle negativo em ensaios de adesão ou ligação. Para que esses resultados sejam plenamente aceitos, simulações maiores por dinâmica molecular serão necessárias, para que a estabilidade dessas interações seja verificada ao longo do tempo, assim como o cálculo de energia livre do sistema.

5 - Discussão

No presente trabalho, analisamos a estrutura da integrina VLA-4, proteína cuja participação em processos inflamatórios e auto-imunes é alvo de diversas estratégias, visando ao bloqueio de sua interação com seus principais ligantes naturais, VCAM-1 e fibronectina. A metodologia adotada para a construção da estrutura tridimensional foi a modelagem comparativa, a metodologia teórica mais confiável atualmente, para a construção de estruturas protéicas que ainda não tenham sido resolvidas experimentalmente.

A estrutura nos permitiu analisar as interações entre o VLA-4 e diversos ligantes, cuja eficácia biológica na inibição dessa integrina já é conhecida, como as seqüências peptídicas LDV, IDS e RGD, e a família de fármacos 4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl-R (PUPA), peptídeo-miméticos. Estudos similares já foram conduzidos em outras integrinas (Belvisi et al., 2005; Feuston et al., 2003; Macchiarulo et al., 2004; Moitessier et al., 2004), quase sempre visando ao estudo estrutural e a análise da interação com ligantes naturais e fármacos inibidores.

Utilizamos, para o *docking*, as seqüências características dos ligantes naturais, provenientes de sua estrutura experimental ou então construímos computacionalmente as que não estavam disponíveis publicamente.

As análises preliminares do *docking* apontaram dois resíduos cujo papel pode ser relevante na seletividade do RGDf[me]V, quando analisado frente ao $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$. Energeticamente, esse curto tripeptídeo se liga à subunidade αv , via ASP150 e GLN180. Esses resíduos são substituídos por outros dois com características físico-químicas bastante distintas na $\alpha 4$: PHE158 e THR189, respectivamente. Essas substituições podem ser levadas em consideração no desenho de futuros inibidores, inserindo grupamentos que interajam, de alguma forma, com o resíduo PHE158 (*T-stacking*, π -*stacking*), mantendo sua cadeia lateral exposta e/ou grupamentos que

formem pontes de hidrogênio com THR189, impedindo a aproximação de outros ligantes, ou mesmo solvente, que possam intermediar essa ligação. É importante ressaltar que, em ensaios de cromatografia, alguns peptídeos cíclicos contendo a tríade RGD em uma conformação específica imobilizados em sefarose podem inibir a ligação do VLA-4 ao VCAM-1 e ao CS-1 (Cardarelli et al., 1994). Em face desses resultados, não pode ser descartada a possibilidade de que uma configuração topológica específica possa se encaixar e inibir essa interação.

Imobilizando o grupamento PUPA, mantendo as coordenadas obtidas pelo melhor ligante dessa família, PUPA-LDV, e permitindo que o restante da molécula, após o grupamento acetil, se movimentasse, obtivemos uma melhor correlação com os resultados experimentais, indicando que as coordenadas mantidas imóveis podem ser relevantes.

Quando comparados à seqüência derivada do VCAM-1 e o peptídeo RGD, torna-se clara a diferença de energias de interação, mostrando uma preferência do VLA-4 quanto ao VCAM-1. Em ambos os casos, o papel do domínio MIDAS, que coordena o íon Mg^{2+} ficou evidente, indicando que a interação eletrostática entre o resíduo ácido do ligante e o Mg^{2+} é importante para a estabilidade do complexo, como já sugerido (Craig et al., 2004).

A inserção do grupamento PUPA na seqüência LDV apresenta um aumento considerável na potência inibitória desse tripeptídeo (Lin and Castro, 1998). Esse dado é confirmado através de nossos experimentos *in silico*, cujos resultados indicam melhores energias no composto PUPA-LDV, quando comparado com os outros derivados dessa família.

