

**ESTUDO POR DINÂMICA MOLECULAR DO FATOR DE
CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)**

Bruno Araújo Cautiero Horta

Tese de Doutorado desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação do Professor

Ricardo Bicca de Alencastro

Rio de Janeiro

Março 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

HORTA, Bruno Araújo Cautiero

Estudo por Dinâmica Molecular do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF). Bruno A. C. Horta; orientador Ricardo Bicca de Alencastro Rio de Janeiro, UFRJ, IQ, 2008. xx, 145 f.

Tese: Doutorado em Ciências (Química Orgânica)

1. VEGF,
2. Dinâmica Molecular,
3. Movimentos Correlacionados,
4. Teses

I. De Alencastro, Ricardo Bicca (orientador)

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química

III. Títulos

Esta tese foi realizada sob a orientação do Prof. Ricardo Bicca de Alencastro com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

À minha avó Celeste (in memoriam)

Ao meu avô Horta (in memoriam)

Ao meu avô Lívio (in memoriam)

“Bonjour les enfants!”

Ricardo Bicca de Alencastro (cumprimento diário aos seus alunos)

“O selo vale o peso do que serve,
a celebridade, o instante:
só a demência de que escapo
lentamente trás em si
justificação precisa. E eu
calmo permaneça, e espere
o destino que me aguarda célere.
Medita sobre a razão
nisto tudo e procure a causa,
cansado o destino evidente das razões,
cansada a sombra, o eco e o verbo,
cansada a sombra pura desta escada,
cansada minha alma e esta cidade”

Ricardo Bicca de Alencastro, *O Sexo Aposto*, Editora Teatral LTDA.

„Ein Monster

Seit zwei Jahren arbeit ich an diesem Experiment. Ich denke nur noch an meine Kreatur.
Mein Kind. Schön, gut und klug. Mein Sohn, mein Geschöpf.“

Mary Shelley, *Frankenstein*, Cideb Editrice 2007.

“O Traço e o Risco

Eu só vou lhe abrir o caderno da vida,
mas não vou segurar sua mão.
Faça nele o seu traço e seu risco
da maneira que você quiser.
Não foi tudo que eu li em um livro,
usei muito a minha razão.
Muita coisa aprendi com a vida
e não foi na primeira lição.
Você deve fazer o seu traço,
você tem que assumir o seu risco.
Se acertar você tem meu abraço,
e se não, você tem meu perdão.”

Pedro Paulo Cautiero Horta (Poema escrito a seus filhos em 29/12/05)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e amor, que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus irmãos Pedro, André e Vítor, pela compreensão, pelos momentos de descontração e pelo apoio.

À minha avó Lete, que esteve presente durante quase todo o processo, me ajudando e dando os melhores exemplos de um ser humano de valor.

À minha avó Selma, que mesmo estando longe, sempre ajudou da melhor forma.

Aos meus tios Pezão e Flávio, que nesses últimos anos foram meus segundos pais, me receberam da melhor forma possível e me ajudaram muito.

Às minhas tias Biluca, Maria Helena e Ana, que nos últimos anos foram minhas segundas mães, me deram todo apoio e carinho que precisei.

Aos meus primos Roberto, Eduardo, Júlio, Flavinho, Guy, Ronaldinho, Cristiano e Luiza, que considero irmãos.

Aos demais familiares que apesar da distância torceram sinceramente para o meu sucesso.

Ao mestre, orientador e amigo Professor Bicca. Lembra do Bruno que chegou no laboratório em 2004? Pois é, sem o seu apoio, amizade e ensinamentos seria impossível eu me tornar o Bruno que está saindo em 2008. Apesar da distância que a partir de agora existirá, a lembrança e a amizade sempre permanecerão. Professor, obrigado por fazer parte da minha vida.

Ao mestre e amigo Professor Chaer. Agradeço não só por ter me ensinado química quântica “de verdade”, mas, também, por toda consideração e pelo apoio em todos os momentos difíceis.

Ao mestre e amigo Professor Pierre. Obrigado por todo o crédito, confiança e amizade. Obrigado também por ter me confiado o trabalho que gerou o meu primeiro artigo científico.

Aos mestres Professores Kover, David, Ângelo, Márcio, Cláudia, Edílson e Cristina. Obrigado pela confiança e pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos César, Fleming, Paulo, Edson, Rafa, Daniel, Sal, Giovanni, Oswaldo, JP, Débora e Aninha. Para abreviar e dizer o quanto vocês significam pra mim, eu poderia escrever uma tese, muito maior do que esta, apenas relatando os ótimos momentos que tivemos juntos. Contem comigo sempre! Fleming, você tem toda razão! É com os amigos que se aprende.

Aos amigos do grupo de discussões em Físico-Química. Em especial ao amigo André Gustavo, pelas discussões, críticas, ensinamentos e pela grande consideração.

Ao meu amigo Riccardo Baron, pelos ensinamentos, amizade e pelo empréstimo de boa parte da bibliografia de métodos teóricos que foi utilizada no decorrer da tese.

Aos meus queridos colegas de laboratório André, Monique, Lucas, Diego, Thiago, Fabiano e Luiz. Obrigado pela confiança e por proporcionarem o melhor ambiente de trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

RESUMO

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é o principal regulador da angiogênese, processo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. O VEGF está associado a diversos fenômenos fisiológicos e patológicos, incluindo câncer, metástase, retinopatia diabética, distúrbios do sistema reprodutor feminino, inflamações, dentre outros. A complexa cascata de sinalização do VEGF tem sido investigada por métodos de biologia celular e molecular. Sabe-se da existência de vários membros da família de fatores de crescimento vascular endotelial, VEGF ou VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD e PlGF. Estes fatores interagem de forma diferenciada com três receptores, Flt-1, KDR e Flt-4, promovendo uma variedade de respostas biológicas. Apesar do extenso conhecimento sobre os efeitos causados por cada fator, pouco se sabe, no nível molecular, sobre os modos de interação destes fatores com cada receptor e da dinâmica molecular destes fatores. O objetivo desta tese é investigar, no nível molecular e pelo uso de métodos computacionais, fatores estruturais e dinâmicos que possam estar envolvidos com a atividade do VEGF no processo de angiogênese. As simulações mostraram que a dinâmica do VEGF é governada por movimentos correlacionados e que, como principal modo, um movimento do tipo borboleta pode estar relacionado com a atividade dessa proteína. As interações com receptor e inibidor promovem modificações dinâmicas nas flutuações e correlações atômicas. As ligações dissulfídicas que compõem o característico “nó de cistina” atuam, não só na manutenção da estrutura tridimensional, mas também na seleção dos modos dinâmicos. As simulações fornecem bases moleculares que explicam porque o VEGF é capaz de ativar os receptores Flt-1 e KDR e porque os fatores PlGF e VEGFB só ativam o receptor Flt-1.

ABSTRACT

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main regulator of angiogenesis, which is the growth of new blood vessels from preexisting ones. VEGF is related to many physiological and pathological processes such as cancer, metastasis, diabetic retinopathy, disturbances of the female reproductive tract, inflammation, and others. The complex VEGF signaling cascade has been investigated by cellular and molecular biology methods. It is known of the existence of several members of the vascular endothelial growth factor family, VEGF or VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD and PlGF. These factors have differential ways to interact with three receptors, Flt-1, KDR and Flt-4, promoting a variety of biological responses. In spite of the extended knowledge about the effects caused by each factor, little is known, at the molecular level, about the interaction modes of these factors with each receptor and about the molecular dynamics of these factors. The objective of this thesis is to investigate, at the molecular level and by the use of computational methods, structural and dynamical factors which could be involved with the activity of VEGF within angiogenesis. The simulations showed that VEGF dynamics is governed by correlated motions and that, as the main mode, a butterfly like motion could be related to the activity of this protein. The interactions with receptor and inhibitor promote dynamical changes on the atomic fluctuations and correlations. The disulfide bonds that make the characteristic “cystine knot” act, not only by maintaining the tridimensional structure, but also by selecting dynamical modes. The simulations provide molecular basis which explain why VEGF is capable of activating both Flt-1 and KDR receptors and why PlGF and VEGFB are only capable of activating Flt-1 receptor.

LISTA DE SIGLAS

ANM – Anisotropic Network Model
aFGF – Acidic Fibroblast Growth Factor
bFGF – Basic Fibroblast Growth Factor
DCCM – Dynamical Cross-Correlation Map
EANM – Extended Anisotropic Network Model
Flt – fms Like Tyrosine Kinase Receptor
GNM – Gaussian Network Model
HGF – Hepatocyte Growth Factor
KDR – Kinase Domain Region
MD – Molecular Dynamics
NGF – Nerve Growth Factor
NM – Normal Modes
PCA – Principal Component Analysis
PDB – Protein Data Bank
PDGF – Platelet Derived Growth Factor
PIGF – Placental Growth Factor
QH – Quasi-Harmonic
Rg – Raio de giro
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMSD – Root Mean Square Deviation
RMSF – Root Mean Square Fluctuation
RMSIP – Root Mean Square Inner-Product
SASA – Solvent Accessible Surface Area

SPC – Single Point Charge

TGF- α – Transforming Growth Factor- α

TGF- β – Transforming Growth Factor- β

VdW – Van der Waals

VEGF (or VEGFA) – Vascular Endothelial Growth Factor (A)

VEGFB – Vascular Endothelial Growth Factor B

VEGFC – Vascular Endothelial Growth Factor C

VEGFD – Vascular Endothelial Growth Factor D

VEGFE – Vascular Endothelial Growth Factor E

VEGFR – Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VPF – Vascular Permeability Factor

WT – Wild Type

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1: Representação esquemática da ativação diferencial dos três diferentes receptores de fatores de crescimento vascular endotelial..... 6
- Figura 1.2: Estrutura cristalográfica do VEGF determinada numa resolução de 1,93 Å (código PDB: 1VVF) (Muller, Li *et al.*, 1997). As ligações dissulfeto estão em verde. Os dois pólos são identificados por esferas. Cada pólo inclui as alças-1 e -3 de um mesmo monômero, a alça-2 do outro monômero, resíduos extremos das fitas- β , e alguns resíduos das regiões terminais..... 8
- Figura 1.3: Esquema de um receptor de VEGF. Na região extracelular existem sete domínios do tipo imunoglobulina, sendo que o domínio-2 do receptor Flt-1 já teve a estrutura cristalográfica determinada. O segmento transmembranar está mostrado em lilás. Na região intracelular, vê-se o domínio quinase, que para o KDR, já teve a estrutura cristalográfica determinada..... 9
- Figura 4.1: (a) RMSD relativo aos átomos de $C\alpha$ do VEGF. A linha preta fina representa o RMSD calculado sobre todos os átomos de $C\alpha$, a linha preta em negrito representa o RMSD calculado sobre os $C\alpha$ da região das alças, e a linha cinza representa o RMSD calculado sobre os átomos de $C\alpha$ da região mais rígida. (b) Raio de giro e (c) Área de superfície acessível ao solvente..... 36
- Figura 4.2: Fatores-B calculados para cada monômero do VEGF (linhas contínuas) e a média dos fatores-B experimentais obtidos da estrutura cristalográfica de múltiplas cópias do VEGF (linha pontilhada) (código PDB: 2VVF). 38
- Figura 4.3: Sobreposição de estruturas mostrando a amplitude dos movimentos de um dos monômeros do VEGF. (a) Estruturas obtidas da simulação de MD. (b) Sobreposição das 24 estruturas obtidas por Pan e colaboradores por RMN (código PDB: 1KAT) (Pan, Li *et al.*, 2002). 40
- Figura 4.4: Mapa de correlação dinâmica cruzada do VEGF. As correlações (isto é, valores positivos) estão mostradas abaixo e as anticorrelações (isto é, valores negativos) acima da diagonal. Os coeficientes de correlação foram calculados efetuando-se a média de 5 blocos consecutivos de 1000 ps sobre os últimos 5 ns da trajetória. São mostrados apenas os coeficientes com módulo superior a 0,3. O quadrado AA corresponde às correlações que envolvem os resíduos do monômero A. O quadrado BB corresponde às correlações que envolvem os resíduos do monômero B. As correlações entre monômeros aparecem no quadrado BA e as anticorrelações no quadrado AB. 41
- Figura 4.5: Última estrutura da simulação mostrando a região das alças. A cadeia principal está na representação em fitas e as cadeias laterais dos resíduos selecionados estão representados em hastes. (a) Interações do tipo ponte salina formada pelos pares Arg82 e Glu42, e Lys84 e Glu44. (b) A ligação dissulfeto entre Cys51 e Cys60 mantém as alças-1 e -2 ligadas covalentemente. (c) Interações eletrostáticas entre todos os resíduos dos pólos do VEGF. Os resíduos estão identificados como: N-terminal [nt: 11–25], alça-1 [l1: 39–50], alça-2 [l2: 59–67], alça-3 [l3: 80–92], e C-terminal [ct: 105–109]. Os subscritos indicam a cadeia.

Valores positivos (repulsões) estão acima da diagonal e valores negativos (atrações) estão abaixo da diagonal. À direita estão os intervalos de energia em kJ/mol. As elipses mostram as regiões onde ocorrem as interações mais fortes. 43

Figura 4.6: RMSIP dos primeiros 10 autovetores obtidos das duas metades (2500 ps) dos últimos 5 ns da simulação em intervalos crescentes de tempo..... 47

Figura 4.7: Estruturas extremas das projeções da trajetória nos primeiros cinco autovetores. Os autovalores correspondentes a cada autovetor estão abaixo da respectiva projeção..... 48

Figura 5.1: (a) RMSD dos átomos de C α , (b) raio de giro e (c) área superficial acessível ao solvente dos complexos VEGF_Flt-1_{D2} (linha cinza), VEGF_v107 (linha preta) e VEGF_v107_{mut} (linha preta pontilhada). 54

Figura 5.2: Sobreposição das estruturas médias do VEGF livre (azul), VEGF ligado ao Flt-1_{D2} (vermelho) e VEGF ligado ao peptídeo v107 (verde). 56

Figura 5.3: Variação da estrutura secundária durante o tempo de simulação. O esquema de cores adotado para estrutura a secundária é: hélice- α (preto), hélice-3-10 (vermelho), fita- β (verde), ponte- β (azul), alça (amarelo), volta (coil) (marrom). (a) VEGF livre, (b) VEGF complexado com o Flt-1D2 e (c) VEGF complexado com o peptídeo v107..... 57

Figura 5.4: (a) Contribuições eletrostáticas e (b) VdW por resíduo do VEGF na interação com o grupo formado pelo receptor inteiro. (c) Interações entre resíduos carregados. (d) Distâncias entre os pares de resíduos: Flt-1-Glu141 e VEGF-Lys16 (vermelho), Flt-1-Arg224 e VEGF-Asp63 (preto), e Flt-1-Lys171 e VEGF-Glu103 (verde). (e) Resíduos do VEGF que contribuem com mais de 5 kJ/mol para a interação de VdW com o receptor..... 60

Figura 5.5: (a) Contribuições eletrostáticas e (b) VdW por resíduo do VEGF na interação com o grupo formado pelo v107 inteiro. As barras pretas representam valores médios coletados antes da formação da ponte salina e as barras vermelhas representam valores médios coletados depois de sua formação. Interações entre resíduos carregados antes (c) e depois (d) da formação da ponte salina. (e) Distâncias entre o par de resíduos v107-Arg9 e VEGF-Glu103. A linha preta corresponde à simulação do complexo VEGF_v107 e a linha vermelha corresponde ao complexo VEGF_v107_{mut}. (f) Resíduos do VEGF que contribuem com mais de 5 kJ/mol para a interação de VdW com o v107..... 65

Figura 5.6: Distribuições de probabilidades ao longo do ângulo χ para resíduos selecionados da região de interface com o receptor. VEGF livre está em preto, VEGF_Flt-1_{D2} em vermelho e VEGF_v107 em verde. 67

Figura 5.7: Painéis na parte superior mostram a evolução temporal dos fatores-B coletados de janelas consecutivas de 250 ps. O painel da esquerda refere-se ao VEGF livre, o do meio ao VEGF com o Flt-1_{D2} e o da direita ao VEGF com o v107. Apenas os resíduos do VEGF são mostrados e os valores referem-se à média entre as duas cadeias. As intensidades dos fatores-B são dadas pela legenda no

- canto inferior direito. Abaixo de cada painel está um gráfico de RMSD em que a linha preta refere-se ao RMSD calculado sobre os átomos de $C\alpha$ e a linha cinza ao RMSD calculado sobre todos os átomos. O RMSD médio de todos os 40 blocos é mostrado no painel inferior esquerdo..... 69
- Figura 5.8: Mapas de correlação dinâmica cruzada (DCCMs). As correlações (isto é, valores positivos) estão mostradas abaixo e as anticorrelações (isto é, valores negativos), acima da diagonal. Os coeficientes de correlação foram calculados efetuando-se a média de 5 blocos consecutivos de 1000 ps sobre os últimos 5 ns da trajetória. São mostrados apenas os coeficientes com módulo acima de 0,3. (a) VEGF livre, (b) VEGF_Flt-1_{D2}, (c) VEGF_v107 e (d) VEGF_v107_{mut}..... 71
- Figura 5.9: Gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo. Os painéis superiores correspondem à análise sobre o espaço completo (isto é, incluindo todos os autovetores) e os painéis inferiores ao espaço considerado essencial (isto é, incluindo somente os primeiros 10 autovetores). As linhas contínuas correspondem à sobreposição entre autovetores do mesmo sistema, mas diferentes subpartes de 2500 ps. As linhas não contínuas correspondem à sobreposição dos autovetores do VEGF complexado com o VEGF livre, sendo que as linhas pontilhadas e tracejadas correspondem, respectivamente, à primeira e à segunda subpartes..... 74
- Figura 5.10: Estruturas extremas obtidas da projeção de cada trajetória no primeiro modo de movimento correspondente. 75
- Figura 6.1: As elipses em vermelho mostram as ligações dissulfeto entre monômeros. Elas são formadas pelos resíduos Cys51 de um monômero e Cys60 do outro. Os mutantes C51A/C60A* e C51S/C60S* foram construídos para apresentarem somente uma dessas ligações dissulfeto. As elipses em azul mostram as ligações dissulfeto formadas pelos resíduos Cys57 e Cys102 e as elipses em verde mostram as ligações formadas por Cys61 e Cys104. 83
- Figura 6.2: (a) RMSD dos átomos de $C\alpha$, (b) raio de giro, (c) área superficial acessível ao solvente (SASA) dos sistemas cujo ponto de partida foi a estrutura do VEGF modificada. A legenda no canto superior direito relaciona as cores aos sistemas.. 85
- Figura 6.3: (a) RMSD dos átomos de $C\alpha$, (b) raio de giro, (c) área superficial acessível ao solvente (SASA) dos sistemas cujo ponto de partida foram estruturas cristalográficas. A legenda no canto superior direito relaciona as cores aos sistemas..... 86
- Figura 6.4: Sobreposição de estruturas médias de dinâmica molecular e estruturas cristalográficas. (a) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C51A/C60A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C51A/C60A em vermelho. (b) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C57A/C102A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C57A/C102A em vermelho. (c) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C61A/C104A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C61A/C104A em vermelho. (d) Estrutura cristalográfica do VEGF em

- preto, estrutura média do mutante C51A/C60A* em azul, e estrutura média do mutante C51S/C60S* em amarelo. 87
- Figura 6.5: Evolução temporal do número de ligações de hidrogênio para cada sistema. (a) proteína/proteína; (b) cadeia-principal/cadeia-principal; (c) cadeia-lateral/cadeia-lateral; (d) cadeia-1/cadeia-2 (entre cadeias); (e) cadeia-1/cadeia-1; e (f) cadeia-2/cadeia-2..... 91
- Figura 6.6: Os três painéis na parte superior da figura mostram a evolução temporal dos fatores-B coletados de janelas consecutivas de 250 ps. O painel da esquerda refere-se ao C51A/C60A, o do meio ao C57A/C102A e o da direita ao C61A/C104A. Os valores referem-se à média entre as duas cadeias. As intensidades dos fatores-B são dadas pela legenda no canto inferior direito. Abaixo de cada painel está um gráfico de RMSD calculado sobre os átomos de C α . O RMSD médio de todos os 40 blocos aparece no painel inferior esquerdo. 94
- Figura 6.7: Os três painéis na parte superior da figura mostram a evolução temporal dos fatores-B coletados de janelas consecutivas de 250 ps. O painel da esquerda refere-se ao C51A/C60A[§], o do meio ao C57A/C102A[§] e o da direita ao C61A/C104A[§]. Os valores referem-se à média entre as duas cadeias. As intensidades dos fatores-B são dadas pela legenda no canto inferior direito. Abaixo de cada painel está um gráfico de RMSD calculado sobre os átomos de C α . O RMSD médio de todos os 40 blocos aparece no painel inferior esquerdo..... 95
- Figura 6.8: Gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo para as simulações dos mutantes construídos a partir da estrutura do VEGF. As linhas pretas correspondem à sobreposição entre autovetores do mesmo sistema, mas diferentes subpartes de 2500 ps. As linhas vermelhas e verdes correspondem à sobreposição dos autovetores dos mutantes com o WT VEGF. 97
- Figura 6.9: Gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo para as simulações dos mutantes construídos a partir das suas estruturas cristalográficas correspondentes. As linhas pretas correspondem à sobreposição entre autovetores do mesmo sistema, mas diferentes subpartes de 2500 ps. As linhas vermelhas e verdes correspondem à sobreposição dos autovetores dos mutantes com o WT VEGF. 98
- Figura 7.1: Alinhamento das seqüências primárias dos receptores VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR). 102
- Figura 7.2: Estrutura do receptor KDR obtida por homologia antes (em verde) e depois (em marrom) da dinâmica molecular. 105
- Figura 7.3: Estrutura cristalográfica do complexo VEGF/Flt-1 mostrando a orientação do VEGF e das duas cópias do receptor Flt-1. 107
- Figura 7.4: Gráficos de RMSD dos fatores livres, receptores livres e dos complexos. (a) VEGF (em preto), VEGFB (em vermelho) e PIGF (em verde). (b) Flt-1 (em preto) e KDR (em vermelho). (c) VEGF/Flt-1 (em preto), VEGF/KDR (em vermelho),