As metodologias computacionais utilizadas mostram uma grande eficácia na representação de fenômenos biológicos cuja observação é difícil ou impossível por

outras abordagens. A própria estrutura tridimensional do VLA-4, cujo completo desconhecimento, até então, dificulta a obtenção de fármacos mais eficazes, representa um grande avanço no conhecimento do comportamento fisiológico dessa integrina, e seu uso se torna promissor, sabendo-se de suas limitações e vantagens. O programa utilizado para a avaliação dos modos de ligação, DOCKTHOR, também correspondeu às expectativas, quanto às soluções apresentadas, mantendo-se coerente com os dados. Análises anteriores, em outras integrinas (Jois and Teruna, 2003; Moitessier et al., 2004), utilizaram somente o programa AUTODOCK.

A ausência de moléculas de água cristalográficas certamente poderá influenciar no resultado final do *docking*, já que, analisando as estruturas do *I-domain* disponíveis publicamente (Emsley et al., 2000; Lee et al., 1995a; Lee et al., 1995b), verifica-se duas formas distintas, chamadas de “aberta” e “fechada”, cuja diferença básica é a presença de uma molécula de água intermediando a ligação do ASP do ligante com o íon coordenado pelo MIDAS. Levando-se em consideração a similaridade estrutural entre o *I-domain* e o domínio *A-domain* □ da subunidadeβ, a mesma analogia pode ser feita e poder-se-ia indagar se o mesmo comportamento é apresentado por esse domínio.

As estratégias anteriores visavam à busca de compostos bioativos em bancos de dados de estruturas químicas, através da localização de grupamentos com características definidas, que respeitem a distribuição espacial de cargas ou outros caracteres físico-químicos (Singh et al., 2004). Unindo-se essa técnica com os dados obtidos, a gama de compostos encontrados pode ser restrita aos mais eficazes, cujos grupamentos sejam complementares aos grupos químicos descritos como mais representativos, como o anel aromático 2-metilfenil do grupamento PUPA, por exemplo. Os inibidores encontrados por outras metodologias, ou então derivados de

desintegrinas, não apresentam grande seletividade, quando testados, por exemplo, frente a $\alpha 4\beta 7$ e $\alpha 9\beta 1$ (Bazan-Socha et al., 2004).

A estratégia concebida, conforme o fluxograma elaborado, passando inicialmente pelo docking, e posterior minimização, seguida pela dinâmica molecular e cálculo de energia livre se mostra adequada para o estudo desse complexo, embora, devido ao tamanho do sistema, que apresenta aproximadamente 20.000 átomos, simulações maiores sejam necessárias, principalmente visando ao cálculo de energia livre em função do tempo de estabilidade das melhores conformações.

O modelo concorda com parte dos dados experimentais relativos aos inibidores de uma família (PUPA), e sua utilização pode gerar novos critérios na elaboração de novos antagonistas, potencialmente mais eficazes e seletivos. Outras famílias de inibidores já descritos podem ser testadas, e novos inibidores propostos através de metodologias teóricas poderão ser avaliados, previamente à sua síntese biológica.

O próximo passo a na seqüência de experimentos será o teste e análise dos mesmos ligantes, porém com o terminal carboxila carregado, mimetizando o comportamento do aminoácido ácido presente nos ligantes peptídicos. Essa alteração poderá apresentar resultados diferentes dos observados durante a experimentação com o terminal carboxila neutralizado.

6 – Conclusões

A observação da estrutura primária indica uma estreita relação entre o VLA-4 e as outras famílias de integrinas, apresentando regiões bastante conservadas evolutivamente, como, por exemplo, os motivos MIDAS, ADMIDAS e LIMBS, que coordenam os íons divalentes, e mantêm-se na mesma região nas diversas subunidades β .

A região que circunda os íons se mostra bastante eletronegativa, dando indícios sobre o sítio de ligação das proteínas de matriz extracelular e conseqüentemente, essa região foi escolhida para o docking semi-rígido.

Após a seleção dos melhores resultados provenientes do docking, ficou clara a importância do motivo MIDAS, pois praticamente todos os ligantes que apresentam um resíduo ácido, representado pelo aminoácido ASP nas seqüências LDV, RGD e IDS, se posicionaram de maneira equidistante, com os oxigênios OD1 e OD2 voltados para o Mg^{2+} coordenado por esse motivo, enquanto a outra extremidade desses ligantes se ligava à subunidade α em diferentes aminoácidos. Fisiologicamente, o posicionamento dessas seqüências como uma ponte, pode impedir o encaixe de outras proteínas nesse mesmo sítio. As seqüências CQIDSPC e LDV, derivadas das proteínas de matriz extracelular, podem então ser usadas como inibidores de processos fisiopatológicos que envolvam a participação do VLA-4. O grupamento químico mostrou-se eficaz nos ensaios de IC50 previamente feitos por outros grupos, aumentando a inibição em diferentes sistemas experimentais e, conforme nosso estudo, esses resultados são confirmados.

Com os experimentos de docking conduzidos, pudemos propor diversos modos de ligação para as seqüências peptídicas e para o PUPA-LDV, indicando os possíveis contatos entre esses ligantes e o VLA-4. Alguns dos aminoácidos envolvidos nesses contatos, como a Phe195 e Lys190 podem ser alvos em potencial de futuros inibidores.

A interação do tipo “*T stacking*” presente entre a Phe195 e o anel 2-metilfenil parece conferir uma maior estabilidade na interação dos ligantes com a subunidade α . Quando associada à ponte de hidrogênio formada entre o oxigênio da carbonila e a Lys190, essa estabilidade é aumentada, sendo essa uma interação igualmente importante. O tamanho da área delimitada para a construção da matriz se mostrou adequado ao sistema, abrangendo a maior parte dos resíduos participantes do sítio ativo.

As simulações de dinâmica molecular para o cálculo da energia livre de *Gibbs* podem ser conduzidas por um tempo maior, de modo a facilitar a observação de trechos maiores, mais estáveis energeticamente. Nesses trechos, a diferença de energia entre os estados solvatado e ligado poderia se aproximar dos valores esperados.

Em todas as metodologias envolvidas, o composto PUPA-LDV se mostrou mais eficaz que os outros testados. Esse comportamento pode ser atribuído a presença do resíduo ASP, ligado diretamente ao íon coordenado pelo motivo MIDAS. Quando esse grupamento é removido, ou então substituído por outro grupamento, sua energia de interação diminui drasticamente. Simulações posteriores podem esclarecer o papel do resíduo ácido ou então auxiliar no aprimoramento de ligantes que possuam algum grupamento químico que venha a mimetizar esse comportamento físico. Os resultados observados após a adição do CAP N-terminal contendo o grupamento PUPA à seqüência IDS presente no VCAM-1 mostraram que esse tri peptídeo é candidato à utilização no bloqueio do VLA-4, o que poderia se confirmar após seu teste biológico. Os valores de energia de interação obtidos são bastante próximos ao do PUPA-LDV, já utilizado com essa mesma finalidade.

7 - Perspectivas

- Refazer o docking dos compostos da série PUPA, com o grupamento terminal do ligante carregado, mimetizando o comportamento do resíduo ácido do ligante PUPA-LDV.
- Analisar *in silico* ligantes de outras famílias (derivados de N-(3-Fenilsulfonil-3-piperidinoil)-fenilalanina; N-Acil-L-fenilalanina; compostos derivados de carboxilato) usando o modelo construído.
- Analisar o comportamento dos ligantes testados e sua seletividade frente à integrina $\alpha4\beta7$.
- Realizar simulações de dinâmica molecular mais longas do comportamento dinâmico do complexo integrina-ligante.
- Confirmar a eficácia do composto PUPA-IDS em ensaios de ligação e inibição *in vitro*.