VEGFB/Flt-1 (em verde), VEGFB/KDR (em azul), PlGF/Flt-1 (em amarelo) e PlGF/KDR (em marrom).....	109
Figura 7.5: Interfaces fator/receptor. Em cada quadro o receptor está mostrado à esquerda e o fator à direita. Os resíduos carregados aparecem na representação de esfera e bastão.....	112
Figura 7.6: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do VEGF livre, do VEGF complexado com o receptor Flt-1 e do VEGF complexado com receptor KDR.....	118
Figura 7.7: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do VEGFB livre, do VEGFB complexado com o receptor Flt-1 e do VEGFB complexado com receptor KDR.....	119
Figura 7.8: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do PlGF livre, do PlGF complexado com o receptor Flt-1 e do PlGF complexado com receptor KDR.....	120
Figura 7.9: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do receptor Flt-1 livre, do receptor Flt-1 complexado com VEGF, do receptor Flt-1 complexado com VEGFB e do receptor Flt-1 complexado com PlGF.	121
Figura 7.10: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do receptor KDR livre, do receptor KDR complexado com VEGF, do receptor KDR complexado com VEGFB e do receptor KDR complexado com PlGF.	122

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5-1: Estruturas iniciais usadas na simulação.....	51
Tabela 5-2: Número médio e desvio padrão de ligações de hidrogênio.	58
Tabela 5-3: Propriedades do primeiro autovetor da PCA.	76
Tabela 6-1: Valores médios (em nm) de RMSD entre estruturas obtidas das simulações de dinâmica molecular e estruturas cristalográficas.....	88
Tabela 6-2: Número médio e desvio padrão de ligações de hidrogênio.	92
Tabela 7-1: Estruturas iniciais dos complexos estudados nesse Capítulo.	103
Tabela 7-2: Número de ligações de hidrogênio que cada sistema faz com o solvente.	113
Tabela 7-3: Variação do número de ligações de hidrogênio após a formação do complexo.	114
Tabela 7-4: Número de ligações de hidrogênio com o solvente de cada espécie individual no complexo.	115
Tabela 7-5: Variação do número de ligações de hidrogênio com solvente da espécie individual sob a formação do complexo.....	116
Tabela 7-6: Número de ligações de hidrogênio entre o fator e o receptor em cada complexo.	117
Tabela 7-7: Área superficial acessível ao solvente (SASA) em Å ²	123
Tabela 7-8: Área interfacial de cada complexo.....	124
Tabela 7-9: Área encoberta (BA: <i>buried area</i>) do receptor pelo fator.	125
Tabela 7-10: Área encoberta (BA: <i>buried area</i>) do fator pelo receptor.	126

SUMÁRIO

1 – Introdução	i
1.1 – Classificação biológica do VEGF	3
1.2 - Atividades biológicas do VEGF.....	3
1.3 - Propriedades dos receptores de VEGF	5
1.3.1 - Flt-1 (VEGFR-1)	5
1.3.2 - KDR (VEGFR-2).....	7
1.3.3 - Flt-4 (VEGFR-3)	7
1.4 - Aspectos estruturais do VEGF	7
1.5 - Aspectos estruturais dos receptores de VEGF	8
1.6 - Importância terapêutica	10
2 – Objetivo geral.....	11
3 – Aspectos teóricos	12
3.1 – Escolha do sistema de coordenadas.....	14
3.2 - Análise de movimentos correlacionados através de mapas de correlação dinâmica cruzada (DCCM).....	17
3.3 – Análise de modos normais	19
3.4 - Análise de componentes principais (PCA)	25
4 - Comportamento dinâmico do VEGF em solução	29
4.1 – Introdução	29
4.2 – Objetivos	31
4.3 – Detalhes computacionais.....	32

4.3.1 - Estrutura inicial	32
4.3.2 - Dinâmica molecular.....	32
4.3.3 - Análise de movimentos correlacionados	34
4.3.4 - Análise de componentes principais	34
4.4 - Resultados e discussão	35
4.4.1 - Estabilidade da simulação.....	35
4.4.2 - Flutuações atômicas.....	37
4.4.3 - Amplitude dos movimentos	38
4.4.4 - Movimentos coletivos.....	40
4.4.5 - Análise de componentes principais	45
4.5 - Conclusões	48

5 - O efeito da complexação com receptor e inibidor na estrutura e na dinâmica do VEGF..... 49

5.1 - Introdução	49
5.2 - Objetivos.....	50
5.3 - Detalhes computacionais	50
5.3.1 - Estruturas iniciais	50
5.3.2 - Dinâmica molecular.....	52
5.3.3 - Análise de movimentos correlacionados	52
5.3.4 - Análise de componentes principais	53
5.4 - Resultados e discussão	53
5.4.1 - Estabilidade das simulações.....	53
5.4.2 - Análise estrutural.....	54
5.4.3 - Interações entre o VEGF e o receptor Flt-1 _{D2}	58

5.4.4 - Interações entre o VEGF e peptídeos inibidores	62
5.4.5 - Análise de cadeias laterais	66
5.4.6 - Flutuações atômicas.....	68
5.4.7 - Movimentos coletivos.....	70
5.4.8 - Análise de componentes principais	71
5.5 – Conclusões	76
6 - O papel do nó de cistina na estrutura e na dinâmica do VEGF	79
6.1 – Introdução	79
6.2 - Objetivos.....	81
6.3 - Detalhes computacionais	81
6.3.1 - Estruturas iniciais	81
6.3.2 - Dinâmica molecular e análises posteriores	83
6.4 - Resultados e discussão	84
6.4.1 - Estabilidade das simulações.....	84
6.4.2 - Análise Estrutural	86
6.4.3 - Ligações de hidrogênio.....	90
6.4.4 - Flutuações atômicas.....	93
6.4.5 - Análise de componentes principais	96
6.5 – Conclusões	98
7 - Modelagem e dinâmica molecular de complexos VEGF/VEGFR: investigação da seletividade na ativação de receptores de angiogênese	100
7.1 – Introdução	100
7.2 - Objetivos.....	101

7.3 - Detalhes computacionais	101
7.3.1 - Modelagem do receptor KDR	102
7.3.2 - Modelagem dos complexos.....	103
7.3.3 - Estruturas iniciais das proteínas livres.....	104
7.3.4 - Dinâmica molecular.....	104
7.3.5 - Análise de área superficial acessível ao solvente.....	104
7.4 - Resultados e discussão	105
7.4.1 - Modelo do KDR e validação.....	105
7.4.2 – Análise geral dos complexos.....	106
7.4.3 - Estabilidade das simulações.....	108
7.4.4 - Análise visual das interações iônicas.....	109
7.4.5 - Análise de ligações de hidrogênio.....	112
7.4.6 - Análise de superfícies moleculares	117
7.5 – Conclusões	126
8 – Conclusões Gerais	128
9 – Perspectivas.....	130
10 – Referências Bibliográficas.....	131

1 – Introdução

A observação de que tumores transplantados induzem forte resposta vascular, no sentido de formação de novos vasos (o fenômeno conhecido pelo nome de angiogênese), culminou no postulado de que existiriam reguladores de angiogênese (FERRARA, 2003). Posteriormente, muitos fatores foram descobertos e relacionados com a regulação positiva da angiogênese, como o fator de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF: *acidic fibroblast growth factor*), o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF: *basic fibroblast growth factor*), o fator de crescimento de transformação (TGF: *transforming growth factor*)- α , TGF- β , o fator de crescimento de hepatócito (HGF: *hepatocyte growth factor*), o fator de necrose tumoral- α , a angiogenina, a interleucina-8 e as angiopoietinas (FOLKMAN, 1992; YANCOPOULOS, 2000; FERRARA, 2003; FOLKMAN, 2006).

Desde a descoberta do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF: *vascular endothelial growth factor*, ou VEGFA) (SENGER, 1983), mais de 7160 artigos com a sigla VEGF no título foram publicados em periódicos indexados (pesquisa realizada na base de dados do *Web of Science* em 10/12/2007). Isto reflete a intensa investigação da biologia deste fator de crescimento, principalmente relacionada com o fenômeno da angiogênese (uma excelente revisão sobre esta proteína foi publicada por Ferrara (FERRARA, 2002)). Nos últimos dez anos, o melhor entendimento da angiogênese, permitiu classificá-la como um processo altamente complexo e coordenado, que envolve a ativação de uma série de receptores (CARMELIET, 2000; YANCOPOULOS, 2000; ADAMS, 2007). Entretanto, a sinalização de VEGF é a etapa crítica do processo da angiogênese fisiológica e, ao que tudo indica, da angiogênese patológica também (FERRARA, 1997; CARMELIET, 2005).

1.1 – Classificação biológica do VEGF

O VEGF é expresso em mamíferos e pertence à família dos fatores de crescimento vascular endotelial que inclui outros membros, como o fator de crescimento de placenta (PIGF: *placental growth factor*) (DE FALCO, 2002), VEGFB (OLOFSSON, 1996), VEGFC e VEGFD (HE, 2004). Outros fatores homólogos foram encontrados em organismos inferiores, como por exemplo o VEGFE, identificado no genoma do vírus *Orf* (OGAWA, 1998).

A família dos fatores de crescimento vascular endotelial, por sua vez, insere-se na superfamília do nó de cistina (*cystine knot*), caracterizada pela presença de três ligações dissulfeto muito conservadas (MCDONALD, 1993). A família dos fatores de crescimento de nervos (NGF: *nerve growth factor*) (MCDONALD, 1991) e a família dos fatores de crescimento de transformação (TGF: *transforming growth factor*)- β (SCHLUNEGGER, 1992) são, também, subfamílias da superfamília do nó de cistina.

1.2 - Atividades biológicas do VEGF

A principal atividade biológica do VEGF é a promoção do crescimento e maturação de células endoteliais vasculares derivadas de artérias, veias ou vasos linfáticos (HOEBEN, 2004). O VEGF é um potente indutor da angiogênese e isso pode ser comprovado em vários modelos *in vitro* (FERRARA, 1997) e *in vivo* (LEUNG, 1989; PLOUET, 1989).

Outras atividades biológicas também são induzidas pelo VEGF. VEGF estimula a produção de surfactantes por células alveolares do tipo II (COMPERNOLLE, 2002) e é

um fator de sobrevivência das células endoteliais, prevenindo a apoptose pela indução da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e A1 nessas células (GERBER, 1998a; GERBER, 1998b). Os efeitos de sobrevivência conferidos pelo VEGF relacionam-se à fase de desenvolvimento do organismo. A inibição do VEGF resulta em apoptose em ratos recém-nascidos, mas não atinge ratos adultos (GERBER, 1999a). De forma análoga, existe maior dependência de VEGF nas células endoteliais de vasos sanguíneos recém-formados em tumores, mas não dos já bem estabelecidos, o que sugere que o aparecimento de pericitos no recobrimento do vaso é um dos eventos determinantes da perda da dependência do VEGF (BENJAMIN, 1999).

VEGF promove quimiotaxia (isto é, o movimento orientado de células ou organismos induzido por agentes químicos) de monócitos (CLAUSS, 1990) e induz a formação de colônias de células progenitoras de macrófagos (BROXMEYER, 1995). Em camundongos adultos, VEGF inibe o desenvolvimento de células dendríticas (GABRILOVICH, 1996) e estimula a produção de células B e a geração de células mielóides imaturas (HATTORI, 2001). VEGF é também responsável pela sobrevivência de células tronco hematopoiéticas durante o processo de repopulação dessas células (GERBER, 2002).

Como tem a capacidade de promover vazamento vascular, o VEGF também é conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF: *vascular permeability factor*) (SENGER, 1983; DVORAK, 1995). Essa capacidade de aumentar a permeabilidade vascular relaciona-se a processos inflamatórios e outras patologias (ROBERTS, 1995).

Sabe-se, também, da participação do VEGF em processos como a vasodilatação, a taquicardia, a hipotensão e a diminuição do déficit cardíaco (KU, 1993; YANG, 1996).

1.3 - Propriedades dos receptores de VEGF

Os receptores dos fatores de crescimento vascular endotelial são expressos em células endoteliais vasculares e em células derivadas da medula óssea (FERRARA, 1997). Eles pertencem à família dos receptores de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR: *platelet-derived growth factor receptor*) (VAN DER GREER, 1994). O VEGFA (ou simplesmente VEGF) é capaz de ativar dois receptores do tipo tirosina quinase (EC 2.7.10.1), o receptor Flt-1 (*fms like tyrosine kinase receptor*) também conhecido por VEGFR-1 e o receptor KDR (*kinase domain region* ou Flk-1) também conhecido por VEGFR-2 (Figura 1.1). O receptor Flt-4 (ou VEGFR-3) é também um membro da família de receptores de VEGF, mas não é um receptor da VEGFA, sendo ativado pelos fatores VEGFC e VEGFD. Além dos receptores do tipo tirosina quinase, VEGFA pode também interagir com uma família de co-receptores, as neuropilinas (FERRARA, 2003).

1.3.1 - Flt-1 (VEGFR-1)

O receptor Flt-1 (DE VRIES, 1992) pode ser ativado por VEGF, PlGF e VEGFB (Figura 1.1). Existe uma forma solúvel do domínio extracelular do Flt-1 que serve como regulador negativo da atividade do VEGF, isto é, inibe competitivamente sua atividade para com os receptores de membrana (Figura 1.1). A região que se liga ao VEGF é essencialmente composta pelos domínios extracelulares-2 e -3 (WIESMANN, 1997).

A ativação do Flt-1 pelo VEGF não gera resposta biológica significativa em células endoteliais. Por isso, acredita-se que o Flt-1 serve como regulador negativo da

atividade do VEGF nesse tipo de célula. Quando o PlGF, que não é capaz de ativar o receptor KDR, é introduzido concomitantemente com o VEGF, observa-se o aumento da resposta biológica pelo favorecimento da complexação do VEGF com KDR. Em outros tipos de célula, o receptor Flt-1 tem resposta biológica significativa. Sua ativação está relacionada com a migração de monócitos, com a produção de metaloproteinases de matriz e com o espalhamento metastático em tumores malignos (FERRARA, 2003; YAMAZAKI, 2006).

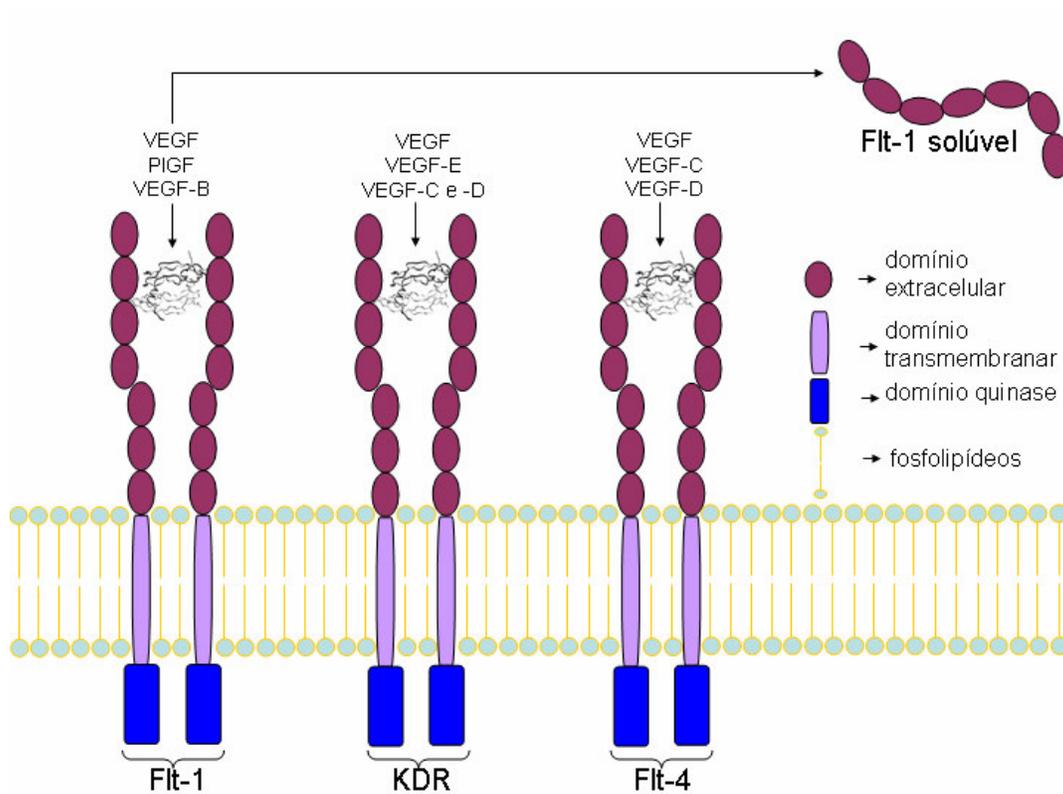


Figura 1.1: Representação esquemática da ativação diferencial dos três diferentes receptores de fatores de crescimento vascular endotelial.

1.3.2 - KDR (VEGFR-2)

O receptor KDR (TERMAN, 1992) pode ser ativado por VEGF, VEGFC, VEGFD e VEGFE (Figura 1.1). Este receptor é o principal mediador dos efeitos de mitogênese, de angiogênese e do aumento de permeabilidade vascular devido à ação do VEGF (FERRARA, 2003; SHIBUYA, 2006; YAMAZAKI, 2006).

1.3.3 - Flt-4 (VEGFR-3)

O receptor Flt-4 pode ser ativado por VEGFC e VEGFD. Sua ativação relaciona-se à proliferação de vasos linfáticos, a linfoangiogênese, processo intimamente relacionado ao espalhamento metastático de tumores malignos (HE, 2004).

1.4 - Aspectos estruturais do VEGF

O VEGF é funcional na forma de um homodímero, no qual os monômeros estão ligados covalentemente por duas ligações dissulfeto (códigos PDB: 1VPF e 2VPF) (MULLER, 1997a; MULLER, 1997b). Além das ligações dissulfeto entre os monômeros, três outras ligações dissulfeto, características do nó de cistina, ocorrem em cada monômero (Figura 1.2). Na Figura 1.2, as três alças que ligam as fitas- β estão numeradas. É importante, também, enfatizar que os pólos do VEGF (regiões compreendidas nas circunferências) contêm os resíduos importantes para a complexação

ao receptor. Estes resíduos pertencem às alças, às porções extremas das fitas- β e às regiões terminais.

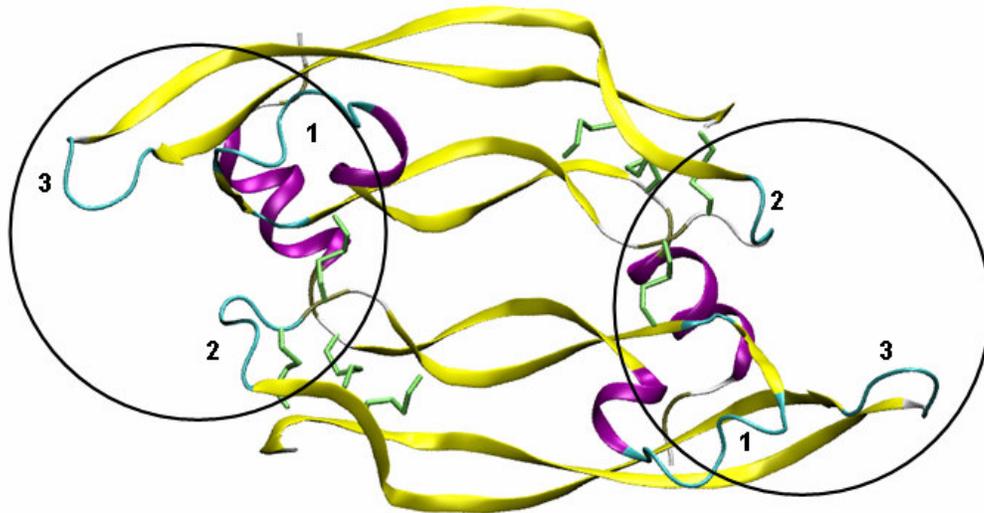


Figura 1.2: Estrutura cristalográfica do VEGF determinada numa resolução de 1,93 Å (código PDB: 1VPF) (MULLER, 1997b). As ligações dissulfeto estão em verde. Os dois pólos são identificados por circunferências. Cada pólo inclui as alças-1 e -3 de um mesmo monômero, a alça-2 do outro monômero, resíduos extremos das fitas- β , e alguns resíduos das regiões terminais.

1.5 - Aspectos estruturais dos receptores de VEGF

Os receptores de VEGF são muito semelhantes. Os três receptores (Flt-1, KDR e Flt-4) têm sete domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, uma região transmembrana e um domínio tirosina quinase intracelular (RUCH, 2007). Dois dos domínios têm estruturas cristalográficas disponíveis no PDB. O domínio-2 extracelular do receptor Flt-1 tem duas folhas- β em um enovelamento conhecido como “sanduíche”

(Figura 1.3) (códigos PDB: 1FLT, 1QSV, 1QSZ, 1QTY, 1RV6) (WIESMANN, 1997; STAROVASNIK, 1999; CHRISTINGER, 2004). A estrutura do domínio intracelular do receptor KDR é característica de uma quinase de membrana convencional (Figura 1.3) (códigos PDB: 1VR2, 2P2H, 2P2I, 2QU5, 1Y6A, 1Y6B, 1YWN, 2QU6, 2OH4) (MCTIGUE, 2000; HARRIS, 2005; MIYAZAKI, 2005; HASEGAWA, 2007; HODOUS, 2007; POTASHMAN, 2007). A Figura 1.3 mostra um esquema de um receptor que inclui algumas partes cujas estruturas já foram determinadas. Esse modelo foi montado com uma parte do receptor Flt-1 (domínio-2) e uma parte do receptor KDR (domínio intracelular), portanto não corresponde a um receptor verdadeiro, mas que é útil na visualização visto que os receptores são muito semelhantes.