8 – Referências Bibliográficas

- Alon, R., and A. Etzioni. 2003. LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends Immunol.* 24:561-6.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.
- Aqvist, J., C. Medina, and J.E. Samuelsson. 1994. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.* 7:385-91.
- Arnaout, M.A. 2002. Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion. *Immunol Rev.* 186:125-40.
- Arnaout, M.A., B. Mahalingam, and J.P. Xiong. 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:381-410.
- Baker, D., and A. Sali. 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science.* 294:93-6.
- Bazan-Socha, S., D.G. Kisiel, B. Young, R.D. Theakston, J.J. Calvete, D. Sheppard, and C. Marcinkiewicz. 2004. Structural requirements of MLD-containing disintegrins for functional interaction with alpha 4 beta 1 and alpha 9 beta1 integrins. *Biochemistry.* 43:1639-47.
- Belvisi, L., T. Riccioni, M. Marcellini, L. Vesce, I. Chiarucci, D. Efrati, D. Potenza, C. Scolastico, L. Manzoni, K. Lombardo, M.A. Stasi, A. Orlandi, A. Ciucci, B. Nico, D. Ribatti, G. Giannini, M. Presta, P. Carminati, and C. Pisano. 2005. Biological and molecular properties of a new alpha(v)beta3/alpha(v)beta5 integrin antagonist. *Mol Cancer Ther.* 4:1670-80.
- Berman, H.M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, and P.E. Bourne. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28:235-42.
- Boudreau, N., and M.J. Bissell. 1998. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol.* 10:640-6.
- Branden, C., and J. Tooze. 1999. Introduction to Protein Structure. Garland Publishing. Inc., New York and London.
- Brooijmans, N., and I.D. Kuntz. 2003. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32:335-73.
- Buckley, C.D., and D.L. Simmons. 1997. Cell adhesion: a new target for therapy. *Mol Med Today.* 3:449-56.
- Bunting, M., E.S. Harris, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman. 2002. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol.* 9:30-5.

- Burke, R.D. 1999. Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int Rev Cytol.* 191:257-84.
- Byzova, T.V., C.K. Goldman, N. Pampori, K.A. Thomas, A. Bett, S.J. Shattil, and E.F. Plow. 2000. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell.* 6:851-60.
- Cai, T.Q., and S.D. Wright. 1995. Energetics of leukocyte integrin activation. *J Biol Chem.* 270:14358-65.
- Cardarelli, P.M., R.R. Cobb, D.M. Nowlin, W. Scholz, F. Gorcsan, M. Moscinski, M. Yasuhara, S.L. Chiang, and T.J. Lobl. 1994. Cyclic RGD peptide inhibits alpha 4 beta 1 interaction with connecting segment 1 and vascular cell adhesion molecule. *J Biol Chem.* 269:18668-73.
- Carlson, H.A. 2002a. Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target. *Curr Opin Chem Biol.* 6:447-52.
- Carlson, H.A. 2002b. Protein flexibility is an important component of structure-based drug discovery. *Curr Pharm Des.* 8:1571-8.
- Carlson, H.A., and J.A. McCammon. 2000. Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Mol Pharmacol.* 57:213-8.
- Chigaev, A., G. Zwart, S.W. Graves, D.C. Dwyer, H. Tsuji, T.D. Foutz, B.S. Edwards, E.R. Prossnitz, R.S. Larson, and L.A. Sklar. 2003. Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion. *J Biol Chem.* 278:38174-82.
- Chiu, H.H., D.T. Crowe, M.E. Renz, L.G. Presta, S. Jones, I.L. Weissman, and S. Fong. 1995. Similar but nonidentical amino acid residues on vascular cell adhesion molecule-1 are involved in the interaction with alpha 4 beta 1 and alpha 4 beta 7 under different activity states. *J Immunol.* 155:5257-67.
- Chothia, C., and A.M. Lesk. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo J.* 5:823-6.
- Cierniewski, C.S., T. Byzova, M. Papierak, T.A. Haas, J. Niewiarowska, L. Zhang, M. Cieslak, and E.F. Plow. 1999. Peptide ligands can bind to distinct sites in integrin alpha4beta3 and elicit different functional responses. *J Biol Chem.* 274:16923-32.
- Craig, D., M. Gao, K. Schulten, and V. Vogel. 2004. Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. *Structure.* 12:2049-58.
- Curley, G.P., H. Blum, and M.J. Humphries. 1999. Integrin antagonists. *Cell Mol Life Sci.* 56:427-41.
- Dalmau, S.R., C.S. Freitas, and W. Savino. 1999. Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial

- cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *Blood*. 93:974-90.
- Diamond, M.S., and T.A. Springer. 1994. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol*. 4:506-17.
- Dransfield, I., C. Cabanas, A. Craig, and N. Hogg. 1992. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol*. 116:219-26.
- Du, X.P., E.F. Plow, A.L. Frelinger, 3rd, T.E. O'Toole, J.C. Loftus, and M.H. Ginsberg. 1991. Ligands "activate" integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell*. 65:409-16.
- Emsley, J., C.G. Knight, R.W. Farndale, and M.J. Barnes. 2004. Structure of the integrin alpha2beta1-binding collagen peptide. *J Mol Biol*. 335:1019-28.
- Emsley, J., C.G. Knight, R.W. Farndale, M.J. Barnes, and R.C. Liddington. 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell*. 101:47-56.
- Erle, D.J., M.J. Briskin, E.C. Butcher, A. Garcia-Pardo, A.I. Lazarovits, and M. Tidswell. 1994. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *J Immunol*. 153:517-28.
- Feuston, B.P., J.C. Culberson, M.E. Duggan, G.D. Hartman, C.T. Leu, and S.B. Rodan. 2002. Binding model for nonpeptide antagonists of alpha(v)beta(3) integrin. *J Med Chem*. 45:5640-8.
- Feuston, B.P., J.C. Culberson, and G.D. Hartman. 2003. Molecular model of the alpha(IIb)beta(3) integrin. *J Med Chem*. 46:5316-25.
- Fong, S., S. Jones, M.E. Renz, H.H. Chiu, A.M. Ryan, L.G. Presta, and D. Jackson. 1997. Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1). Its binding motif for alpha 4 beta 7 and role in experimental colitis. *Immunol Res*. 16:299-311.
- Gane, P.J., and P.M. Dean. 2000. Recent advances in structure-based rational drug design. *Curr Opin Struct Biol*. 10:401-4.
- Gao, W.N., Y. Li, R. Zhang, H. Gao, W.R. Xu, A.X. Li, Q.S. Du, X. Zhang, and D.Q. Wei. 2006. [Screening of new HIV inhibitors based on the database of traditional Chinese medicine]. *Yao Xue Xue Bao*. 41:241-6.
- Ghosh, S., E. Goldin, F.H. Gordon, H.A. Malchow, J. Rask-Madsen, P. Rutgeerts, P. Vyhnalek, Z. Zadorova, T. Palmer, and S. Donoghue. 2003. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 348:24-32.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science*. 285:1028-32.

- Giet, O., D.R. Van Bockstaele, I. Di Stefano, S. Huygen, R. Greimers, Y. Beguin, and A. Gothot. 2002. Increased binding and defective migration across fibronectin of cycling hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 99:2023-31.
- Graham, K.L., F.E. Fleming, P. Halasz, M.J. Hewish, H.S. Nagesha, I.H. Holmes, Y. Takada, and B.S. Coulson. 2005. Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *J Gen Virol*. 86:3397-408.
- Grant, G.H., and W.G. Richards. 1995. Computational Chemistry. Oxford University Press Inc., New York.
- Gu, J., and N. Taniguchi. 2004. Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconj J*. 21:9-15.
- Guex, N., and M.C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 18:2714-23.
- Harris, E.S., A.O. Shigeoka, W. Li, R.H. Adams, S.M. Prescott, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, and D.E. Lorant. 2001. A novel syndrome of variant leukocyte adhesion deficiency involving defects in adhesion mediated by beta1 and beta2 integrins. *Blood*. 97:767-76.
- Hauzenberger, D., and K.G. Sundqvist. 1993. Fibronectin at the lymphocyte surface. Evidence for activation-dependent binding to VLA4 and VLA5 integrins. *Scand J Immunol*. 37:87-95.
- Hemler, M.E. 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol*. 8:365-400.
- Henikoff, S., and J.G. Henikoff. 1991. Automated assembly of protein blocks for database searching. *Nucleic Acids Res*. 19:6565-72.
- Henikoff, S., and J.G. Henikoff. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:10915-9.
- Hockney, R.W. 1970. The potential calculation and some applications. *Methods in Computational Physics*. 9:136-211.
- Hooft, R.W., G. Vriend, C. Sander, and E.E. Abola. 1996. Errors in protein structures. *Nature*. 381:272.
- Hughes, A.L. 2001. Evolution of the integrin alpha and beta protein families. *J Mol Evol*. 52:63-72.
- Humphries, J.D., J.A. Askari, X.P. Zhang, Y. Takada, M.J. Humphries, and A.P. Mould. 2000. Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha5beta 1. II. Specificity of arg-gly-Asp binding is determined by Trp157 OF THE alpha subunit. *J Biol Chem*. 275:20337-45.