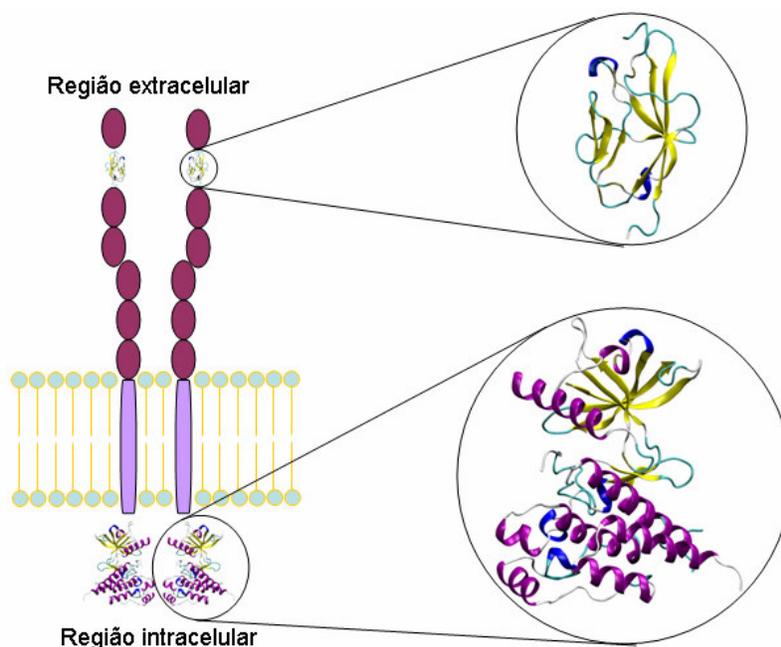


Figura 1.3: Esquema de um receptor de VEGF. Na região extracelular existem sete domínios do tipo imunoglobulina, sendo que o domínio-2 do receptor Flt-1 já teve a estrutura cristalográfica determinada. O segmento transmembranar está mostrado em lilás. Na região intracelular, vê-se o domínio quinase, que para o KDR, já teve a estrutura cristalográfica determinada.

1.6 - Importância terapêutica

A atividade do VEGF relaciona-se com diversos processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário (CARMELIET, 1996; FERRARA, 1996), crescimento do esqueleto (GERBER, 1999b), ovulação (FERRARA, 1998) e direcionamento de axônios neuronais (GRIDLEY, 2007). VEGF também se relaciona com patologias como o desenvolvimento de tumores sólidos (KIM, 1993; CARMELIET, 2005; DE CASTRO, 2006) e de cânceres hematológicos (GERBER, 2003); retinopatia diabética e outros distúrbios intraoculares (AIELLO, 1994; MALECAZE, 1994; AIELLO, 1995); patologias do sistema reprodutivo feminino (MCLAREN, 1996); inflamações (DVORAK, 1995; DETMAR, 1998) e edemas cerebrais (KOVACS, 1996).

Visto o grande número de processos aos quais o VEGF está intimamente relacionado, tem-se buscado cada vez mais a modulação racional deste fator. A inibição do VEGF ou de seus receptores faz parte da chamada terapia anti-angiogênica (CARMELIET, 2005; TABRUYN, 2007) e a indução de VEGF ou de seus receptores faz parte da abordagem conhecida como terapia pró-angiogênica (FERRARA, 2005; BALASUBRAMANIAN, 2006). A terapia anti-angiogênica é desejada nos casos onde o processo de angiogênese está ocorrendo por motivos patológicos, como no câncer por exemplo (FOLKMAN, 2006). A terapia pró-angiogênica é desejada nos casos em que a angiogênese pode ter característica “benéfica”, como, por exemplo, em isquemias do miocárdio (FERRARA, 2005).

2 – Objetivo geral

Tendo em vista a importância do fator de crescimento vascular endotelial em diversos processos fisiológicos e patológicos, o objetivo geral dessa tese é:

- Investigar, no nível molecular e pelo uso de métodos computacionais, fatores estruturais e dinâmicos que possam estar envolvidos com a atividade do VEGF no processo de angiogênese.

3 – Aspectos teóricos

Diversos métodos computacionais foram empregados no decorrer desta tese. Dentre eles, pode-se destacar: (i) simulações por dinâmica molecular (MD: *molecular dynamics*) (ALLEN, 1987; MCCAMMON, 1987; FRENKEL, 1996) e (ii) modelagem estrutural de proteínas por homologia (HILLISCH, 2004; NAYEEM, 2006). Estes métodos são de uso comum e encontram-se bem descritos na literatura.

O principal foco desta tese foi estudar o comportamento dinâmico do VEGF. Com este propósito, simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para gerar trajetórias dos sistemas em equilíbrio. As flutuações atômicas e as correlações entre flutuações atômicas foram analisadas. Os métodos de análise de correlações entre flutuações atômicas têm sido empregados desde a década de 80, mas a hipótese de que movimentos correlacionados ou coletivos possam estar envolvidos e, até que ponto, com a função das proteínas é ainda muito discutida na literatura (WAGNER, 1978; BROOKS, 1985; SMITH, 1987; CUSACK, 1988; ASTUMIAN, 1989; BAHAR, 1999; THOMAS, 1999; LEE, 2000; MULDER, 2001; ROZOVSKY, 2001a; ROZOVSKY, 2001b; TAMA, 2001; VOLKMAN, 2001; AGARWAL, 2002; CARLSON, 2002; EISENMESSER, 2002; SUTCLIFFE, 2002; BENKOVIC, 2003; PALMER, 2004; WOLF-WATZ, 2004; EISENMESSER, 2005; HUANG, 2005; KARPLUS, 2005; PALMER, 2006; VENDRUSCOLO, 2006; GREENLEAF, 2007).

Na análise do comportamento dinâmico de proteínas, um passo importante é a caracterização de movimentos lentos de grande amplitude. Esses movimentos têm natureza coletiva e representam mudanças conformacionais potencialmente essenciais para a função das proteínas. Apenas movimentos coletivos globais podem modificar de

forma significativa a superfície externa da proteína e, portanto, sua interação com o meio. A dinâmica de proteínas envolve uma escala de tempo que pode ir de 10^{-14} segundo até dezenas de segundos (ALEXANDROV, 2005). Os movimentos coletivos, de possível importância funcional, dão-se em uma escala de tempo de difícil acesso por métodos teóricos dependentes do tempo (dinâmica molecular, por exemplo). Portanto, na tentativa de entender o mecanismo de movimentos de larga amplitude de proteínas, pode-se proceder aproximando-se a distribuição de probabilidade configuracional por uma função analítica obtida de um modelo independente do tempo.

As análises de movimentos coletivos em proteínas podem ser feitas de diversas formas. Uma abordagem que foi e ainda é amplamente utilizada é a de modos normais (NM: *normal modes*) (BROOKS, 1983; GO, 1983; BROOKS, 1985; LEVITT, 1985; GIBRAT, 1990; HAYWARD, 1995; VALADIE, 2003; ALEXANDROV, 2005), na qual, a estrutura da proteína é, primeiramente, otimizada no vácuo por métodos de minimização de energia e, em seguida, a matriz hessiana é calculada e diagonalizada. Os auto-vetores da matriz hessiana fornecem modos normais com valores de frequência dados pelos auto-valores correspondentes. Abordagens simplificadas, que utilizam a estrutura cristalográfica como referência e fatores-B experimentais, como o modelo de redes gaussianas (GNM: *gaussian network model*) (BAHAR, 1999), modelo de redes anisotrópicas (ANM: *anisotropic network model*) (ATILGAN, 2001), e o recente modelo de Hamacher et al. (EANM: *extended anisotropic network model*) (HAMACHER, 2006) foram introduzidas para economizar tempo de computação na obtenção dos movimentos coletivos. Outras abordagens baseiam-se no cálculo da matriz de covariância entre flutuações atômicas. Dentre esses métodos, pode-se destacar: a análise de mapas de correlação dinâmica cruzada (DCCM: *dynamical cross-correlation map*) (ICHIYE, 1991; HÜNENBERGER, 1995; ESTABROOK, 2005), a análise de

componentes principais (PCA: *principal component analysis*) (AMADEI, 1993; HAYWARD, 1995; SCHEEK, 1995; VANAALTEN, 1995a; VANAALTEN, 1995b; AMADEI, 1996; DEGROOT, 1996a; DEGROOT, 1996b; CHILLEMI, 1997; VANAALTEN, 1997; AMADEI, 1999a; AMADEI, 1999b; ZHANG, 2006; LIU, 2007; MESENTEAN, 2007; PINEDA, 2007) e a análise quasi-harmônica (QH: *quasi-harmonic*) (KARPLUS, 1981; LEVY, 1984; IRIKURA, 1985; KARPLUS, 1987; DIXIT, 2005; BARON, 2006a; BARON, 2006b; DOLENC, 2006).

No decorrer deste trabalho, foram utilizadas as análises DCCM e PCA. O restante do presente capítulo destina-se à descrição desses métodos de análise. Primeiramente, será discutida a escolha do sistema de coordenadas. Em seguida, será introduzida a análise DCCM. Em um terceiro tópico, a análise de modos normais que, apesar de não ter sido empregada, será descrita por motivos de comparação e similaridade matemática com o PCA. Por último, será introduzida a análise de componentes principais (PCA).

Os formalismos matemáticos utilizados foram adaptados de: (i) Hünenberger e colaboradores que fazem uma descrição crítica de análise de movimentos coletivos por flutuações e correlações (HÜNENBERGER, 1995); (ii) da excelente tese de doutorado de Riccardo Baron que apresenta uma descrição matemática geral da análise de modos normais, da dinâmica essencial e da análise quasi-harmônica (BARON, 2006a); (iii) do artigo introdutório à dinâmica essencial de proteínas de Amadei e colaboradores (AMADEI, 1993).

3.1 – Escolha do sistema de coordenadas

O objetivo da análise de movimentos coletivos de uma macromolécula é a descrição de seus movimentos intrínsecos. Em outras palavras, apenas os graus de liberdade internos devem ser incluídos na análise, desprezando-se dessa forma os movimentos de translação e rotação. Pode-se realizar a análise em coordenadas internas ou em coordenadas Cartesianas. No primeiro caso, translações e rotações são excluídas automaticamente, porém três desvantagens dificultam a análise: (i) o uso de coordenadas internas complica a implementação computacional do método; (ii) uma aproximação deve ser feita para tornar o Jacobiano associado à transformação de coordenadas internas em Cartesianas (tensor massa-métrico) independente da configuração do sistema (ver Seção 3.3); (iii) a escolha de um conjunto não-redundante de coordenadas não é única e afeta o resultado; e (iv) algumas coordenadas internas são periódicas e sua representação por um oscilador harmônico centrado em um único mínimo é questionável. Por outro lado, a análise em coordenadas Cartesianas também está sujeita a problemas: (i) não existe uma única forma, ou, pelo menos, uma forma mais adequada do ponto de vista formal para a remoção dos movimentos globais de translação e rotação a partir das configurações amostradas durante a simulação de uma macromolécula; (ii) a estrutura molecular média (estrutura de equilíbrio no modelo harmônico) pode ser menos realística em termos de coordenadas Cartesianas depois da remoção dos movimentos globais de translação e rotação em comparação com a estrutura em coordenadas internas; (iii) os diferentes termos de energia potencial do campo de forças são geralmente associados com coordenadas internas específicas, o que torna mais natural a escolha por coordenadas internas (BARON, 2006a).

As análises descritas nesta tese foram feitas em coordenadas Cartesianas. Desta forma, como a análise se restringe a um sistema ligado (isto é, não difusivo), é necessário remover os movimentos de translação globais (do centro de massa) da

macromolécula. A retirada dos movimentos de rotação da macromolécula é, em princípio, desnecessária. Entretanto, sob o ponto de vista prático, ela é recomendável porque a rotação da molécula em torno do centro de massa é um movimento muito correlacionado e é interpretado como a sobreposição de movimentos harmônicos descorrelacionados ao longo das coordenadas Cartesianas individuais. Sob o ponto de vista da entropia, um movimento que, por sua natureza, deveria corresponder a uma contribuição entrópica pequena é interpretado como um movimento que corresponde à contribuições entrópicas muito grandes. Isto significa que quando as rotações em torno do centro de massas não são removidas, movimentos espúrios são incorporados à análise. Além disso, o tempo de giro de uma macromolécula em torno do centro de massa é geralmente longo, portanto, os movimentos de rotação globais não são amostrados de forma acurada nas simulações com escalas de tempo hoje usualmente possíveis (BARON, 2006a). Entretanto, não existe uma forma única de separar a rotação global de uma molécula dos seus graus de liberdade internos (ECKART, 1935), o que torna esse procedimento arbitrário (SCHIEBORR, 2001). Usualmente, a remoção dos movimentos de translação e rotação é feita por ajuste dos mínimos quadrados das posições atômicas (*atom-positional least-square fitting*) de estruturas coletadas de forma sucessiva de uma trajetória de MD sobre uma estrutura de referência (SCHÄFER, 2000; DOLENC, 2006). Hünenberger e colaboradores mostraram que apenas os átomos com flutuações atômicas de pequeno valor, isto é, os que pertencem às regiões mais rígidas da macromolécula, devem ser utilizados para o ajuste, pois a utilização de átomos das regiões flexíveis da macromolécula introduzem correlações artificiais (HÜNENBERGER, 1995). De forma alternativa, as simulações podem ser realizadas com constrição roto-translacional (AMADEI, 2000).

3.2 - Análise de movimentos correlacionados através de mapas de correlação dinâmica cruzada (DCCM)

Vários estudos anteriores utilizaram mapas de correlação dinâmica cruzada (DCCM) para analisar movimentos correlacionados em proteínas (ICHIYE, 1991; HARTE, 1992; HÜNENBERGER, 1995; RADKIEWICZ, 2000; ZOETE, 2004; ESTABROOK, 2005; MAZUMDER-SHIVAKUMAR, 2005; DE OLIVEIRA, 2007).

Consideremos $\mathbf{r}_i(t)$ e $\mathbf{r}_j(t)$ como os vetores posição no tempo t de dois átomos i e j da estrutura (já considerando a remoção dos movimentos de translação e rotação em torno do centro de massa). O elemento da matriz de covariância, c_{ij} , é dado por

$$c_{ij} = \langle \Delta \mathbf{r}_i \bullet \Delta \mathbf{r}_j \rangle = \langle (\mathbf{r}_i - \langle \mathbf{r}_i \rangle) (\mathbf{r}_j - \langle \mathbf{r}_j \rangle) \rangle = \langle \mathbf{r}_i \mathbf{r}_j \rangle - \langle \mathbf{r}_i \rangle \langle \mathbf{r}_j \rangle =$$

$$= \frac{\Delta t}{t_{m\u00e9dia}} \left[\sum_{t=0}^{t_{m\u00e9dia} - \Delta t} \mathbf{r}_i(t) \mathbf{r}_j(t) - \frac{\Delta t}{t_{m\u00e9dia}} \left(\sum_{t=0}^{t_{m\u00e9dia} - \Delta t} \mathbf{r}_i(t) \right) \times \left(\sum_{t=0}^{t_{m\u00e9dia} - \Delta t} \mathbf{r}_j(t) \right) \right]$$

Equação 1

em que $\Delta \mathbf{r}_i$ e $\Delta \mathbf{r}_j$ correspondem aos vetores deslocamento dos átomos i e j , respectivamente. A dimensão dessa matriz de covariância é, portanto, $N \times N$ (em que N é o número de átomos considerados na análise), diferentemente da matriz de covariância que será descrita na seção 3.4. Os colchetes angulares, $\langle \rangle$, definem médias temporais. O intervalo de tempo para o qual as médias são calculadas é dado por $t_{m\u00e9dia}$ e Δt corresponde ao intervalo de tempo entre duas configurações.

Cada elemento da diagonal da matriz de covariância, índice $i = j$, corresponde à flutuação média quadrática do i -ésimo átomo. As flutuações atômicas podem ser convertidas em fatores-B (isotrópicos) simulados, B_i , pela relação abaixo

$$B_i = \left(\frac{8\pi^2}{3} \right) c_{ii} = \left(\frac{8\pi^2}{3} \right) (\langle \mathbf{r}_i^2 \rangle - \langle \mathbf{r}_i \rangle^2) \quad \text{Equação 2}$$

A normalização da matriz de covariância origina a matriz de correlação dinâmica cruzada (\mathbf{C}_{ij}), cujos elementos são dados por

$$C_{ij} = \frac{c_{ij}}{c_{ii}^{1/2} c_{jj}^{1/2}} = \frac{\langle \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{r}_j \rangle - \langle \mathbf{r}_i \rangle \langle \mathbf{r}_j \rangle}{\left[(\langle \mathbf{r}_i^2 \rangle - \langle \mathbf{r}_i \rangle^2) (\langle \mathbf{r}_j^2 \rangle - \langle \mathbf{r}_j \rangle^2) \right]^{1/2}} \quad \text{Equação 3}$$

É importante notar que os coeficientes de correlação cruzada variam de -1 (movimentos completamente anticorrelacionados) a +1 (movimentos completamente correlacionados). Movimentos completamente anticorrelacionados têm a mesma direção e a mesma frequência de oscilação, porém sentidos opostos. Movimentos completamente correlacionados têm mesma direção, mesma frequência de oscilação e mesmo sentido. Ao contrário da matriz de covariância, a matriz de correlação dinâmica cruzada não contém informações sobre a magnitude dos movimentos, apenas do grau relativo de correlação envolvida. Nem a matriz de covariância entre os vetores deslocamento (matriz de covariância $N \times N$) nem a matriz de correlação dinâmica cruzada são capazes de incorporar correlações ortogonais, visto que se baseiam em um produto interno entre vetores de um espaço tridimensional. Portanto, dois átomos, mesmo que estejam oscilando com a mesma fase e o mesmo período ao longo de linhas perpendiculares terão coeficientes de covariância (e conseqüentemente, de correlação cruzada) iguais a zero.

3.3 – Análise de modos normais

Consideremos um sistema mecânico ligado formado por uma coleção de n partículas pontuais discretas, algumas delas podendo formar corpos rígidos. Para especificar o estado do sistema em um determinado instante, pode-se utilizar n vetores radiais. Em um espaço tridimensional, cada vetor radial consiste de três números (por exemplo, coordenadas retangulares) e, portanto, $3n$ quantidades devem ser especificadas para descrever a posição de todas as partículas. Caso existam equações de constrangimento, ou seja, equações que relacionam duas ou mais coordenadas (como, por exemplo, em um rotor rígido), nem todas as coordenadas são independentes. De fato, se existem m equações de constrangimento, $3n - m$ coordenadas são independentes e o sistema possui $3n - m$ graus de liberdade (THORNTON, 2004). Consideremos M' o número total de coordenadas do sistema ($3n$) e M o número de graus de liberdade ($3n - m$). O estado do sistema pode ser especificado por um vetor (de dimensão M) de coordenadas generalizadas $\mathbf{q} = \{q_m \mid m = 1 \dots M\}$. A relação entre as variações infinitesimais das coordenadas generalizadas, $d\mathbf{q}$, com as variações Cartesianas correspondentes, $d\mathbf{r}$, é definida pela matriz Jacobiana, $\underline{\mathbf{J}}_q$, de dimensão $M' \times M$

$$\underline{\mathbf{J}}_q(\mathbf{q}) = \frac{d\mathbf{r}(\mathbf{q}, d\mathbf{q})}{d\mathbf{q}}, \quad \text{Equação 4}$$

em que o subscrito q indica a dependência do Jacobiano com a escolha do sistema de coordenadas generalizadas.

Se a energia potencial depende apenas da configuração do sistema, o vetor momento conjugado \mathbf{p}_q (de dimensão M) associado com \mathbf{q} é dado por

$$\mathbf{p}_q = \underline{\mathbf{A}}_q(\mathbf{q})\dot{\mathbf{q}} \ , \quad \text{Equação 5}$$

em que o ponto sobre o vetor \mathbf{q} denota a derivada primeira de \mathbf{q} em relação ao tempo ($d\mathbf{q}/dt$), e $\underline{\mathbf{A}}_q$ corresponde ao tensor massa-métrico, dado por

$$\underline{\mathbf{A}}_q = \underline{\mathbf{J}}_q^T(\mathbf{q})\underline{\mathbf{M}}\underline{\mathbf{J}}_q(\mathbf{q}) \quad \text{Equação 6}$$

em que $\underline{\mathbf{M}}$ é a matriz diagonal de dimensões $M' \times M'$ que contém as massas de cada partícula, associadas com suas respectivas coordenadas Cartesianas, e o sobrescrito T indica a transposta de um vetor ou de uma matriz.

A energia cinética do sistema pode ser escrita como

$$\mathcal{K}(\mathbf{q}, \mathbf{p}_q) = \frac{1}{2} \mathbf{p}_q^T \underline{\mathbf{A}}_q^{-1}(\mathbf{q}) \mathbf{p}_q \quad \text{Equação 7}$$

A análise de modos normais considera que a superfície de energia potencial, $\mathbf{V}(\mathbf{q})$, na vizinhança de um ponto estacionário \mathbf{q}_0 pode ser aproximada pela função harmônica multivariável

$$V_h(\mathbf{q}) = \frac{1}{2} (\mathbf{q} - \mathbf{q}_0)^T \underline{\mathbf{H}}_q (\mathbf{q} - \mathbf{q}_0) \ , \quad \text{Equação 8}$$

em que $\underline{\mathbf{H}}_q$ é a matriz de constantes de força ou Hessiana (simétrica e com dimensão $M \times M$) que contém as derivadas segundas da energia potencial em relação aos pares de coordenadas generalizadas em \mathbf{q}_0 .