- Humphries, M.J., J. Sheridan, A.P. Mould, and P. Newham. 1995. Mechanisms of VCAM-1 and fibronectin binding to integrin alpha 4 beta 1: implications for integrin function and rational drug design. *Ciba Found Symp.* 189:177-91; discussion 191-9.
- Humphries, M.J., E.J. Symonds, and A.P. Mould. 2003. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr Opin Struct Biol.* 13:236-43.
- Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48:549-54.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-87.
- Jackson, D.Y. 2002. Alpha 4 integrin antagonists. *Curr Pharm Des.* 8:1229-53.
- Jackson, D.Y., C. Quan, D.R. Artis, T. Rawson, B. Blackburn, M. Struble, G. Fitzgerald, K. Chan, S. Mullins, J.P. Burnier, W.J. Fairbrother, K. Clark, M. Berisini, H. Chui, M. Renz, S. Jones, and S. Fong. 1997. Potent alpha 4 beta 1 peptide antagonists as potential anti-inflammatory agents. *J Med Chem.* 40:3359-68.
- Jois, S.D., and T.J. Teruna. 2003. A peptide derived from LFA-1 protein that modulates T-cell adhesion binds to soluble ICAM-1 protein. *J Biomol Struct Dyn.* 20:635-44.
- Jones, E.Y., K. Harlos, M.J. Bottomley, R.C. Robinson, P.C. Driscoll, R.M. Edwards, J.M. Clements, T.J. Dudgeon, and D.I. Stuart. 1995. Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 Å resolution. *Nature.* 373:539-44.
- Júnior, A.D.I., and L.E. Dardenne. 2005. Cross-Docking of Highly Flexible Ligands using a Multisolution-GSA Docking Method. *In Anais do 5th International Biophysics Congress 2005, Montpellier - França.*
- Júnior, A.D.I., R.S. Silva, K.C. Mundim, and L.E. Dardenne. 2004. Performance and Parametrization of the Algorithm Simplified Generalized Simulated Annealing. *Genetics and Molecular Biology.* 27:616-622.
- Katz, B.Z., E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, and B. Geiger. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 11:1047-60.
- Kavanaugh, A.F., E. Lightfoot, P.E. Lipsky, and N. Oppenheimer-Marks. 1991. Role of CD11/CD18 in adhesion and transendothelial migration of T cells. Analysis utilizing CD18-deficient T cell clones. *J Immunol.* 146:4149-56.
- Kilshaw, P.J. 1999. Alpha E beta 7. *Mol Pathol.* 52:203-7.

- Kirkpatrick, S., J. Gelatt, and M.P. Vecchi. 1983. Optimization by simulated annealing. *Science*. 220:671-680.
- Klumpp, K., and T. Mirzadegan. 2006. Recent progress in the design of small molecule inhibitors of HIV RNase H. *Curr Pharm Des*. 12:1909-22.
- Komoriya, A., L.J. Green, M. Mervic, S.S. Yamada, K.M. Yamada, and M.J. Humphries. 1991. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem*. 266:15075-9.
- Krissinel, E., and K. Henrick. 2005. Detection of protein assemblies in crystals. *2.kactiMs*.