Reunindo as equações 7 e 8, a energia total do sistema, $\mathbf{H}(\mathbf{q}, \mathbf{p}_q)$, na vizinhança de \mathbf{q}_0 pode ser aproximada por

$$\mathcal{H}_h(\mathbf{q}, \mathbf{p}_q) = \frac{1}{2}(\mathbf{q} - \mathbf{q}_0)^T \underline{\mathbf{H}}_q (\mathbf{q} - \mathbf{q}_0) + \frac{1}{2} \mathbf{p}_q^T \underline{\mathbf{A}}_q^{-1}(\mathbf{q}) \mathbf{p}_q \quad \text{Equação 9}$$

com isso, a distribuição de probabilidade configuracional normalizada no *ensemble* canônico é dada por:

$$p_h(\mathbf{q}) = \frac{\int d\mathbf{p}_q e^{-\beta \mathcal{H}_h(\mathbf{q}, \mathbf{p}_q)}}{\int d\mathbf{q} d\mathbf{p}_q e^{-\beta \mathcal{H}_h(\mathbf{q}, \mathbf{p}_q)}} = \frac{|\underline{\mathbf{A}}_q(\mathbf{q})|^{1/2} e^{-\frac{1}{2}\beta(\mathbf{q}-\mathbf{q}_0)^T \underline{\mathbf{H}}_q (\mathbf{q}-\mathbf{q}_0)}}{\int d\mathbf{q} |\underline{\mathbf{A}}_q(\mathbf{q})|^{1/2} e^{-\frac{1}{2}\beta(\mathbf{q}-\mathbf{q}_0)^T \underline{\mathbf{H}}_q (\mathbf{q}-\mathbf{q}_0)}} \quad \text{Equação 10}$$

em que $\beta = (k_B T)^{-1}$, k_B é a constante de Boltzmann e T , a temperatura absoluta. A dependência do tensor massa-métrico $\underline{\mathbf{A}}_q$ com a configuração do sistema geralmente complica essa função de distribuição devido à integral no denominador. Essa dificuldade pode ser superada considerando que nas regiões da superfície de energia potencial na proximidade de \mathbf{q}_0 a matriz $\underline{\mathbf{A}}_q$ praticamente não depende da configuração, ou seja

$$\underline{\mathbf{A}}_q(\mathbf{q}) \approx \underline{\mathbf{A}}_q(\mathbf{q}_0) = \underline{\mathbf{A}}_q, \quad \text{Equação 11}$$

o que é razoável para oscilações pequenas em torno da configuração de equilíbrio.

Depois dessa aproximação, a energia total da equação 9 pode ser escrita como

$$\mathcal{H}_0(\mathbf{q}, \mathbf{p}_q) = \frac{1}{2}(\mathbf{q} - \mathbf{q}_0)^T \underline{\mathbf{H}}_q (\mathbf{q} - \mathbf{q}_0) + \frac{1}{2} \mathbf{p}_q^T \underline{\mathbf{A}}_q^{-1} \mathbf{p}_q . \quad \text{Equação 12}$$

Esse procedimento permite simplificar a função de distribuição da equação 10 para

$$p_0(\mathbf{q}) = \frac{e^{-\frac{1}{2}\beta(\mathbf{q}-\mathbf{q}_0)^T \underline{\mathbf{H}}_q (\mathbf{q}-\mathbf{q}_0)}}{\int d\mathbf{q} e^{-\frac{1}{2}\beta(\mathbf{q}-\mathbf{q}_0)^T \underline{\mathbf{H}}_q (\mathbf{q}-\mathbf{q}_0)}} . \quad \text{Equação 13}$$

Considere agora, a seguinte transformação no sistema de coordenadas

$$\mathbf{a}_q = \underline{\mathbf{U}}_q^T \underline{\mathbf{A}}_q^{1/2} (\mathbf{q} - \mathbf{q}_0) , \quad \text{Equação 14}$$

em que $\underline{\mathbf{U}}_q$ é uma matriz transformação, $M \times M$, ortogonal (i.e. com $\underline{\mathbf{U}}^T = \underline{\mathbf{U}}^{-1}$), que diagonaliza a inversa da matriz Hessiana ponderada pelo tensor massa-métrico:

$$\underline{\mathbf{U}}_q^T \underline{\mathbf{A}}_q^{1/2} \underline{\mathbf{H}}_q^{-1} \underline{\mathbf{A}}_q^{1/2} \underline{\mathbf{U}}_q = \beta \underline{\mathbf{E}}_q , \quad \text{Equação 15}$$

em que $\underline{\mathbf{E}}_q$ é a matriz de autovalores, diagonal, $M \times M$, amplificada por β^{-1} .

Os momentos generalizados associados com as novas coordenadas são dados por

$$\mathbf{p}_{a_q} = \dot{\mathbf{a}}_q = \underline{\mathbf{U}}_q^T \underline{\mathbf{A}}_q^{-1/2} \mathbf{p}_q . \quad \text{Equação 16}$$

A energia total pode ser reescrita no novo sistema de coordenadas como

$$\mathcal{H}'(\mathbf{a}_q, \mathbf{p}_{a_q}) = \frac{1}{2} \boldsymbol{\beta}^{-1} \mathbf{a}_q^T \underline{\mathbf{E}}_q^{-1} \mathbf{a}_q + \frac{1}{2} \mathbf{p}_{a_q}^T \mathbf{p}_{a_q} . \quad \text{Equação 17}$$

Escrevendo a equação de movimento em termos do formalismo de Hamilton:

$$-\dot{\mathbf{p}}_{a_q} = -\ddot{\mathbf{a}}_q = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \mathbf{a}_q} = \boldsymbol{\beta}^{-1} \underline{\mathbf{E}}_q^{-1} \mathbf{a}_q , \quad \text{Equação 18}$$

tem-se

$$\ddot{\mathbf{a}}_q + \boldsymbol{\beta}^{-1} \underline{\mathbf{E}}_q^{-1} \mathbf{a}_q = 0 , \quad \text{Equação 19}$$

uma equação diferencial ordinária de segunda ordem que corresponde ao movimento de m osciladores harmônicos independentes, cada um com frequência angular de oscilação

$$\omega_m = \sqrt{\boldsymbol{\beta}^{-1} E_{q,m}^{-1}} \quad , \quad m = 1, 2, \dots, M . \quad \text{Equação 20}$$

A correspondente distribuição de probabilidade no *ensemble* canônico é dada por

$$p'_0(\mathbf{a}_q) = \frac{e^{-\frac{1}{2} \mathbf{a}_q^T \underline{\mathbf{E}}_q^{-1} \mathbf{a}_q}}{\int d\mathbf{a}_q e^{-\frac{1}{2} \mathbf{a}_q^T \underline{\mathbf{E}}_q^{-1} \mathbf{a}_q}} = \prod_{m=1}^M p'_{0,m}(a_{q,m}) \quad \text{Equação 21}$$

com

$$p'_{0,m}(a_{q,m}) = (2\pi E_{q,m})^{-1/2} e^{-\frac{1}{2}E_{q,m}^{-1}a_{q,m}^2}, \quad \text{Equação 22}$$

isto é, a distribuição de probabilidade se fatoriza em um produto de Gaussianas normalizadas centradas na origem ao longo de cada coordenada normal.

Os autovetores contidos nas colunas de $\underline{\mathbf{U}}_q$ correspondem aos modos normais generalizados associados com as coordenadas generalizadas do sistema, \mathbf{q} , e com a correspondente expressão para energia total, \mathcal{H}_0 . As coordenadas transformadas, \mathbf{a}_q , são denominadas coordenadas normais generalizadas e satisfazem as seguintes propriedades

$$\langle \mathbf{a}_q \rangle = \int d\mathbf{a}_q \mathbf{a}_q p'_0(\mathbf{a}_q) = 0 \quad \text{e}, \quad \text{Equação 23}$$

$$\langle \mathbf{a}_q \otimes \mathbf{a}_q \rangle = \int d\mathbf{a}_q (\mathbf{a}_q \otimes \mathbf{a}_q) p'_0(\mathbf{a}_q) = \mathbf{E}_q, \quad \text{Equação 24}$$

em que os colchetes angulares, $\langle \rangle$, definem a média sobre o *ensemble* canônico e a notação $\mathbf{a} \otimes \mathbf{b}$ é usada para a matriz com componentes μ, ν como em $a_\mu b_\nu$. Como $\underline{\mathbf{E}}_q$ é diagonal, a equação 24 significa que os movimentos ao longo de diferentes modos normais generalizados são descorrelacionados par-a-par. Pode-se escrever as equações 23 e 24 em termos do sistema de coordenadas original, bastando aplicar a transformação dada pela equação 14, o que resulta em

$$\langle \mathbf{q} \rangle = \mathbf{q}_0 + \underline{\mathbf{A}}_q^{-1/2} \underline{\mathbf{U}}_q \langle \mathbf{a}_q \rangle = \mathbf{q}_0 \quad \text{e}, \quad \text{Equação 25}$$

$$\begin{aligned}
\underline{\mathbf{C}}_q &= \langle (\mathbf{q} - \mathbf{q}_0) \otimes (\mathbf{q} - \mathbf{q}_0) \rangle = \langle (\underline{\mathbf{A}}_q^{-1/2} \underline{\mathbf{U}}_q \mathbf{a}_q) \otimes (\underline{\mathbf{A}}_q^{-1/2} \underline{\mathbf{U}}_q \mathbf{a}_q) \rangle \\
&= \underline{\mathbf{A}}_q^{-1/2} \underline{\mathbf{U}}_q \langle \mathbf{a}_q \otimes \mathbf{a}_q \rangle \underline{\mathbf{U}}_q^T \underline{\mathbf{A}}_q^{-1/2} = \underline{\mathbf{A}}_q^{-1/2} \underline{\mathbf{U}}_q \underline{\mathbf{E}}_q \underline{\mathbf{U}}_q^T \underline{\mathbf{A}}_q^{-1/2} \\
&= \underline{\beta}^{-1} \underline{\mathbf{H}}_q^{-1}
\end{aligned}
\tag{Equação 26}$$

em que $\langle \mathbf{q} \rangle$ é o valor médio associado com o sistema de coordenadas original e $\underline{\mathbf{C}}_q$ é a respectiva matriz de covariância.

O formalismo aqui mostrado foi descrito de uma forma geral para qualquer sistema de coordenadas. Apesar disso, a análise de modos normais é geralmente feita em termos de coordenadas Cartesianas de deslocamentos \mathbf{r} em relação a um ponto estacionário. Nesse caso específico, o Jacobiano associado se reduz à unidade, $\underline{\mathbf{J}}_r(\mathbf{r}) = \underline{\mathbf{J}}_r = 1$, e o tensor massa-métrico a $\underline{\mathbf{A}}_r(\mathbf{r}) = \underline{\mathbf{A}}_r = \underline{\mathbf{M}}$ (ver as equações 4 e 6). A condição imposta pela equação 11 é, então, automaticamente satisfeita, e os Hamiltonianos \mathcal{H}_h e \mathcal{H}_0 tornam-se indistinguíveis (BARON, 2006a).

3.4 - Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é também conhecida como análise de modos essenciais, ou simplesmente, dinâmica essencial (ED: *essential dynamics*). Ela foi introduzida por Amadei e colaboradores, em 1993, como uma proposta para reduzir o número de variáveis das simulações de biomoléculas a um conjunto de variáveis “essenciais”, em que somente os modos de maior amplitude são considerados e os modos de menor amplitude servem como restrições físicas do sistema (AMADEI, 1993). Isso permite realizar simulações de dinâmica molecular em um subespaço

consideravelmente menor, economizando tempo de computação e capturando apenas os movimentos coletivos. As aplicações da metodologia mostraram que PCA é uma poderosa ferramenta de análise de movimentos coletivos (AMADEI, 1993; SCHEEK, 1995; VANAALTEN, 1995a; VANAALTEN, 1995b; AMADEI, 1996; DEGROOT, 1996a; DEGROOT, 1996b; CHILLEMI, 1997; VANAALTEN, 1997; AMADEI, 1999a; AMADEI, 1999b; ZHANG, 2006; LIU, 2007; MESENTEAN, 2007; PINEDA, 2007).

O formalismo matemático utilizado em PCA é muito semelhante ao formalismo já descrito para a análise de modos normais. Os princípios físicos envolvidos são, porém, bem diferentes. Na análise de modos normais, aproxima-se a vizinhança da superfície de energia potencial em torno de um ponto estacionário por uma função harmônica de muitas variáveis, na tentativa de uma descrição dinâmica local (no caso, modos normais vibracionais). No caso da análise de componentes principais, tenta-se descrever as flutuações das posições atômicas numa extensão global do espaço de fases acessível através de simulação de dinâmica molecular de um determinado sistema ligado (dentro dos limites da escala de tempo da simulação e em uma determinada temperatura). Ao contrário das análises de modos normais (NM) e quasi-harmônica (QH) que não será discutida em detalhes nesta tese, PCA não inclui na análise as massas atômicas. Uma consequência disso é que os autovalores obtidos por PCA não tem dimensão de frequência, o que impede o uso de PCA para o cálculo de propriedades termodinâmicas como, por exemplo, entropia. O uso de QH, por outro lado, torna possível o cálculo de tais propriedades. A diferença fundamental entre QH e PCA é que em QH diagonaliza-se a matriz de covariância ponderada pelo tensor massa-métrico, e em PCA diagonaliza-se a matriz de covariância. O propósito da análise de componentes principais é decompor as flutuações atômicas do sistema em modos de movimento independentes

que contribuem de forma aditiva para as flutuações quadráticas médias do sistema. Nesse contexto, a matriz de covariância é diagonalizada, e os resultados da análise são interpretados considerando que os modos de movimento com as maiores contribuições para as flutuações totais do sistema são também os modos que mais influenciam a função da biomolécula, e que os modos associados com autovalores menores são caracterizados por distribuições Gaussianas e são descorrelacionados entre eles e entre os modos mais relevantes.

A matriz de covariância entre flutuações atômicas em coordenadas generalizadas (\mathbf{q}_i) em torno da configuração média $\bar{\mathbf{q}} = \langle \mathbf{q} \rangle$ (isto é, já considerando a remoção de modos rotacionais e translacionais) é dada por

$$\underline{\mathbf{C}}_q = \langle (\mathbf{q} - \bar{\mathbf{q}}) \otimes (\mathbf{q} - \bar{\mathbf{q}}) \rangle = \langle (\mathbf{q}_i - \langle \mathbf{q}_i \rangle) (\mathbf{q}_j - \langle \mathbf{q}_j \rangle) \rangle. \quad \text{Equação 27}$$

Analogamente, ao procedimento descrito na seção anterior, a matriz de covariância (ao invés da Hessiana) é diagonalizada como

$$\underline{\mathbf{T}}_q^T \underline{\mathbf{C}}_q \underline{\mathbf{T}}_q = \underline{\mathbf{\Lambda}}_q \quad \text{ou} \quad \underline{\mathbf{C}}_q = \underline{\mathbf{T}}_q \underline{\mathbf{\Lambda}}_q \underline{\mathbf{T}}_q^T, \quad \text{Equação 28}$$

em que a matriz transformação $\underline{\mathbf{T}}_q$, de dimensão $M \times M$ e ortogonal, contém os autovetores e que $\underline{\mathbf{\Lambda}}_q$, de dimensão $M \times M$ e diagonal, contém os M autovalores correspondentes da matriz de covariância. O conjunto de coordenadas transformadas \mathbf{c}_q pode ser relacionado com o conjunto de coordenadas original, \mathbf{q} , por

$$\mathbf{c}_q = \underline{\mathbf{T}}_q^T (\mathbf{q} - \bar{\mathbf{q}}) \quad \text{ou} \quad (\mathbf{q} - \bar{\mathbf{q}}) = \underline{\mathbf{T}}_q \mathbf{c}_q. \quad \text{Equação 29}$$

Como na Seção anterior (equações 23 e 24), este conjunto de coordenadas satisfaz as propriedades

$$\langle \mathbf{c}_q \rangle = \langle \mathbf{T}_q^T (\mathbf{q} - \bar{\mathbf{q}}) \rangle = 0 \quad \text{e} \quad \text{Equação 30}$$

$$\langle \mathbf{c}_q \otimes \mathbf{c}_q \rangle = \langle [\mathbf{T}_q^T (\mathbf{q} - \bar{\mathbf{q}})] \otimes [\mathbf{T}_q^T (\mathbf{q} - \bar{\mathbf{q}})] \rangle = \mathbf{T}_q^T \mathbf{C}_q \mathbf{T}_q = \underline{\mathbf{\Lambda}}_q. \quad \text{Equação 31}$$

Como $\underline{\mathbf{\Lambda}}_q$ é diagonal, semelhantemente à equação 24, a equação 31 mostra que os pares de coordenadas transformadas, \mathbf{c}_q , são linearmente descorrelacionados. A flutuação total média quadrática (MSF: *mean-square fluctuation*) $\sum_i \langle (\mathbf{q}_i - \bar{\mathbf{q}}_i)^2 \rangle$ pode ser obtida das contribuições individuais de cada autovetor

$$\begin{aligned} Tr[\underline{\mathbf{C}}_q] &= \sum_i \langle (\mathbf{q}_i - \bar{\mathbf{q}}_i)^2 \rangle = \sum_i \langle (\mathbf{q}_i - \bar{\mathbf{q}}_i)^T (\mathbf{q}_i - \bar{\mathbf{q}}_i) \rangle = \sum_i \langle \mathbf{c}_{q,i}^T \mathbf{T}_q^T \mathbf{T}_q \mathbf{c}_{q,i} \rangle = \\ & \sum_i \langle \mathbf{c}_{q,i}^T \mathbf{c}_{q,i} \rangle = \sum_i \langle c_{q,i}^2 \rangle = \sum_i \lambda_i = Tr[\underline{\mathbf{\Lambda}}_q] \end{aligned} \quad \text{Equação 32}$$

em que Tr corresponde ao traço e λ_i , aos elementos da matriz diagonal $\underline{\mathbf{\Lambda}}_q$.

4 - Comportamento dinâmico do VEGF em solução

4.1 – Introdução

As primeiras evidências de que movimentos correlacionados poderiam estar relacionados com a função do VEGF vieram da análise de estruturas cristalográficas (MULLER, 1997a; MULLER, 1997b). A estrutura cristalográfica do domínio de ligação ao receptor do VEGF (resíduos 8-109) refinada à resolução de 1.93 Å (código PDB: 2VPF) contém oito cópias do monômero na unidade assimétrica (MULLER, 1997a). Esse número elevado de estruturas na unidade assimétrica permite discutir sobre a flexibilidade da proteína. A superposição das diversas estruturas dos monômeros fornece um desvio da raiz quadrática média (RMSD: root mean-square deviation) de $0,24 \pm 0,06$ Å para os átomos da cadeia principal e $0,37 \pm 0,11$ Å quando se considera todos os átomos. A análise dos valores de RMSD por resíduo deixa claro que a região mais rígida da proteína (essencialmente formada por folhas-beta) é bem semelhante entre as oito cópias. Os maiores desvios acontecem nas regiões de alças (i.e. os segmentos que unem as fitas β_1 em β_2 (alça-1), β_3 em β_4 (alça-2) e β_5 em β_6 (alça-3)) e da hélice-alfa N-terminal. As regiões de alças, hélice-alfa N-terminal e de alguns resíduos que ligam as fitas β_4 e β_5 são mais flexíveis (FAIRBROTHER, 1997). A análise da sobreposição de estruturas revelou que as posições observadas dos átomos da alça-3 nas oito estruturas monoméricas representam imagens instantâneas de um movimento concertado dessa alça, com deslocamentos maiores do que 4,7 Å para o resíduo da extremidade (His86). Como essa alça é importante para a ligação ao KDR e ao Flt-1, os autores sugeriram que esse movimento coletivo pode ser funcionalmente

importante no acesso às diferentes conformações necessárias para a ligação aos receptores (MULLER, 1997a). A posterior determinação das 24 estruturas de RMN do domínio de ligação ao receptor do VEGF complexado com duas cópias de um inibidor peptídico de 19 aminoácidos (conhecido como inibidor v107) também revelou que, após a sobreposição das estruturas, a alça-3 tem o mesmo tipo de comportamento (PAN, 2002). Estes resultados sugerem a existência de movimentos correlacionados funcionalmente importantes na proteína.

Em 2003, Kiba e colaboradores mostraram que existe uma relação íntima de atividade entre as alças-1 e -3 e que essa relação é crucial para a alta afinidade do VEGF por seus receptores (KIBA, 2003). No experimento realizado, os autores construíram quimeras mesclando parte da seqüência do VEGF com VEGF- E_{NZ7} (i.e. obtido do genoma do vírus *Orf* com semelhança de 45% na seqüência de aminoácidos com VEGF) e testando a atividade biológica dessas quimeras frente ao receptor KDR. Ambos VEGF e VEGF- E_{NZ7} são ativos para esse receptor. Quimeras construídas com partes da seqüência do PlGF também foram utilizadas como controle, visto que o PlGF não é ativo para este receptor. Os resultados mostraram que a troca de uma das alças-1 ou -3 do VEGF pela alça correspondente do VEGF- E_{NZ7} reduz drasticamente sua habilidade em ativar KDR. De forma análoga, quando a seqüência de uma dessas alças do VEGF- E_{NZ7} é trocada pela seqüência correspondente do VEGF, a atividade é também drasticamente reduzida. Quando a seqüência da alça-2 é trocada, tanto de VEGF para VEGF- E_{NZ7} como de VEGF- E_{NZ7} para VEGF, nada acontece com a atividade. De forma surpreendente, quando duas alças, -1 e -3, são trocadas simultaneamente, a atividade é recuperada. Esse resultado revela um efeito cooperativo entre as alças-1 e -3, indicando a necessidade de um par de alças-1 e -3 complementar para a existência da atividade dessas proteínas frente esse receptor (KIBA, 2003).

Em 2006, Pieren e colaboradores determinaram a estrutura tridimensional da variante NZ2 do VEGFE do vírus *Orf*, e mostraram que a estrutura é muito semelhante a do VEGFA. VEGF_{ENZ2}, como o VEGF_{ENZ7}, é capaz de ativar o receptor KDR, porém é incapaz de ativar o receptor Flt-1. Repetindo, eles construíram quimeras trocando partes da seqüência do VEGF-E_{NZ2} pelas partes correspondentes da seqüência do PlGF (capaz de ativar Flt-1, mas incapaz de ativar KDR). A substituição da alça-1, ou da alça-3, do VEGF-E_{NZ2} pela alça correspondente do PlGF, é capaz de inativar completamente o VEGF-E_{NZ2} perante KDR. A quimera na qual apenas uma das alças (-1 ou -3) foi substituída é completamente inativa para os dois receptores. Quando as duas alças são substituídas simultaneamente, o VEGF-E_{NZ2} torna-se capaz de ativar o receptor Flt-1. Estes experimentos indicam, novamente, que um par de alças-1 e -3 complementar é necessário para a atividade da proteína (PIEREN, 2006).

4.2 – Objetivos

Tendo em vista os resultados descritos na Seção anterior, o objetivo deste Capítulo é investigar a ocorrência de movimentos coletivos de importância biológica no VEGF.

4.3 – Detalhes computacionais

4.3.1 - Estrutura inicial

Como ponto de partida, foi utilizada a estrutura mais representativa de um conjunto de 24, obtidas por RMN (código PDB: 1KAT) (PAN, 2002). A escolha por essa estrutura dentre as diversas disponíveis no PDB obedeceu a dois critérios: ser a estrutura mais completa do domínio de ligação ao receptor do VEGF (resíduos 11 a 109) e não existir nenhuma diferença estrutural significativa entre essa estrutura de RMN e as estruturas cristalográficas disponíveis (códigos PDB: 1VPF e 2VPF). Nessa estrutura de RMN, o VEGF está complexado com duas cópias do inibidor peptídico v107 e, portanto, esses inibidores foram removidos antes da preparação do sistema. O modelo de VEGF, um homodímero, que foi considerado nesse estudo consiste no domínio de ligação ao receptor, formado pelos resíduos 11 a 109 de cada monômero. Os monômeros são ligados por duas ligações dissulfeto e cada monômero possui três outras ligações dissulfeto intramoleculares que formam o característico nó de cistina (Figura 1.1).

4.3.2 - Dinâmica molecular

A simulação por dinâmica molecular (MD) do fator de crescimento vascular endotelial foi realizada no *ensemble* NPT, utilizando o pacote computacional *GROMACS* (BERENDSEN, 1995; LINDAHL, 2001) e o campo de forças *OPLS all-atom* estendido para o tratamento de biomoléculas (KAMINSKI, 2001).

Primeiramente, um procedimento de minimização de energia foi aplicado à estrutura inicial para remover contatos de alta repulsão. A minimização utilizou 1000 passos do algoritmo *steepest descent*. O sistema foi então solvatado dentro de uma caixa retangular contendo 8222 moléculas de água do tipo SPC (BERENDSEN, 1981; BERWEGER, 1995), sendo que 12 delas foram posteriormente substituídas por contra-íons Na^+ para neutralizar o sistema. Essa substituição foi realizada pelo módulo *genion* do pacote *GROMACS* que recalcula o potencial eletrostático após a inclusão de cada contra-íon. A partir desse ponto foram aplicadas condições periódicas de contorno, o algoritmo LINCS para fixar estiramentos envolvendo átomos de hidrogênio (HESS, 1997) e o método do somatório de Ewald (ESSMANN, 1995) para o tratamento de interações de longo alcance. Uma simulação das moléculas de água e dos contra-íons foi realizada na temperatura de 300 K e 1 atm com o objetivo de equilibrá-los ao potencial exercido pela proteína e permitir que as moléculas de água penetrassem nas cavidades da superfície da proteína. Nessa etapa, potenciais harmônicos foram utilizados para restringir o movimento dos átomos da proteína. As equações de movimento foram integradas segundo o algoritmo *Verlet Leapfrog* (HOCKNEY, 1970). O controle de pressão e temperatura foi realizado por acoplamento fraco a um banho externo segundo o formalismo de Berendsen (BERENDSEN, 1984). A energia do sistema foi, então, minimizada por 1000 passos do algoritmo *steepest descent*. O sistema foi aquecido gradualmente até a temperatura de 300 K utilizando seis blocos de simulação. No primeiro bloco a temperatura variou de 0 a 50 K, no segundo de 50 a 100 K, e assim por diante. Cada bloco durou 50 ps, totalizando 300 ps na etapa de aquecimento (HORTA, 2007). Com o sistema termalizado em 300 K e 1 atm, a etapa de aquisição de dados foi iniciada. Exceto pelos estiramentos envolvendo átomos de hidrogênio, nenhuma

restrição foi imposta ao sistema. A simulação foi desenvolvida com intervalo de integração de 2 fs e tempo total de 10 ns.

4.3.3 - Análise de movimentos correlacionados

Os elementos da matriz de correlação dinâmica cruzada, C_{ij} , foram calculados segundo o formalismo descrito na seção 3.2 e lançados em um gráfico bidimensional (DCCM) para extrair informações sobre a correlação dos movimentos do dímero do VEGF. A matriz de correlação dinâmica cruzada foi calculada sobre os últimos 5 ns da simulação, efetuando-se médias sobre blocos de diferentes tamanhos: 250 ps (20 blocos), 500 ps (10 blocos) e 1000 ps (5 blocos). Os resultados não variaram significativamente com o tamanho dos blocos. Por esse motivo, daqui em diante será considerada apenas a partição em 5 blocos de 1000 ps. Os movimentos de translação e rotação foram removidos por sobreposição das estruturas, conforme descrito na seção 3.1, tomando como referência os átomos de $C\alpha$ dos resíduos: 18-33, 46-58, 68-78 e 90-100. Esses resíduos correspondem às porções mais rígidas da molécula de VEGF e foram escolhidas de acordo com os valores experimentais de fator-B.

4.3.4 - Análise de componentes principais

A matriz de covariância $3N \times 3N$ (ver Seção 3.4) foi construída e diagonalizada utilizando apenas os átomos de $C\alpha$ sobre os últimos 5 ns da trajetória. Com esse propósito, o módulo *g_covar* do pacote *GROMACS* foi utilizado. Os primeiros e últimos 5 resíduos foram excluídos para impedir que os movimentos muito flexíveis das porções

terminais dominassem a análise (TAI, 2001). Foram removidos também os movimentos de translação e rotação em torno do centro de massas por sobreposição das estruturas, usando como referência os mesmos resíduos descritos no item anterior. A trajetória de MD em coordenadas cartesianas foi projetada nos componentes principais utilizando o módulo *g_anaeig* do pacote *GROMACS*.

4.4 - Resultados e discussão

4.4.1 - Estabilidade da simulação

A análise de RMSD, o raio de giro (Rg) e a área superficial acessível ao solvente (SASA) foram usadas para analisar o equilíbrio do sistema (Figura 4.1). O RMSD foi calculado por sobreposição das estruturas sobre os átomos de C α . Quando todos os C α são considerados no cálculo do RMSD, o desvio em relação à estrutura inicial é da ordem de 0,19 nm. Esse valor cai para 0,10 nm quando considera-se apenas os átomos de C α das regiões mais rígidas (resíduos: 18-33 (hélice- α e fita- β), 46-58 (fita- β), 68-78 (fita- β) e 90-100 (fita- β)). Esses valores de RMSD convergem razoavelmente bem a partir de 1 ns de simulação (Figura 4.1a). Quando considera-se apenas os resíduos das regiões mais flexíveis, que fazem parte das regiões de alças, o RMSD converge para 0,45 nm, aproximadamente, após 4 ns e permanece estável até o fim da simulação. Como a presente análise tem como objetivo estudar principalmente os movimentos correlacionados das regiões flexíveis (região de alças), foram considerados apenas os últimos 5 ns da trajetória, pois antes disso as regiões flexíveis ainda não estavam equilibradas. Como já foi dito, as regiões de alças formam os pólos do dímero do VEGF

e incluem os resíduos mais importantes para a complexação com os receptores. Elas são, portanto, um sítio importante para a inibição do VEGF. A elevada flutuação do RMSD dessa região é consequência de sua alta flexibilidade. O raio de giro (R_g) permaneceu estável em torno de 2,05 nm durante toda a trajetória, o que indica que nenhuma modificação significativa no formato da proteína ocorreu durante a simulação (Figura 4.1b). A área superficial acessível ao solvente (SASA) também indicou a boa estabilidade da trajetória, permanecendo estável em torno de 63 nm^2 (Figura 4.1c).

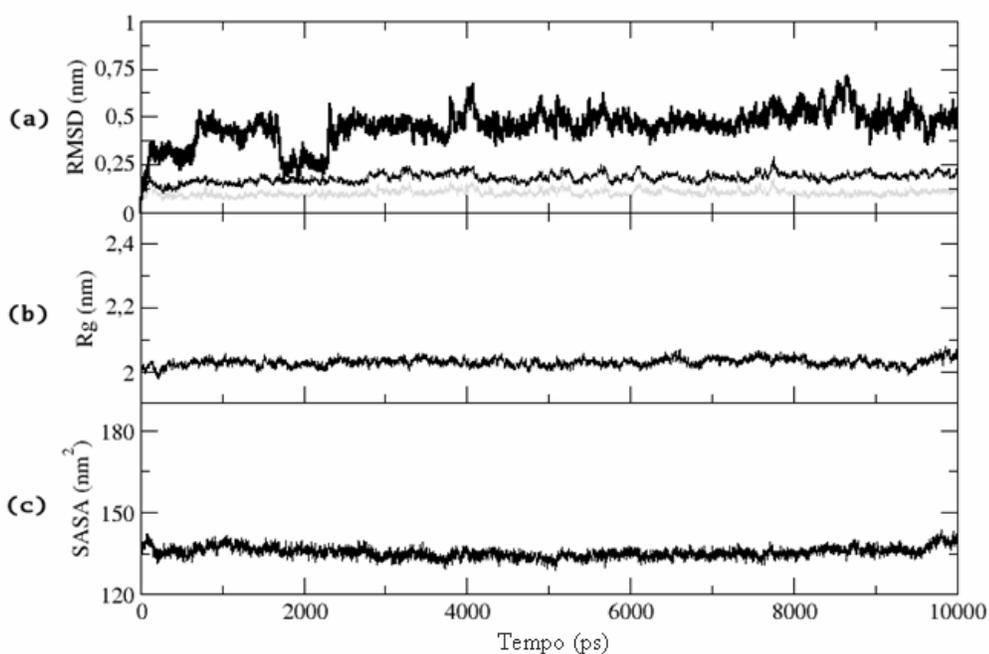


Figura 4.1: (a) RMSD relativo aos átomos de $C\alpha$ do VEGF. A linha preta fina representa o RMSD calculado sobre todos os átomos de $C\alpha$, a linha preta em negrito representa o RMSD calculado sobre os $C\alpha$ da região das alças, e a linha cinza representa o RMSD calculado sobre os átomos de $C\alpha$ da região mais rígida. (b) Raio de giro e (c) Área de superfície acessível ao solvente.

4.4.2 - Flutuações atômicas

As flutuações atômicas foram analisadas em termo dos fatores-B isotrópicos, calculados sobre os últimos 5 ns da trajetória, efetuando-se a média de 20 blocos de 250 ps em intervalos de tempo de 2 ps. Os valores calculados foram comparados com a média dos fatores-B obtidos da estrutura refinada do cristal (código PDB: 2VPF) (MULLER, 1997a), que inclui oito cópias de cada monômero. Na Figura 4.2, as linhas contínuas correspondem aos fatores-B calculados para cada monômero. A linha tracejada corresponde à média dos fatores-B dos oito monômeros presentes na unidade assimétrica da estrutura cristalina. Pode ser notado que existe acordo qualitativo muito bom entre os resultados calculado e experimental. As regiões mais flexíveis possuem valores maiores de fator-B, sendo que essas regiões correspondem às três alças e alguns resíduos das fitas β -3 e β -5. Estudos preliminares mostraram que a alta flexibilidade dessas fitas é consequência da existência de apenas uma ligação de hidrogênio entre as fitas. Os fatores-B calculados são, em geral, menores do que os obtidos da difração de raios-X, exceto os correspondentes aos resíduos da alça-3, onde ocorre uma inversão. Essa inversão pode ser atribuída ao fato dos resíduos dessa alça, em solução, não estarem mais em contato com outras cópias como no cristal (isto é, a alça-3 tem contatos próximos com os pólos de outras cópias do VEGF na estrutura cristalina), mas sim, solvatados por moléculas de água (TAI, 2001).

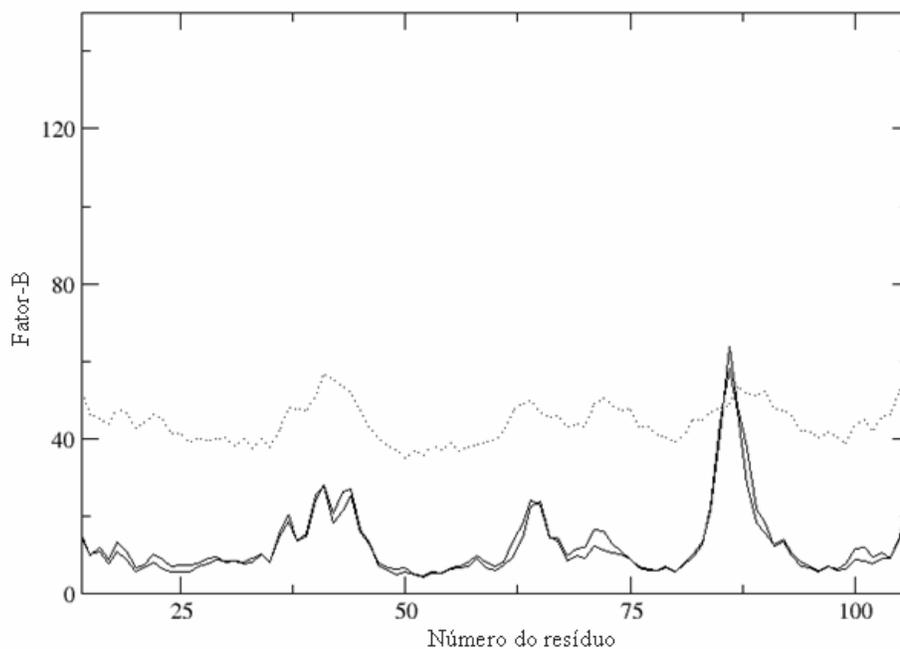


Figura 4.2: Fatores-B calculados para cada monômero do VEGF (linhas contínuas) e a média dos fatores-B experimentais obtidos da estrutura cristalográfica de múltiplas cópias do VEGF (linha pontilhada) (código PDB: 2VPF).

4.4.3 - Amplitude dos movimentos

A Figura 4.3a mostra a sobreposição de estruturas de um dos monômeros. O outro monômero está na representação em fita. Apenas o primeiro monômero foi utilizado no processo de ajuste (*least square fitting*). A figura foi construída pela sobreposição de 20 estruturas coletadas a cada 250 ps sobre os últimos 5 ns da trajetória. Somente os átomos de $C\alpha$ das regiões mais rígidas da proteína (definidas previamente) foram utilizados no ajuste. Esse tipo de análise é útil para a visualização da amplitude dos deslocamentos dos resíduos da proteína. Como esperado, as alças e regiões terminais tem amplitude e flexibilidade maiores, o que está de acordo com os resultados

experimentais (FAIRBROTHER, 1997; PAN, 2002). A Figura 4.3b mostra a sobreposição das 24 estruturas obtidas por RMN (código PDB: 1KAT), das quais os inibidores foram omitidos. As diferenças observadas entre MD e NMR estão nas amplitudes dos movimentos, maiores nas estruturas de MD. Este resultado sugere que a ligação ao inibidor reduz a amplitude dos movimentos dos pólos da proteína (Figura 4.3). Não seria uma surpresa se a alta flexibilidade dos pólos fosse uma propriedade importante em relação à complexação do VEGF com os seus receptores, visto que os pólos são as regiões que contactam a superfície dos receptores. Portanto, modificações na entropia conformacional parecem ser parâmetros importantes na termodinâmica da ligação dessa proteína a seus receptores, e os pólos seriam as regiões onde essas mudanças ocorreriam de forma mais intensa. A alta flexibilidade também poderia ser um importante parâmetro, responsável pela promiscuidade do VEGF, capaz de se ligar ao receptor KDR e ao receptor Flt-1. Como veremos adiante, as posições dos átomos observadas para a alça-3 na figura 4.3 caracterizam diferentes imagens instantâneas de um movimento concertado, no qual a estrutura da alça se mantém, mas ela, como um todo, move-se como um pêndulo. Além disso, como discutido anteriormente, as fitas β -5 e β -6 têm um certo grau de desordem.

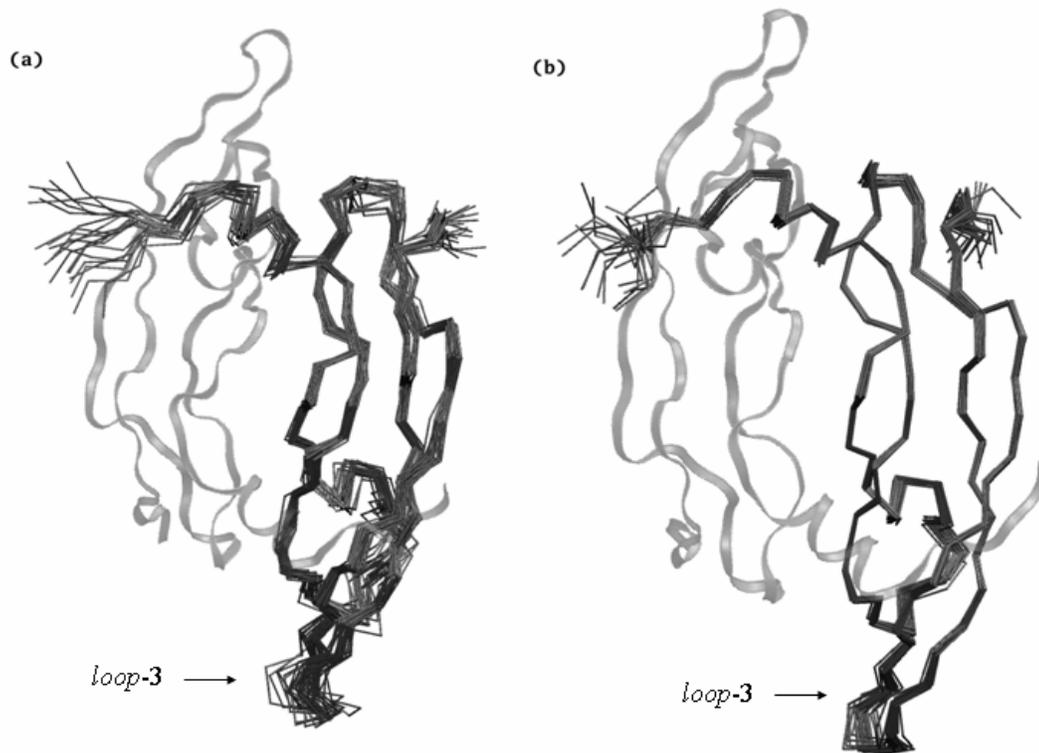


Figura 4.3: Sobreposição de estruturas mostrando a amplitude dos movimentos de um dos monômeros do VEGF. (a) Estruturas obtidas da simulação de MD. (b) Sobreposição das 24 estruturas obtidas por Pan e colaboradores por RMN (código PDB: 1KAT) (PAN, 2002).

4.4.4 - Movimentos coletivos

Para melhor compreender o comportamento dinâmico do VEGF, a matriz de correlação dinâmica cruzada foi calculada e seus coeficientes foram lançados em um gráfico bidimensional (DCCM) (Figura 4.4). Para facilitar a visualização, os valores positivos estão mostrados abaixo e os valores negativos acima da diagonal. Apenas as

correlações entre -1 e -0,3 e entre +0,3 e +1 foram consideradas. Espera-se que resíduos consecutivos tenham valores positivos ao longo da diagonal do DCCM, o que indica forte correlação entre resíduos próximos na seqüência. As hélices- α geralmente aparecem como triângulos saindo da diagonal e folhas- β geralmente aparecem como um filamento que sai da diagonal. Resíduos correlacionados distantes na seqüência aparecem como “ilhas” fora da diagonal (HARTE, 1992).

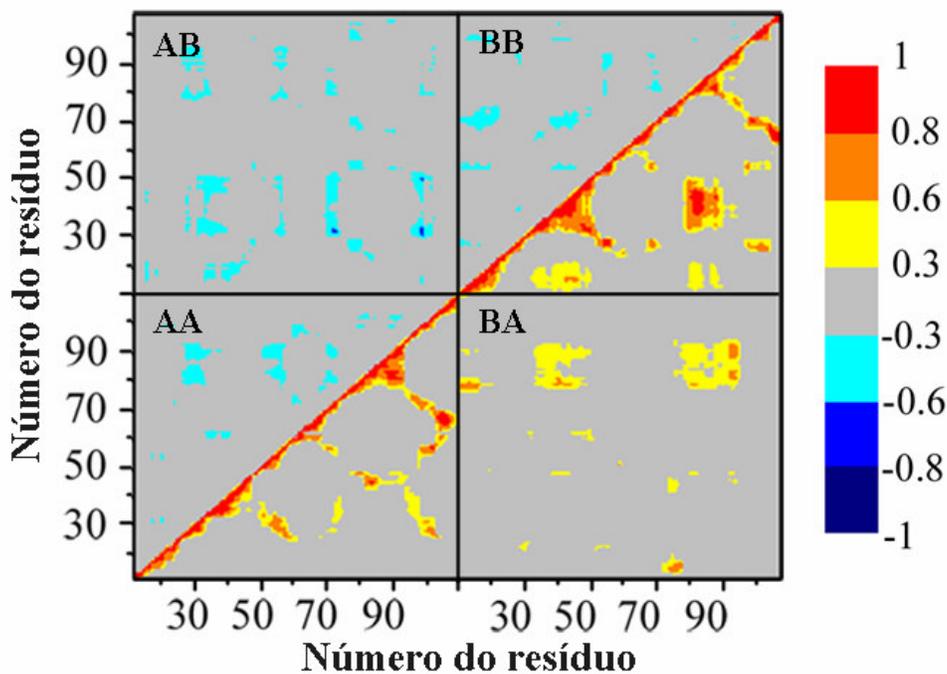


Figura 4.4: Mapa de correlação dinâmica cruzada do VEGF. As correlações (isto é, valores positivos) estão mostradas abaixo e as anticorrelações (isto é, valores negativos) acima da diagonal. Os coeficientes de correlação foram calculados efetuando-se a média de 5 blocos consecutivos de 1000 ps sobre os últimos 5 ns da trajetória. São mostrados apenas os coeficientes com módulo superior a 0,3. O quadrado AA corresponde às correlações que envolvem os resíduos do monômero A. O quadrado BB corresponde às correlações que envolvem os resíduos do monômero B. As correlações entre monômeros aparecem no quadrado BA e as anticorrelações no quadrado AB.

O DCCM do VEGF (Figura 4.4) mostra regiões correspondentes a movimentos correlacionados e quase não tem regiões de movimentos anticorrelacionados. As regiões correspondentes a correlações entre resíduos de um mesmo monômero (regiões AA e BB) são bem semelhantes, pois a estrutura é de um homodímero para o qual espera-se que os movimentos reflitam uma certa simetria no mapa. A análise das regiões AA e BB indica que existe um certo grau de correlação dinâmica entre os resíduos que formam a alça-1 (39-45), a alça-2 (62-67), a alça-3 (84-89) e alguns resíduos da folha- β (46-49; 90-95). Além disso, algumas regiões fora da diagonal indicam correlações entre o movimento dos resíduos da alça-1 e da alça-3 (39-45 com 84-89), entre resíduos pertencentes a diferentes fitas da folha- β (25-35 com 52-60; 43-50 com 79-83), e entre a porção C-terminal e a alça-2 (103-109 com 62-67). Correlações relevantes entre resíduos de diferentes monômeros não são observadas (região BA). Também não são observadas anticorrelações relevantes (região AB) (HORTA, 2007; , 2008a).