- Lin, K.C., and A.C. Castro. 1998. Very late antigen 4 (VLA4) antagonists as anti-inflammatory agents. *Curr Opin Chem Biol.* 2:453-7.
- Lindahl, E., B. Hess, and D.v.d. Spoel. 2001. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling.* 7:306-317.
- Liu, G., J.R. Huth, E.T. Olejniczak, R. Mendoza, P. DeVries, S. Leitz, E.B. Reilly, G.F. Okasinski, S.W. Fesik, and T.W. von Geldern. 2001. Novel p-arylthio cinnamides as antagonists of leukocyte function-associated antigen-1/intracellular adhesion molecule-1 interaction. 2. Mechanism of inhibition and structure-based improvement of pharmaceutical properties. *J Med Chem.* 44:1202-10.
- Lobb, R.R., and S.P. Adams. 1999. Small molecule antagonists of alpha4 integrins: novel drugs for asthma. *Expert Opin Investig Drugs.* 8:935-45.
- Luthy, R., J.U. Bowie, and D. Eisenberg. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature.* 356:83-5.
- Macchiarulo, A., G. Costantino, M. Meniconi, K. Pleban, G. Ecker, D. Bellocchi, and R. Pellicciari. 2004. Insights into phenylalanine derivatives recognition of VLA-4 integrin: from a pharmacophoric study to 3D-QSAR and molecular docking analyses. *J Chem Inf Comput Sci.* 44:1829-39.
- Madri, J.A., D. Graesser, and T. Haas. 1996. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol.* 74:749-57.
- Makarem, R., P. Newham, J.A. Askari, L.J. Green, J. Clements, M. Edwards, M.J. Humphries, and A.P. Mould. 1994. Competitive binding of vascular cell adhesion molecule-1 and the HepII/IIICS domain of fibronectin to the integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem.* 269:4005-11.
- Marti-Renom, M.A., A.C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo, and A. Sali. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:291-325.
- Mazurov, A.V., S.G. Khaspekova, T.V. Byzova, O. Tikhomirov, M.C. Berndt, B. Steiner, and W.C. Kouns. 1996. Stimulation of platelet glycoprotein IIb-IIIa (alpha IIb beta 3-integrin) functional activity by a monoclonal antibody to the N-terminal region of glycoprotein IIIa. *FEBS Lett.* 391:84-8.
- McCammion, J.A., B.R. Gelin, and M. Karplus. 1977. Dynamics of folded proteins. *Nature.* 267:585-90.
- McConkey, B.J., V. Sobolev, and M. Edelman. 2002. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science.* 83:845-856.
- McDowall, A., D. Inwald, B. Leitinger, A. Jones, R. Liesner, N. Klein, and N. Hogg. 2003. A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins. *J Clin Invest.* 111:51-60.

Meiselbach, H., A.H. Horn, T. Harrer, and H. Sticht. 2006. Insights into amprenavir resistance in E35D HIV-1 protease mutation from molecular dynamics and binding free-energy calculations. *J Mol Model (Online)*.

- bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J Exp Med.* 180:795-805.
- Puzon-McLaughlin, W., and Y. Takada. 1996. Critical residues for ligand binding in an I domain-like structure of the integrin beta1 subunit. *J Biol Chem.* 271:20438-43.
- Qu, A., and D.J. Leahy. 1996. The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin. *Structure.* 4:931-42.
- Ramachandran, G.N., C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan. 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol.* 7:95-9.
- Roos, D., and S.K. Law. 2001. Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency. *Blood Cells Mol Dis.* 27:1000-4.
- Sali, A., and T.L. Blundell. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 234:779-815.
- Sali, A., L. Potterton, F. Yuan, H. van Vlijmen, and M. Karplus. 1995. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins.* 23:318-26.
- Sanchez, R., U. Pieper, F. Melo, N. Eswar, M.A. Marti-Renom, M.S. Madhusudhan, N. Mirkovic, and A. Sali. 2000. Protein structure modeling for structural genomics. *Nat Struct Biol.* 7 Suppl:986-90.
- Sanchez, R., and A. Sali. 1998. Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:13597-602.
- Sander, C., and R. Schneider. 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins.* 9:56-68.
- Saudek, V., R.A. Atkinson, and J.T. Pelton. 1991. Three-dimensional structure of echistatin, the smallest active RGD protein. *Biochemistry.* 30:7369-72.
- Sayle, R.A., and E.J. Milner-White. 1995. RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci.* 20:374.
- Schuler, G.D., J.A. Epstein, H. Ohkawa, and J.A. Kans. 1996. Entrez: molecular biology database and retrieval system. *Methods Enzymol.* 266:141-62.
- Schwartz, M.A. 2001. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* 11:466-70.
- Shimaoka, M., A. Salas, W. Yang, G. Weitz-Schmidt, and T.A. Springer. 2003. Small molecule integrin antagonists that bind to the beta2 subunit I-like domain and activate signals in one direction and block them in the other. *Immunity.* 19:391-402.
- Shimaoka, M., and T.A. Springer. 2003. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov.* 2:703-16.