De forma geral, as regiões mais correlacionadas nos mapas fazem parte do mesmo pólo (principalmente, alças-1 e -3). Para verificar se existe algum tipo de interação específica a manter as alças-1 e -3 se movendo de forma correlacionada, a trajetória foi cuidadosamente analisada. Foi observado que as cadeias laterais de resíduos com carga negativa da alça-1, Glu42 e Glu44, interagem fortemente com as cadeias laterais de resíduos com carga positiva da alça-3, Arg82 e Lys84, respectivamente (Figura 4.5a). Em contrapartida, nenhuma interação específica foi encontrada entre os resíduos das alças-1 e -2, exceto pela ligação dissulfeto entre os resíduos Cys51 e Cys60 (Figura 4.5b). Além disso, as alças-1 e -3 mantêm interações de ligação de hidrogênio entre os átomos da cadeia principal dos resíduos Ile46 e Ile83, e Lys48 e Met81.

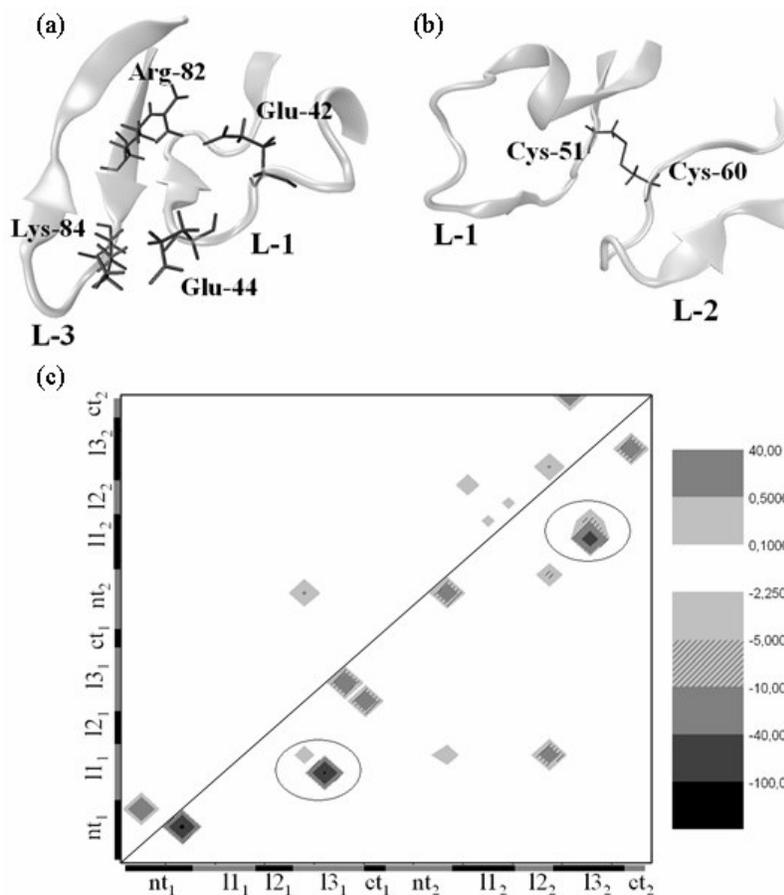


Figura 4.5: Última estrutura da simulação mostrando a região das alças. A cadeia principal está na representação em fitas e as cadeias laterais dos resíduos selecionados estão representados em hastes. (a) Interações do tipo ponte salina formada pelos pares Arg82 e Glu42, e Lys84 e Glu44. (b) A ligação dissulfeto entre Cys51 e Cys60 mantém as alças-1 e -2 ligadas covalentemente. (c) Interações eletrostáticas entre todos os resíduos dos pólos do VEGF. Os resíduos estão identificados como: N-terminal [nt: 11–25], alça-1 [l1: 39–50], alça-2 [l2: 59–67], alça-3 [l3: 80–92], e C-terminal [ct: 105–109]. Os subscritos indicam a cadeia. Valores positivos (repulsões) estão acima da diagonal e valores negativos (atrações) estão abaixo da diagonal. À direita estão os intervalos de energia em kJ/mol. As elipses mostram as regiões onde ocorrem as interações mais fortes.

Para melhor caracterização dos pares de resíduos que mantêm interações específicas nos pólos do VEGF, foram calculadas as interações electrostáticas entre os resíduos de um mesmo pólo (Figura 4.5c). Essa análise foi feita considerando cada resíduo como um grupo e calculando as interações eletrostáticas entre todos os grupos. Para isto, a simulação foi estendida em 1 ns e nesse intervalo de tempo foi calculada a média entre essas interações. Repulsões muito fortes não foram observadas. As interações eletróstáticas mais intensas foram observadas entre os resíduos das alças-1 e -3 (elipses, Figura 4.5c). Os resíduos que contribuem de forma mais intensa para essas interações são: Glu42, Glu44, Ile46, Lys48, Met81, Arg82, Ile83 e Lys84. As interações mais fortes são dadas pelos pares Glu42 e Arg82 (~70 kJ/mol), Glu44 e Lys84 (~100 kJ/mol), Ile46 e Ile83 (~31 kJ/mol) e Lys48 e Met81 (~27 kJ/mol). É importante mencionar que os números entre parânteses devem ser considerados apenas para comparações qualitativas. Como descrito, os pares Glu42-Arg82 e Glu44-Lys84 realizam interações iônicas entre átomos da cadeia lateral e os pares Ile46-Ile83 e Lys48-Met81 realizam interações de ligação de hidrogênio entre átomos da cadeia principal.

Sumariando, observa-se a existência de movimentos coletivos que envolvem resíduos do mesmo pólo do dímero do VEGF, principalmente, resíduos das alças-1 e -3. É possível que essas correlações de movimentos estejam relacionadas com a atividade dessa proteína, visto que elas estão presentes nas regiões importantes para a ligação aos receptores.

Como descrito na introdução, Kiba e colaboradores mostraram que a alça-2 pode ser trocada entre as proteínas VEGF e VEGF-E_{NZ7} sem afetar a atividade dessas proteínas em relação ao receptor KDR. Entretanto, a troca de uma das alças-1 ou -3 reduz significativamente a atividade da proteína, mas a troca simultânea da seqüência

das duas alças-1 e -3 recupera a atividade. Esses resultados indicam forte cooperatividade entre as alças-1 e -3 que depende da seqüência específica dessas alças. Em outras palavras, existe uma relação íntima entre essas alças que afeta a função da proteína. Esses autores acreditam que a troca de uma das alças-1 ou -3 pode afetar a estrutura tridimensional da proteína, inativando-a (KIBA, 2003). Os resultados aqui apresentados indicam que existe cooperatividade no movimento dessas alças que resulta em um movimento coletivo. As forças que mantêm unidas essas alças são essencialmente interações específicas entre as cadeias laterais de certos aminoácidos. Por outro lado, a alça-2 liga-se aos outros resíduos do mesmo pólo apenas por uma ligação dissulfeto, que está presente em todos os membros da superfamília do nó de cistina, incluindo a família dos fatores de crescimento endoteliais vasculares. Portanto, esta interação mantém-se inalterada quando da substituição da seqüência dessa alça pela seqüência da alça-2 de outro VEGF. Essa explicação justifica o fato da troca da alça-2 não afetar a atividade.

4.4.5 - Análise de componentes principais

A matriz de covariância $3N \times 3N$ foi calculada e diagonalizada segundo a teoria descrita na Seção 3.4 e o procedimento computacional da Seção 4.3. Para assegurar que a amostragem configuracional foi suficiente para que a análise de covariância forneça um conjunto consistente de autovetores, a raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP: *root mean square inner products*) (equação 33) foi calculada entre intervalos crescentes da primeira metade da etapa de análise da simulação (de 5000 ps até 7500 ps) com a segunda metade (de 7500 ps até 10000 ps) envolvendo o subespaço composto

pelos primeiros 10 autovetores (que foram considerados aqui como o subespaço essencial).

$$RMSIP = \left(\frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} \sum_{j=1}^{10} (\boldsymbol{\eta}_i \cdot \mathbf{v}_j)^2 \right)^{1/2} \quad \text{Equação 33}$$

Nessa equação, $\boldsymbol{\eta}_i$ e \mathbf{v}_j são autovetores da primeira e da segunda metades, respectivamente. Essa metodologia foi aplicada na validação da dinâmica essencial da proteína L e do citocromo c551 (AMADEI, 1999a). Com a finalidade de evitar correlações, foram comparados apenas os autovetores obtidos da primeira metade com os autovetores obtidos da segunda metade. A Figura 4.6 mostra a sobreposição (*overlap*) dos espaços essenciais entre as duas metades, obtidas de intervalos crescentes de tempo, variando entre 5 ps e 2500 ps. Após 700 ps, o valor de RMSIP converge para uma sobreposição aproximadamente igual a 0,5. Segundo Amadei e colaboradores, um RMSIP de aproximadamente 0,6 indica boa convergência do conjunto de autovetores do subespaço essencial (primeiros 10 autovetores) (AMADEI, 1999a) o que não implica necessariamente na convergência de autovetores isolados. É também importante notar que, dentro do escopo da análise de componentes principais, o valor de RMSIP, por definição, deveria idealmente se aproximar de 1 para trajetórias equilibradas.

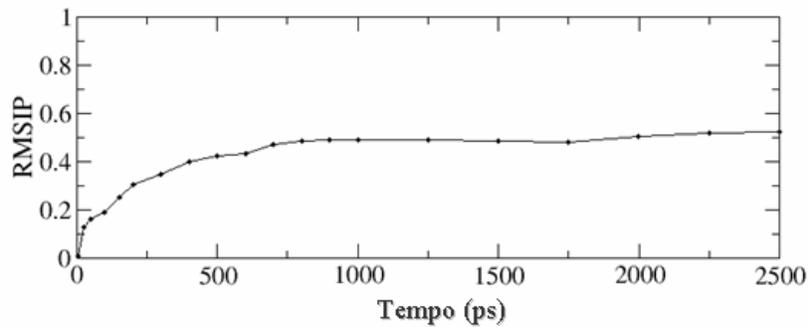


Figura 4.6: RMSIP dos primeiros 10 autovetores obtidos das duas metades (2500 ps) dos últimos 5 ns da simulação em intervalos crescentes de tempo.

Os primeiros poucos componentes recuperam quase completamente o valor total da raiz das flutuações quadráticas médias (RMSF: *root mean-square fluctuations*). Foram calculadas as frações do RMSF global que pertencem a cada autovetor sobre os últimos 5 ns da trajetória. O primeiro autovetor é responsável por 72,8% do RMSF total, e a inclusão do segundo autovetor eleva esse valor para 90,1%. Os primeiros 5 autovetores capturam 97,6%, e os primeiros 10 capturam 99,3% do RMSF. Dentro dos limites do modelo utilizado, conclui-se dessa análise que os (poucos) primeiros autovetores formam um espaço representativo da dinâmica essencial do VEGF, com os autovetores restantes correspondendo quase que apenas a restrições físicas.

Os últimos 5 ns da trajetória foram projetados nos primeiros cinco autovetores. Para analisar as projeções, foram consideradas apenas as estruturas extremas de cada projeção (estrutura de maior e menor deslocamento ao longo da coordenada unidimensional) (Figura 4.7). A projeção no primeiro autovetor corresponde a um movimento no qual os pólos do VEGF estão sendo projetados um contra o outro, como as asas de uma borboleta. Esse movimento reflete a correlação existente entre os resíduos de um mesmo pólo em movimento concertado. Os outros modos correspondem

a movimentos de amplitudes muito menores, o que dificulta uma análise qualitativa do papel desses modos.

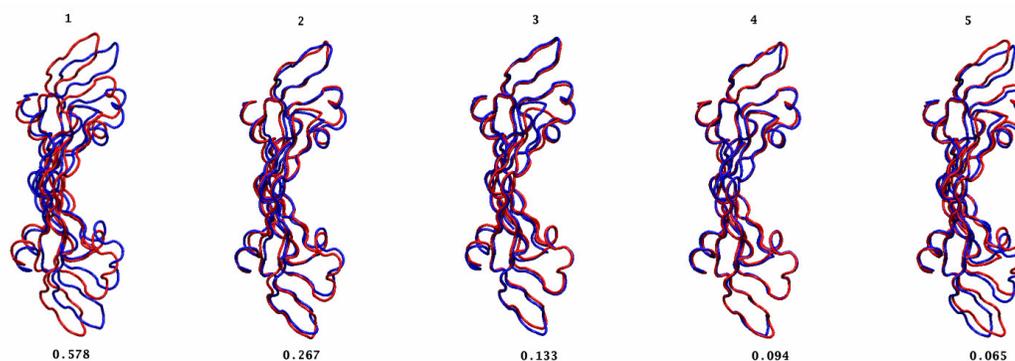


Figura 4.7: Estruturas extremas das projeções da trajetória nos primeiros cinco autovetores. Os autovalores correspondentes a cada autovetor estão abaixo da respectiva projeção.

4.5 - Conclusões

Uma explicação foi sugerida para o comportamento cooperativo na troca de seqüências de alças de diferentes VEGFs. As correlações existentes entre as alças-1 e -3 podem ser um pré-requisito para a atividade dessa proteína e pode ser a causa da relação íntima de atividade entre essas alças. A análise de componentes principais reforçou a existência de movimentos correlacionados e mostrou que um movimento do tipo borboleta domina a dinâmica do VEGF. É possível que os movimentos descritos tenham uma importância crucial na ligação do VEGF aos seus receptores, bem como na seletividade.

5 - O efeito da complexação com receptor e inibidor na estrutura e na dinâmica do VEGF

5.1 - Introdução

Apesar de toda semelhança na arquitetura global (ver Seção 1.5), Flt-1 e KDR têm diferenças significativas em suas propriedades funcionais. KDR está mais envolvido na resposta angiogênica e Flt-1 parece controlar a migração de mitócitos e macrófagos. O VEGF tem uma afinidade dez vezes maior pelo Flt-1 ($K_d \sim 10$ pM) do que pelo KDR ($K_d \sim 100$ pM) (STAROVASNIK, 1999).

Em 1997, Wiesmann e colaboradores, determinaram por difração de raios-X a estrutura do complexo formado pelo VEGF e duas cópias do segundo domínio imunoglobulina do receptor Flt-1 (código PDB: 1FLT) (WIESMANN, 1997). Descobriu-se também que esse domínio é necessário e suficiente para a ativação do receptor, e que os outros domínios são responsáveis pela cascata de transdução do sinal (DAVIS-SMYTH, 1996; BARLEON, 1997; CUNNINGHAM, 1997; WIESMANN, 1997). O segundo domínio do receptor Flt-1 (Flt-1_{D2}), complexa-se com o VEGF na região dos pólos e mantém, principalmente, interações hidrofóbicas (WIESMANN, 1997).

Peptídeos com alta afinidade por VEGF capazes de inibir a ligação do VEGF aos seus receptores foram preparados como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos, preferencialmente, moléculas orgânicas pequenas (FAIRBROTHER, 1998). As estruturas de vários complexos entre VEGF e peptídeos estão descritas na literatura

(códigos PDB: 1KAT e 1VPP) (WIESMANN, 1998; PAN, 2002). O peptídeo v107 (de sequência primária: GGNECDAIRMWEWECFERL) se destaca como um excelente candidato para o desenho de novos fármacos porque tem alta afinidade por VEGF e liga-se na mesma região do receptor.

5.2 - Objetivos

O objetivo do presente capítulo é investigar os efeitos da complexação do receptor Flt-1 e do peptídeo inibidor v107 na estrutura e na dinâmica do fator de crescimento vascular endotelial, pela análise das mudanças de estrutura média, de flexibilidade conformacional e dos rearranjos das cadeias laterais do VEGF ao se complexar.

5.3 - Detalhes computacionais

5.3.1 - Estruturas iniciais

Três modelos foram construídos (ver Tabela 5-1): (i) o complexo formado pelo VEGF e duas cópias do segundo domínio do receptor Flt-1 (VEGF_Flt-1_{D2}); (ii) o complexo formado pelo VEGF e duas cópias do peptídeo inibidor v107 (VEGF_v107); (iii) e o complexo formado pelo VEGF e duas cópias de um inibidor v107 mutante, nas quais o resíduo Glu4 foi substituído por uma alanina (VEGF_v107_{mut}).

Tabela 5-1: Estruturas iniciais usadas na simulação.

Modelo	PDB de partida	resíduos do VEGF/cadeia	resíduos do Flt-1 _{D2} /cópia	resíduos do v107/cópia
VEGF_Flt-1 _{D2}	1FLT	11 a 109*	132 a 226*	
VEGF_v107	1KAT	11 a 109		1 a 19
VEGF_v107 _{mut}	1KAT	11 a 109		1 a 19

* Após a inclusão dos resíduos terminais mencionados.

As coordenadas do complexo VEGF_Flt-1_{D2} foram extraídas da estrutura cristalográfica do complexo (código PDB: 1FLT) (WIESMANN, 1997). A estrutura refinada inclui os resíduos 13-107 e 12-109 dos monômeros do VEGF₈₋₁₀₉, e os resíduos 132-225 e 132-226 de cada cópia do receptor Flt-1_{D2}. Os resíduos terminais 11, 12, 108 e 109 do primeiro monômero e o resíduo 11 do segundo monômero do VEGF foram incluídos. O resíduo 226 também foi incluído na primeira cópia do Flt-1_{D2}. Essas inclusões foram feitas para igualar o número de resíduos do VEGF em todos os modelos (11 até 109, que corresponde ao mesmo número de resíduos utilizados na simulação do VEGF livre em solução), bem como, para igualar o número de resíduos nas duas cópias do Flt-1_{D2}. A inclusão desses resíduos foi efetuada por minimização da energia de cada resíduo incluído mantendo o restante da proteína fixo. As coordenadas para o complexo VEGF_v107 foram extraídas da primeira estrutura (modelo 1) de um conjunto de 24 estruturas de RMN (código PDB: 1KAT) (PAN, 2002). Nessa estrutura, cada monômero do VEGF contém os resíduos 11-109 e cada cópia do peptídeo inibidor v107 contém os resíduos 1-19. O complexo VEGF_v107_{mut} foi construído a partir do complexo VEGF_v107 por substituição do resíduo Glu4 por alanina. O domínio de ligação ao receptor do VEGF em todos os modelos inclui os resíduos 11-109.

5.3.2 - Dinâmica molecular

Simulações de dinâmica molecular no *ensemble* NPT foram feitas nos três sistemas descritos no tópico anterior. O programa utilizado foi o GROMACS (LINDAHL, 2001) e o campo de forças foi o OPLS *all atom* (KAMINSKI, 2001). Os sistemas foram submetidos ao processo de minimização descrito na seção 4.3.2. Após a etapa de minimização, cada sistema foi solvatado com moléculas de água do tipo SPC em uma caixa retangular, cujos lados foram mantidos à distância de 0.9 nm da superfície da proteína. Os sistemas foram neutralizados por substituição do número necessário de moléculas de água por contra-íons. As simulações foram realizadas por 10 ns usando as mesmas condições descritas na seção 4.3.2 para o VEGF livre em solução.

5.3.3 - Análise de movimentos correlacionados

A análise de movimentos correlacionados foi realizada conforme descrito na seção 4.3.3. Somente os átomos de C α dos resíduos das regiões mais rígidas do VEGF foram utilizados no processo de sobreposição (resíduos: 18-33, 46-58, 68-78 e 90-100). Como o objetivo, nesse capítulo, é investigar os efeitos provocados no VEGF pela complexação com o receptor ou o inibidor, os mapas de correlação dinâmica cruzada foram construídos utilizando apenas os resíduos do VEGF. Movimentos do receptor e do inibidor foram excluídos da análise.

5.3.4 - Análise de componentes principais

A análise de componentes principais foi feita de acordo com o procedimento descrito na seção 4.3.4. Como acima, somente os resíduos do VEGF foram incluídos na análise.

5.4 - Resultados e discussão

5.4.1 - Estabilidade das simulações

A Figura 5.1 mostra o RMSD relativo à estrutura inicial, o raio de giro (Rg) e a área superficial acessível ao solvente (SASA) de cada simulação. O RMSD relativo à estrutura inicial permaneceu estável após os 5 ns iniciais, convergindo para um valor aproximado de 0,2 nm para cada simulação. As outras propriedades calculadas também indicaram que nenhuma mudança significativa de conformação ocorreu durante o tempo de simulação.

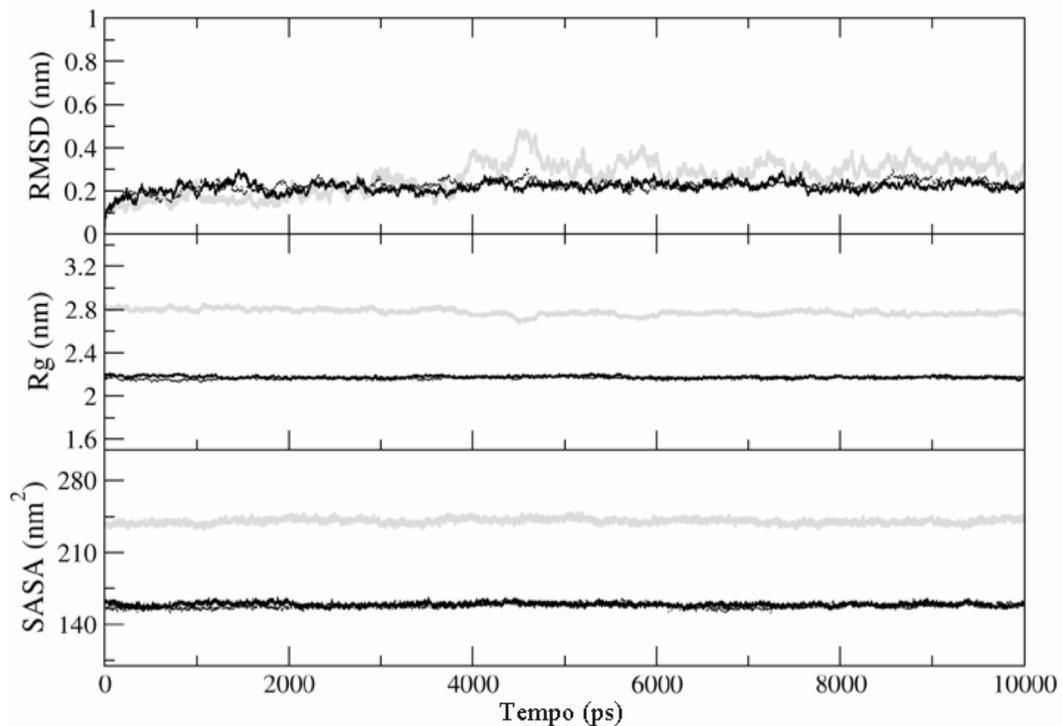


Figura 5.1: (a) RMSD dos átomos de $C\alpha$, (b) raio de giro e (c) área superficial acessível ao solvente dos complexos VEGF_Flt-1_{D2} (linha cinza), VEGF_v107 (linha preta) e VEGF_v107_{mut} (linha preta pontilhada).

5.4.2 - Análise estrutural

A Figura 5.2 mostra a sobreposição das estruturas médias do VEGF livre, do VEGF ligado ao receptor Flt-1 e do VEGF ligado ao inibidor v107. Apenas os resíduos do VEGF são mostrados. A estrutura média de cada simulação foi obtida sobrepondo 2500 estruturas obtidas durante os últimos 5 ns de cada trajetória sobre os átomos de $C\alpha$ dos resíduos mais rígidos do VEGF (18-33, 46-58, 68-78 e 90-100). O RMSD do VEGF complexado com o receptor em relação ao VEGF livre é de 0,95 Å e o RMSD do VEGF complexado com o inibidor em relação ao VEGF livre é de 1,44 Å. Este resultado

indica que a complexação não provoca grandes mudanças conformacionais no VEGF e que o pequeno peptídeo inibidor é capaz de induzir maiores mudanças conformacionais do que o receptor. As regiões mais flexíveis (regiões de alças) sofrem as maiores mudanças conformacionais. Pan e colaboradores (PAN, 2002) mostraram que o RMSD entre a estrutura cristalográfica média do VEGF livre (média das estruturas presentes nas unidades assimétricas das estruturas cristalográficas de códigos PDB: 1VPF e 2VPF) e a estrutura média do conjunto de 24 estruturas obtidas por RMN do VEGF ligado ao v107 é $0,87 (\pm 0,07)$ Å, considerando os resíduos 5-105 do VEGF. Considerando estes mesmos resíduos, o valor de RMSD entre as estruturas médias das simulações do VEGF livre e do VEGF complexado ao v107 cai para $0,83$ Å, mostrando que a simulação está em excelente acordo com os resultados experimentais. Quando o RMSD é calculado entre a estrutura cristalográfica do VEGF ligado ao Flt-1 e a média das estruturas cristalográficas do VEGF livre, considerando os mesmos resíduos (5-105), obtém-se $0,52$ Å, o que é comparável com o valor de $0,67$ Å obtido das estruturas médias das simulações para esses mesmos resíduos. Os resultados acima indicam que a estrutura do VEGF é pouco perturbada pela complexação com o receptor ou o inibidor, como já mencionado pelos experimentalistas (WIESMANN, 1997; PAN, 2002). Os cálculos de RMSD foram executados usando o código Pro-Fit (MCLACHLAN, 1982).

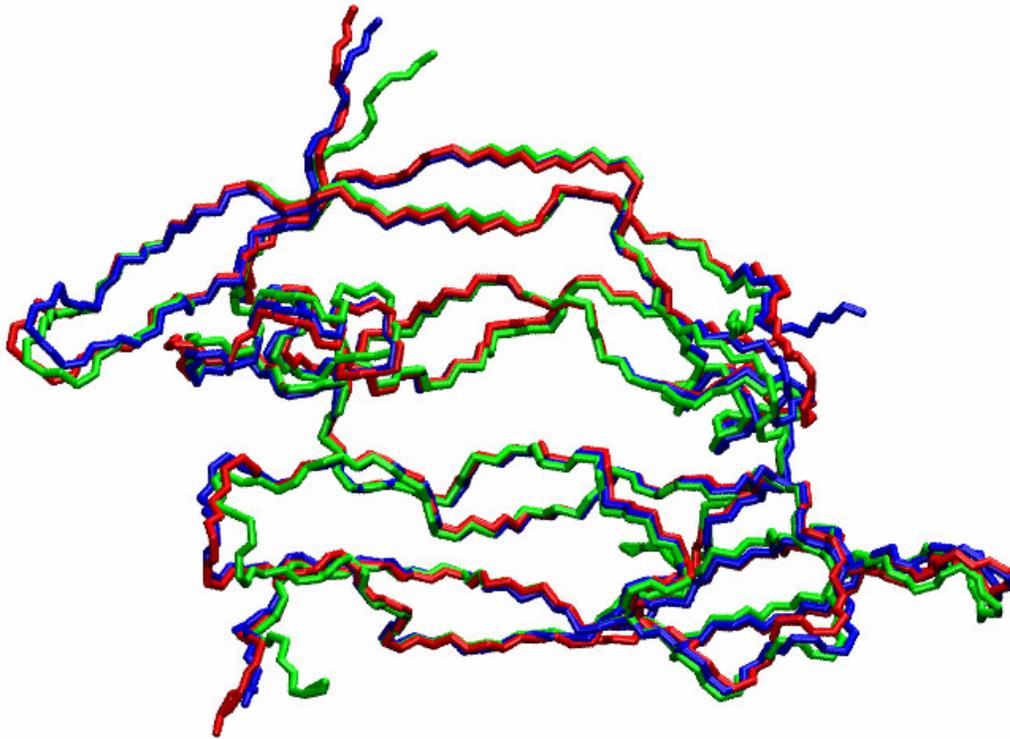


Figura 5.2: Sobreposição das estruturas médias do VEGF livre (azul), VEGF ligado ao Flt-1_{D2} (vermelho) e VEGF ligado ao peptídeo v107 (verde).

As estruturas secundárias do VEGF livre, do VEGF complexado com o Flt-1 e do VEGF complexado com o peptídeo v107 foram extraídas usando o programa STRIDE a cada 10 ps e lançadas em gráfico como função do tempo (Figura 5.3). Nenhuma alteração significativa foi observada na estrutura secundária do VEGF quando da complexação. O conteúdo de estrutura secundária foi obtido efetuando-se a média da porcentagem de cada elemento da estrutura secundária coletado a cada 2 ps sobre os últimos 8 ns da trajetória. O conteúdo de estrutura secundária do VEGF livre é quase idêntico ao do VEGF complexado ao Flt-1, mas difere um pouco do VEGF complexado ao v107, que mostra um conteúdo de hélice- α 1 % maior e um conteúdo de folha- β 1,5 % menor.

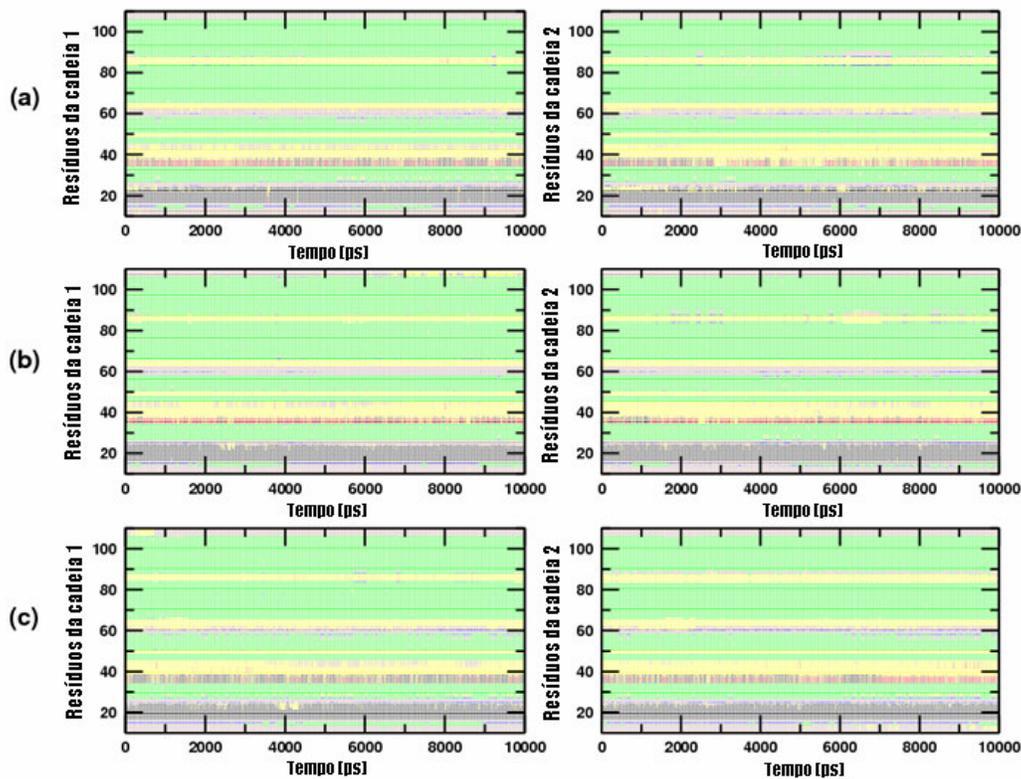


Figura 5.3: Variação da estrutura secundária durante o tempo de simulação. O esquema de cores adotado para estrutura secundária é: hélice- α (preto), hélice-3-10 (vermelho), fita- β (verde), ponte- β (azul), alça (amarelo), volta (coil) (marrom). (a) VEGF livre, (b) VEGF complexado com o Flt-1D2 e (c) VEGF complexado com o peptídeo v107.

O número de ligações de hidrogênio foi calculado utilizando o módulo “g_hbond” do pacote GROMACS (LINDAHL, 2001). A Tabela 5.2 mostra os números médios de ligações de hidrogênio obtidos de 4000 configurações sobre os últimos 8 ns das trajetórias. Estes números foram obtidos definindo dois grupos e calculando a existência ou não da ligação de hidrogênio seguindo o seguinte critério: (i) distância de corte entre os átomos doador e receptor de 3,5 Å; e (ii) ângulo de corte receptor-doador-hidrogênio de 30 graus. Os pares de grupos analisados foram: (i) proteína/proteína; (ii) cadeia-

principal/cadeia-principal; (iii) cadeia-lateral/cadeia-lateral; (iv) cadeia-1/cadeia-2 (intercadeia); (v) cadeia-1/cadeia-1; e (vi) cadeia-2/cadeia-2. Os valores obtidos indicam que a complexação ao Flt-1 reduz ligeiramente o número de ligações de hidrogênio que envolvem cadeias laterais e aumenta o número de ligações de hidrogênio entre cadeias. A complexação ao v107 parece promover alterações maiores no número de ligações de hidrogênio. Nesse caso, o número total de ligações de hidrogênio reduziu-se em aproximadamente 4 unidades, principalmente, pela redução do número de ligações de hidrogênio entre cadeias e ligações de hidrogênio envolvendo cadeias laterais.

Tabela 5-2: Número médio e desvio padrão de ligações de hidrogênio.

	VEGF livre	VEGF_Flt-1	VEGF_v107
Proteína/Proteína	131,0 ± 4,8	130,5 ± 4,9	126,8 ± 4,8
Cadeia-principal/ Cadeia-principal	86,1 ± 3,6	84,4 ± 3,6	85,6 ± 3,4
Cadeia-lateral/ Cadeia-lateral	22,8 ± 2,3	20,9 ± 2,4	19,4 ± 2,7
Cadeia-1/Cadeia-2	8,8 ± 1,5	12,4 ± 2,2	7,6 ± 1,4
Cadeia-1/Cadeia-1	60,4 ± 3,3	59,3 ± 3,2	61,7 ± 3,5
Cadeia-2/Cadeia-2	61,7 ± 3,4	58,9 ± 3,4	57,5 ± 3,1

5.4.3 - Interações entre o VEGF e o receptor Flt-1_{D2}

Flt-1, assim como os demais receptores da família de receptores de VEGF, inclui sete domínios do tipo imunoglobulina em sua porção extracelular. Estudos anteriores mostraram que o domínio-2 complexa-se ao VEGF com uma afinidade cerca de 60 vezes menor do que o receptor completo. Os domínios-2 e -3, juntos, recuperam quase

que totalmente a afinidade por VEGF do receptor completo, o que indica que estes domínios são suficientes para a complexação com o VEGF e que os outros domínios estão relacionados com a transdução do sinal (WIESMANN, 1997)

A estrutura cristalográfica mostrou que o VEGF não sofre mudanças estruturais significativas ao complexar-se com Flt-1. Os dois monômeros do VEGF estabelecem contato com cada cópia do receptor. Cada cópia do receptor mantém contato com um dos pólos do dímero de VEGF, obstruindo aproximadamente 820 \AA^2 da área superficial do VEGF. Os contatos entre o VEGF e as duas cópias do receptor são mantidos principalmente por interações hidrofóbicas (WIESMANN, 1997).

Uma análise da contribuição energética por resíduo foi feita com a finalidade de identificar os resíduos do VEGF que contribuem de forma mais significativa para a energia total de interação com o receptor (Figura 5.4a-b). Esta análise foi feita fazendo-se a média das contribuições eletrostáticas e de Van der Waals (VdW) por resíduo, tratando cada resíduo como um grupo e calculando as interações entre cada grupo e o grupo formado pelo receptor inteiro. Este procedimento é baseado nas propriedades aditivas de um campo de forças parametrizado, portanto, no máximo interpretações qualitativas podem ser extraídas. Dentro das limitações do método, foi possível identificar pares de resíduos importantes na manutenção das interações.

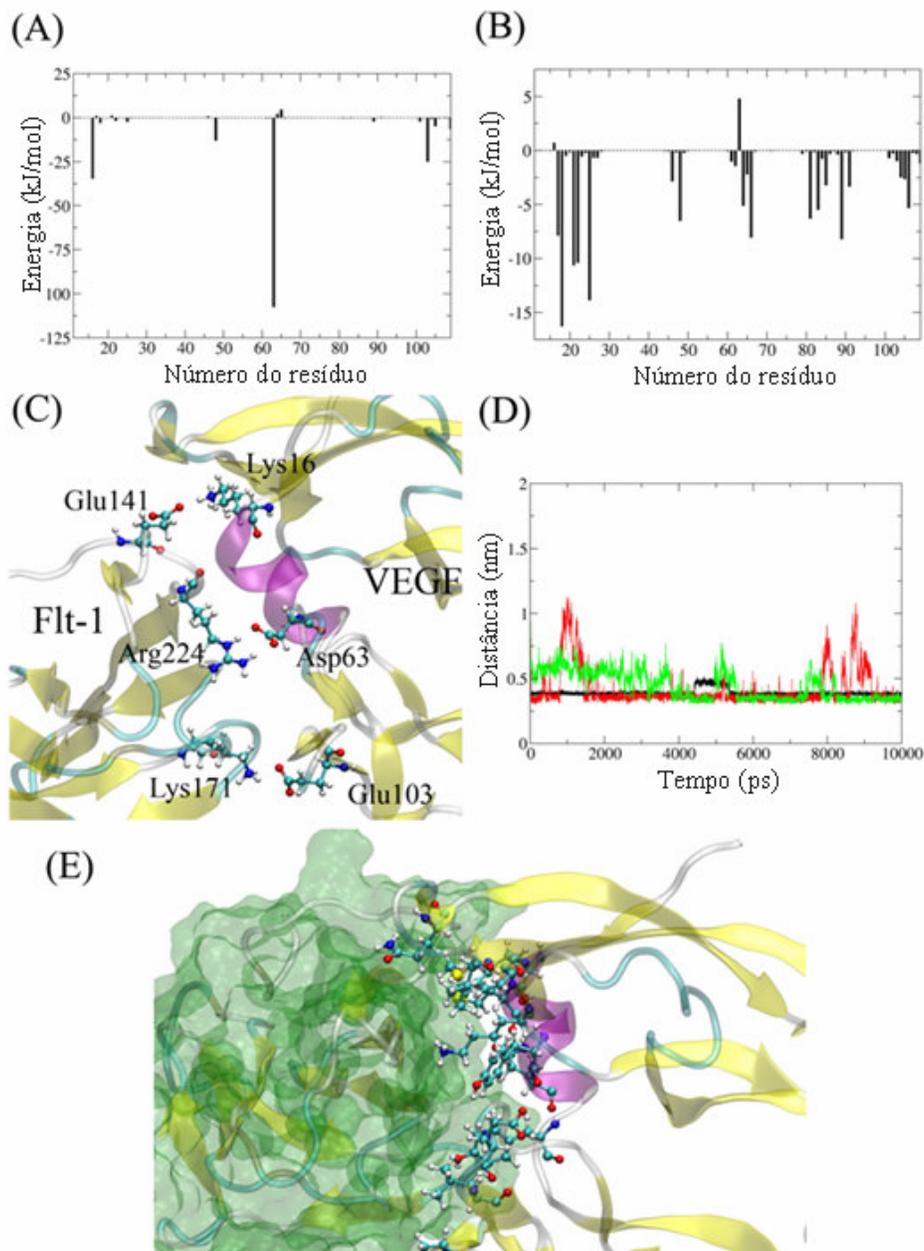


Figura 5.4: (a) Contribuições eletrostáticas e (b) VdW por resíduo do VEGF na interação com o grupo formado pelo receptor inteiro. (c) Interações entre resíduos carregados. (d) Distâncias entre os pares de resíduos: Flt-1-Glu141 e VEGF-Lys16 (vermelho), Flt-1-Arg224 e VEGF-Asp63 (preto), e Flt-1-Lys171 e VEGF-Glu103 (verde). (e) Resíduos do VEGF que contribuem com mais de 5 kJ/mol para a interação de VdW com o receptor.

Wiesmann e colaboradores identificaram uma interação polar na interface entre VEGF e Flt-1, entre os resíduos Arg224 do Flt-1 e Asp63 do VEGF (WIESMANN, 1997). Além desta, três outras interações foram identificadas pela metodologia descrita no parágrafo anterior. Elas ocorrem entre os seguintes resíduos: Flt-1-Lys171 e VEGF-Glu103; Flt-1-Glu141 e VEGF-Lys16; e Flt-1-Thr38 e VEGF-Lys48. Com exceção da última, que é uma interação entre uma carbonila do resíduo não carregado Thr38 com o grupamento amino do resíduo carregado Lys48, as demais ocorrem entre cadeias laterais carregadas (Figura 5.4c). As interações adicionais encontradas, apesar de estáveis durante a simulação (Figura 5.4d), são bem mais fracas do que a descrita por Wiesmann e colaboradores (Figura 5.4a). A mutação desses resíduos por alanina mostraram um decréscimo modesto de afinidade na complexação (KEYT, 1996). Entretanto, apesar das interações identificadas pela simulação não serem fortes, a existência de pares de cadeias laterais com carga complementar pode ter alguma importância na seletividade pelo receptor e na orientação da complexação (AIELLO, 1995).

As interações não-polares também foram analisadas (Figura 5.4b). As contribuições mais importantes são dadas pelos resíduos da interface. A Figura 5.4e mostra os resíduos que contribuem com mais de 5 kJ/mol no total das interações de VdW com o grupo formado pelo receptor. Esses resíduos são: Phe17, Met18, Tyr21, Gln22, Tyr25, Lys48, Glu64, Leu66, Met81, Ile83, Gln89 and Pro106.

5.4.4 - Interações entre o VEGF e peptídeos inibidores

Peptídeos com alta afinidade por VEGF, capazes de inibir a complexação do VEGF com seus receptores foram sintetizados (FAIRBROTHER, 1998). A estrutura cristalográfica do complexo formado por VEGF e duas cópias do peptídeo v108 foi determinada (código PDB: 1VPP). Os autores concluíram que este peptídeo não seria um bom modelo para o desenho de fármacos devido à ausência de interações específicas entre as cadeias laterais do peptídeo e do VEGF (WIESMANN, 1998). Entretanto, como mencionado na Seção 5.1, o peptídeo inibidor v107 (código PDB: 1KAT) se mostrou um excelente candidato a modelo de fármacos (PAN, 2002). As principais interações encontradas entre o VEGF e o v107 são de natureza hidrofóbica. O v107 é um peptídeo anfifílico, e a estrutura do complexo mostra que os resíduos hidrofóbicos estão bem definidos e interagem com a superfície do VEGF, enquanto os resíduos hidrofílicos têm definição menor e estão expostos ao solvente. Como descrito por Pan e colaboradores, as cadeias laterais dos resíduos v107-Ile7, -Ala8, -Met10, -Trp11, -Trp13, -Phe16 e -Leu19 formam uma superfície hidrofóbica que se encaixa bem na superfície formada pelos resíduos Phe17, Met18, Tyr21, Tyr25, Gln22, Tyr25, Lys48, Asn62, Asp63, Leu66, Met81, Ile83 e Cys104 do VEGF. Além disto, os autores sugerem que v107-Arg9 poderia potencialmente formar uma interação eletrostática com VEGF-Glu103 (PAN, 2002).

A análise da simulação por dinâmica molecular do complexo VEGF_v107 revelou que, após 6 ns de simulação, a cadeia lateral do resíduo v107-Arg9 que interagia com v107-Glu4 (Figura 5.5c), rompe esta interação e após mudança drástica de conformação começa a interagir com a cadeia lateral do resíduo VEGF-Glu103 (Figura 5.5d). A nova

interação se manteve estável até o fim da simulação (Figura 5.5e), reforçando a hipótese sugerida pelos experimentalistas.