- Shimaoka, M., J. Takagi, and T.A. Springer. 2002. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 31:485-516.
- Shimizu, Y., G.A. Van Seventer, K.J. Horgan, and S. Shaw. 1990. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature.* 345:250-3.

- Takagi, J., H.P. Erickson, and T.A. Springer. 2001. C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1. *Nat Struct Biol.* 8:412-6.
- Takagi, J., B.M. Petre, T. Walz, and T.A. Springer. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell.* 110:599-11.
- Tilley, J., G. Kaplan, N. Fotouhi, B. Wolitzky, and K. Rowan. 2000. Carbacyclic peptide mimetics as VCAM-VLA-4 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 10:1163-5.
- Tsallis, C., and D.A. Stariolo. 1995. Optimization by simulated annealing: Recent progress. *In Annual Reviews of Computational Physics.* Vol. II. D. Stauffer, editor. World Scientific, Singapore. 353-356.
- Tsallis, C., and D.A. Stariolo. 1996. Generalized simulated annealing. *Physica A.* 233:395-406.
- Vanderslice, P., R.J. Biediger, D.G. Woodside, K.L. Berens, G.W. Holland, and R.A. Dixon. 2004. Development of cell adhesion molecule antagonists as therapeutics for asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 17:1-10.
- Veiga, S.S., R. Chammas, N. Cella, and R.R. Brentani. 1995. Glycosylation of beta-1 integrins in B16-F10 mouse melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. *Int J Cancer.* 61:420-4.
- Verlet, L. 1967. Computer experiments on classical fluids.I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical Review.* 159:98-103.
- Wadsworth, S., M.J. Halvorson, A.C. Chang, and J.E. Coligan. 1993. Multiple changes in VLA protein glycosylation, expression, and function occur during mouse T cell ontogeny. *J Immunol.* 150:847-57.
- Wang, J.H., R.B. Pepinsky, T. Stehle, J.H. Liu, M. Karpusas, B. Browning, and L. Osborn. 1995. The crystal structure of an N-terminal two-domain fragment of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1): a cyclic peptide based on the domain 1 C-D loop can inhibit VCAM-1-alpha 4 integrin interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5714-8.
- Weitz-Schmidt, G., K. Welzenbach, V. Brinkmann, T. Kamata, J. Kallen, C. Bruns, S. Cottens, Y. Takada, and U. Hommel. 2001. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med.* 7:687-92.
- Welzenbach, K., U. Hommel, and G. Weitz-Schmidt. 2002. Small molecule inhibitors induce conformational changes in the I domain and the I-like domain of lymphocyte function-associated antigen-1. Molecular insights into integrin inhibition. *J Biol Chem.* 277:10590-8.

- Xiong, J.P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D.L. Scott, A. Joachimiak, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science*. 294:339-45.
- Xiong, J.P., T. Stehle, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2003. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost*. 1:1642-54.
- Xiong, J.P., T. Stehle, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2004. A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *J Biol Chem*. 279:40252-4.
- Xiong, J.P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout. 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*. 296:151-5.
- Yang, G.X., and W.K. Hagmann. 2003. VLA-4 antagonists: potent inhibitors of lymphocyte migration. *Med Res Rev*. 23:369-92.
- Yonekawa, K., and J.M. Harlan. 2005. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol*. 77:129-40.
- You, T.J., D.S. Maxwell, T.P. Kogan, Q. Chen, J. Li, J. Kassir, G.W. Holland, and R.A. Dixon. 2002. A 3D structure model of integrin alpha 4 beta 1 complex: I. Construction of a homology model of beta 1 and ligand binding analysis. *Biophys J*. 82:447-57.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)