Uma análise da contribuição energética por resíduo do VEGF foi realizada para identificar os resíduos de maior importância na interação com v107. A Figura 5.5 mostra o valor médio das interações eletrostáticas (a) e de VdW (b) por resíduo do VEGF na interação com o grupo formado pelo inibidor v107. As barras pretas mostram valores obtidos antes da formação da interação eletrostática entre VEGF-Glu103 e v107-Arg9, e as barras vermelhas mostram os valores obtidos depois. Nos dois casos, os resíduos Tyr21 e Asn62 do VEGF contribuem de forma significativa para a interação eletrostática com v107. O oxigênio do grupo fenol da Tyr21 participa de uma ligação de hidrogênio com o NH da cadeia principal do v107-Trp11, ao passo que os hidrogênios do grupamento amida do resíduo Asn62 mantêm interações de hidrogênio com os átomos de oxigênio das carbonilas da cadeia principal dos resíduos Ile7 e Arg9 do v107. Pan e colaboradores mostraram que a maior diferença na interface do VEGF em complexo com Flt-1_{D2} e com v107 está na conformação do resíduo Asn62, que no caso do complexo VEGF_Flt-1_{D2} ($\varphi = \sim 52^\circ$), aponta para fora do sítio de ligação e que, no caso do complexo VEGF_v107 ($\varphi = -76(\pm 9)^\circ$), interage intimamente com v107 (PAN, 2002). Portanto, a interação polar específica entre a cadeia lateral do resíduo Asn62 com a cadeia principal do v107 deve ajudar a manter essa conformação. No caso do VEGF_Flt-1_{D2}, a presença de resíduos hidrofóbicos nessa região da interface deve ser responsável pelo valor positivo do ângulo φ (PAN, 2002). Os experimentalistas também levantaram a possibilidade de um processo de mudança conformacional entre valores positivos e negativos de φ para este resíduo, sugerindo a existência de um processo de equilíbrio entre duas conformações da cadeia principal do VEGF (PAN, 2002). Isso não foi verificado nas simulações de MD do VEGF livre em solução, pelo menos durante o

tempo de simulação (10 ns). Os valores médios do ângulo ϕ do resíduo Asn62 nas simulações foram: $-77(\pm 12)^\circ$ para o VEGF livre; $-70(\pm 10)^\circ$ para o VEGF no complexo com v107; e $75(\pm 10)^\circ$ para o VEGF no complexo com Flt-1_{D2}. É possível que em tempos mais longos de simulação possa-se observar o equilíbrio entre as duas conformações ou que uma mudança conformacional seja induzida pela complexação com Flt-1_{D2}. A Figura 5.5a também mostra a contribuição do resíduo Glu103 quando se forma a interação eletrostática (barra vermelha).

Com o propósito de liberar a cadeia lateral do resíduo v107-Arg9 para interagir com o resíduo VEGF-Glu103, foi construído um complexo do VEGF com um inibidor mutante (ver 5.3.1) no qual o resíduo v107-Glu4 foi substituído por alanina. A simulação desse complexo por 10 ns mostrou que, apesar da cadeia lateral do resíduo v107-Arg9 começar a interagir mais rapidamente com VEGF-Glu103 (~2ns), essa interação não foi tão estável quanto o esperado (Figura 5.5e). Uma das razões para isso é que essa mutação promoveu mudanças conformacionais na estrutura do peptídeo que alteraram os contatos com o VEGF. A mutação fez com que a superfície do peptídeo ficasse mais hidrofóbica e, como essa posição está exposta ao solvente, a reorganização deve ter ocorrido para aumentar a afinidade pelo solvente, reduzindo a afinidade pelo VEGF como um efeito colateral. A mutação desse mesmo resíduo por um resíduo polar ou com carga positiva deve liberar a cadeia lateral de v107-Arg9 sem alterar tão drasticamente os efeitos de solvatação.

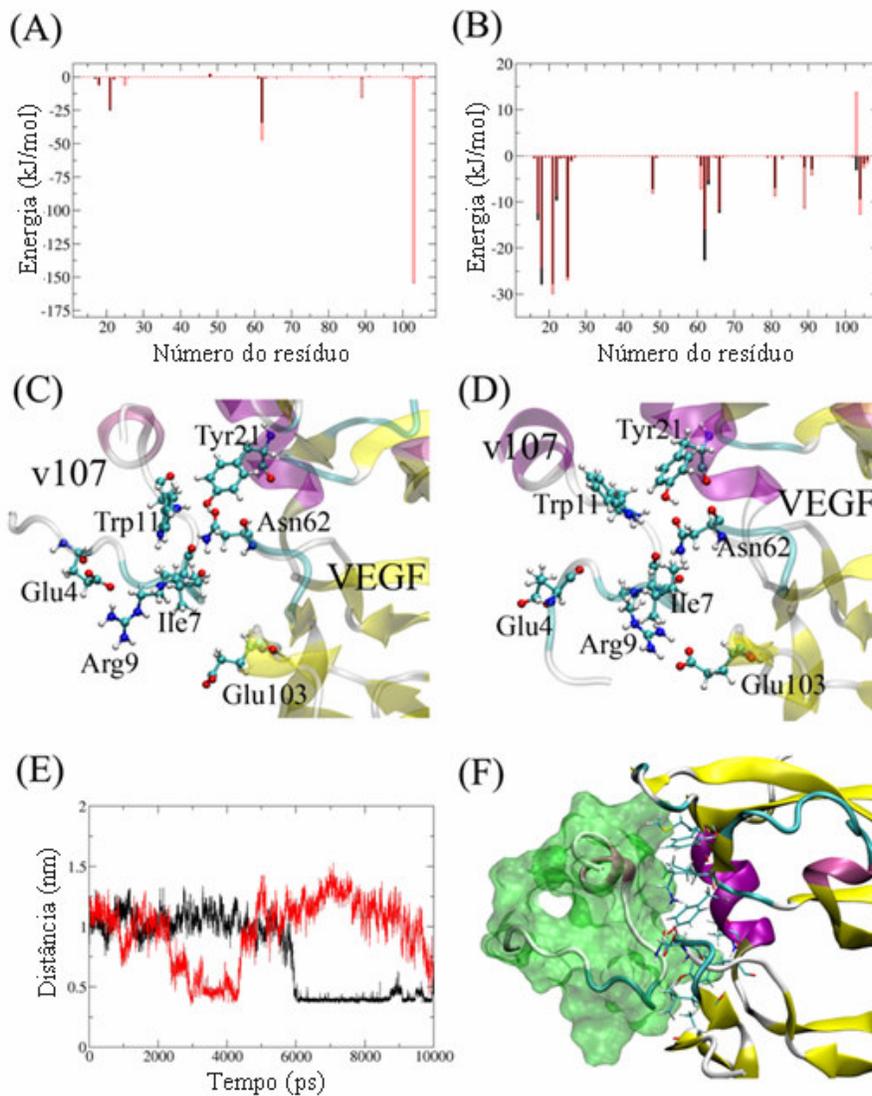


Figura 5.5: (a) Contribuições eletrostáticas e (b) VdW por resíduo do VEGF na interação com o grupo formado pelo v107 inteiro. As barras pretas representam valores médios coletados antes da formação da ponte salina e as barras vermelhas representam valores médios coletados depois de sua formação. Interações entre resíduos carregados antes (c) e depois (d) da formação da ponte salina. (e) Distâncias entre o par de resíduos v107-Arg9 e VEGF-Glu103. A linha preta corresponde à simulação do complexo VEGF_v107 e a linha vermelha corresponde ao complexo VEGF_v107_{mut}. (f) Resíduos do VEGF que contribuem com mais de 5 kJ/mol para a interação de VdW com o v107.

Análises de mutações são frequentemente feitas por experimentalistas com a finalidade de estimar a contribuição de cada resíduo para a energia total de interação. O resultado acima mostra uma situação em que se espera uma contribuição não-aditiva para a energia total de interação porque mudanças conformacionais pronunciadas podem ocorrer quando da substituição de um resíduo. Não existem resultados experimentais para a substituição do resíduo v107-Glu4. Entretanto, Pan e colaboradores observaram contribuições não-aditivas quando da mutação de resíduos hidrofóbicos do v107 por resíduos de alanina (PAN, 2002). Isso indica que mutações pontuais podem afetar profundamente a estrutura do peptídeo no estado complexado. Sabe-se que o peptídeo livre não tem uma estrutura única em solução (PAN, 2002), o que dificulta evidenciar experimentalmente o efeito das mutações sobre a estrutura do peptídeo.

As interações de VdW também foram analisadas na simulação. A figura 5.5f mostra os resíduos do VEGF que contribuem com mais de 5 kJ/mol para a interação com o inibidor v107. Estes resíduos são: Phe17, Met18, Tyr21, Gln22, Tyr25, Lys48, Asn62, Asp63, Leu66, Met81 e Cys104. A análise sugere que o resíduo Asn62 é um dos mais importantes na interação com o v107, mas ainda não foram feitos experimentos de mutação que confirmem este resultado.

5.4.5 - Análise de cadeias laterais

Distribuições de probabilidade ao longo do ângulo χ foram calculadas com o propósito de analisar os efeitos da complexação nas cadeias laterais de resíduos selecionados do VEGF, localizados na região de ligação com o receptor, mostrados na

Figura 5.4e. Na Figura 5.6, as linhas pretas correspondem ao VEGF livre, as linhas vermelhas ao VEGF_Flt-1_{D2} e as linhas verdes ao VEGF_v107. Algumas distribuições não são afetadas pela complexação. É o caso dos resíduos Phe17, Tyr25, Leu66, Met81 e Ile83. Para Met18 e Tyr21, pode-se notar que as distribuições são semelhantes entre o VEGF livre e o VEGF_Flt-1_{D2}. Gln22 tem distribuição de probabilidade angular bem mais localizada no caso do VEGF_Flt-1_{D2} do que no caso do VEGF livre ou do VEGF_v107. Lys48 e Glu64 estão mais localizadas no VEGF livre. Finalmente, Gln89 e Pro106 têm distribuições semelhantes entre VEGF livre e VEGF_v107, mas bem diferentes da distribuição encontrada em VEGF_Flt-1_{D2}. A diversidade da orientação dessas cadeias laterais podem implicar em novas estratégias para o desenho de fármacos e para a docagem já que o rearranjo das cadeias laterais pode aumentar a afinidade de complexação.

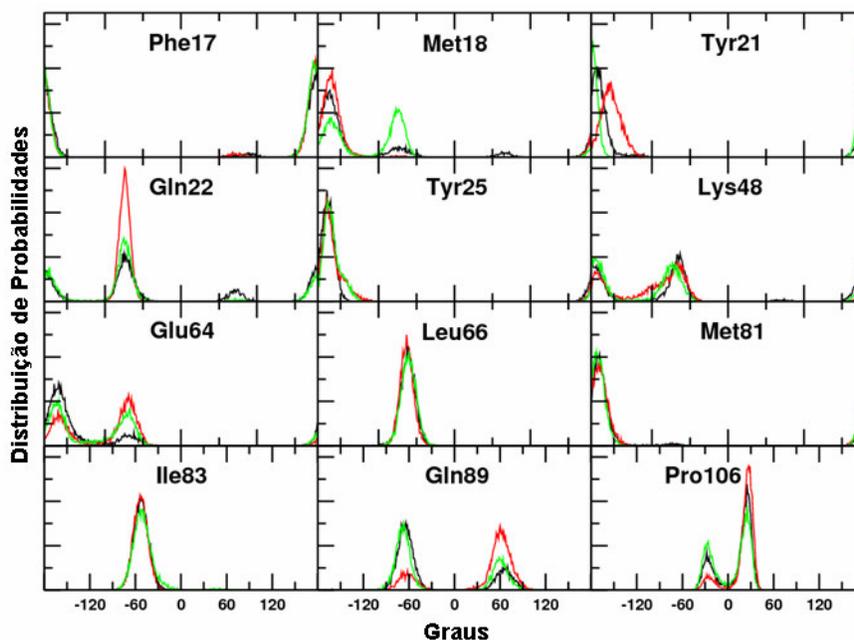


Figura 5.6: Distribuições de probabilidades ao longo do ângulo χ para resíduos selecionados da região de interface com o receptor. VEGF livre está em preto, VEGF_Flt-1_{D2} em vermelho e VEGF_v107 em verde.

5.4.6 - Flutuações atômicas

Fatores-B experimentais estão disponíveis na literatura para o VEGF livre e para o VEGF ligado ao Flt-1_{D2} (MULLER, 1997a; WIESMANN, 1997). No entanto, comparar qualitativa e quantitativamente fatores-B obtidos por difração de raios-X não é uma tarefa simples pois cada cristal é obtido em condições experimentais diferentes, o que pode afetar as flutuações térmicas (FRAUENFELDER, 1979). Portanto, na tentativa de melhor entender os efeitos da complexação nas flutuações atômicas do VEGF, foram comparados fatores-B calculados nas mesmas condições e tempo de simulação. Os fatores-B dos átomos de Ca foram calculados sobre 40 blocos de 250 ps com intervalos de tempo de 2 ps. Dentro de cada bloco, foi efetuada a média dos fatores-B. A média dos fatores-B entre os monômeros foi também obtida. A Figura 5.7 mostra a evolução temporal dos fatores-B coletados dessa forma. Pode ser útil avaliar a evolução temporal para estimar a convergência das flutuações atômicas e, também, para identificar regiões onde o mesmo resíduo possui diferentes valores de fator-B, o que permite identificar transições entre conformações. Três desses gráficos são mostrados na Figura 5.7. O da esquerda refere-se ao VEGF livre em solução, o do meio ao VEGF complexado com o Flt-1_{D2} e o da direita ao VEGF complexado com o v107. A comparação desses gráficos mostra que as flutuações são de alguma forma maiores na proteína livre do que na proteína complexada. Esse efeito é mais pronunciado nas regiões que envolvem os resíduos 10-20 (hélice- α que faz parte da região de complexação), 35-47 (região da alça-1), 60-70 (alça-2 e parte da fita- β adjacente), e 85-90 (alça-3). As porções N- e C-terminais são também um pouco mais flexíveis no VEGF livre. Gráficos de RMSD foram colocados abaixo de cada gráfico de fator-B para dar uma idéia do período de tempo em que cada bloco foi coletado. O painel inferior mostra a média dos fatores-B

sobre os 40 blocos. Exeto pela região que compreende os resíduos 60 e 70, nenhuma diferença muito significativa em regiões específicas pode ser observada sobre essa média total, mas a ordem crescente de flexibilidade é notável: o VEGF complexado ao Flt-1_{D2} é menos flexível do que o VEGF complexado ao v107, que por sua vez, é menos flexível do que o VEGF livre.

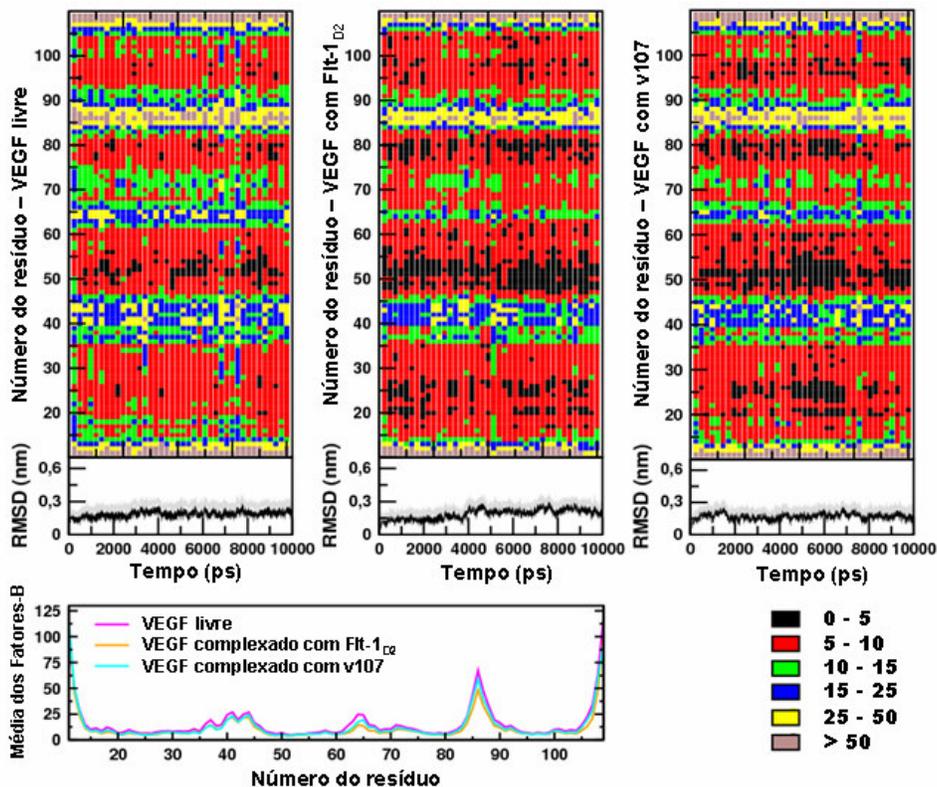


Figura 5.7: Painéis na parte superior mostram a evolução temporal dos fatores-B coletados de janelas consecutivas de 250 ps. O painel da esquerda refere-se ao VEGF livre, o do meio ao VEGF com o Flt-1_{D2} e o da direita ao VEGF com o v107. Apenas os resíduos do VEGF são mostrados e os valores referem-se à média entre as duas cadeias. As intensidades dos fatores-B são dadas pela legenda no canto inferior direito. Abaixo de cada painel está um gráfico de RMSD em que a linha preta refere-se ao RMSD calculado sobre os átomos de Ca e a linha cinza ao RMSD calculado sobre todos os átomos. O RMSD médio de todos os 40 blocos é mostrado no painel inferior esquerdo.

5.4.7 - Movimentos coletivos

O Capítulo anterior descreveu o comportamento dinâmico do VEGF, incluindo uma análise de movimentos correlacionados que revelou a natureza coletiva do movimento dos resíduos localizados em um mesmo pólo do VEGF. Para analisar os efeitos da complexação sobre as correlações, o mesmo procedimento para o cálculo dos mapas de correlação dinâmica cruzada (DCCM) foi utilizado nos complexos.

A Figura 5.8 mostra os DCCMs para o VEGF livre, VEGF_Flt-1_{D2}, VEGF_v107 e VEGF_v107_{mut}. Como descrito anteriormente, no VEGF livre (Figura 5.8a) observa-se correlações relativamente fortes entre os resíduos que formam a alça-1 (39-45), alça-2 (62-67), alça-3 (84-89), e alguns resíduos de folha- β (46-49 e 90-95). Além disso, algumas correlações fora da diagonal ocorrem entre resíduos distantes na sequência primária, como a correlação entre os alças-1 e -3 (39-45 com 84-89), entre resíduos pertencentes a diferentes fitas da folha- β (25-35 com 52-60; 43-50 com 79-83), e entre a porção C-terminal e a alça-2 (103-109 com 62-67). Comparando o DCCM do VEGF livre, com os do VEGF nos complexos (Figura 5.8b-d), é possível notar uma pequena diminuição nas intensidades das correlações. Apesar das pequenas diferenças, o padrão geral das correlações é bem semelhante.

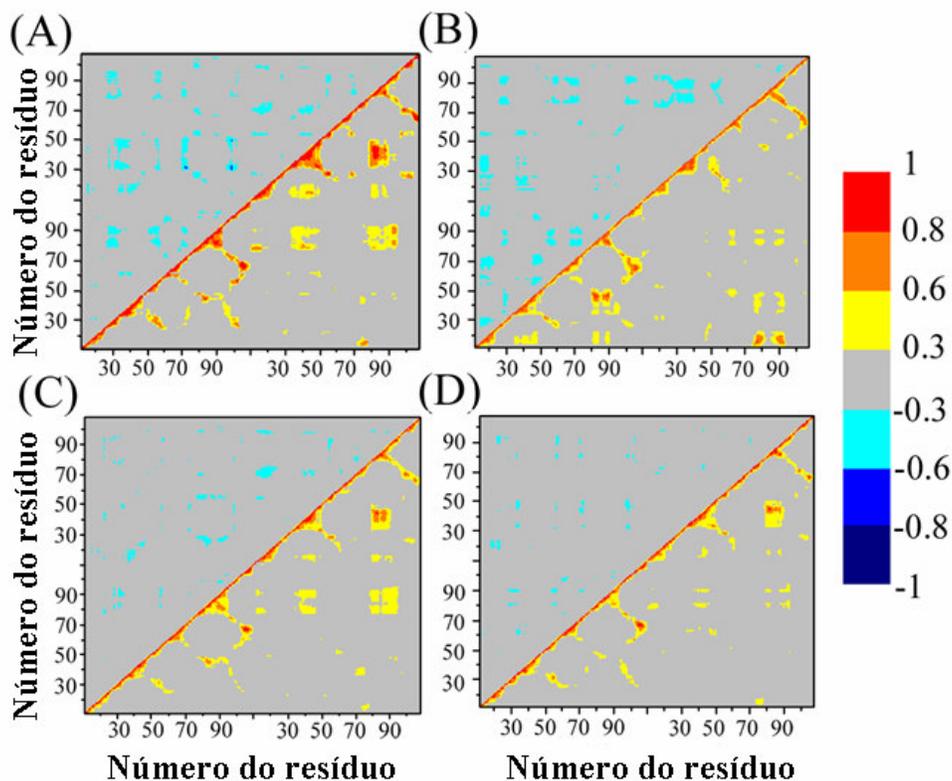


Figura 5.8: Mapas de correlação dinâmica cruzada (DCCMs). As correlações (isto é, valores positivos) estão mostradas abaixo e as anticorrelações (isto é, valores negativos), acima da diagonal. Os coeficientes de correlação foram calculados efetuando-se a média de 5 blocos consecutivos de 1000 ps sobre os últimos 5 ns da trajetória. São mostrados apenas os coeficientes com módulo acima de 0,3. (a) VEGF livre, (b) VEGF_Flt-1_{D2}, (c) VEGF_v107 e (d) VEGF_v107_{mut}.

5.4.8 - Análise de componentes principais

O capítulo anterior, descreveu uma análise de componentes principais do VEGF livre em solução. Os resultados mostraram que os primeiros 10 modos de movimento são responsáveis por 99,3 % do RMSF total. Isso indica que a dinâmica do VEGF é

dominada pelos primeiros poucos componentes. O primeiro modo corresponde a um movimento do tipo borboleta, como se os pólos do dímero do VEGF se projetassem simetricamente um contra o outro como as asas de uma borboleta. Na análise, esse modo de movimento é responsável por 72,8 % do RMSF total.

A mesma análise foi realizada para o VEGF_flt-1_{D2} e para o VEGF_v107. Para cada sistema a matriz de covariância $3N \times 3N$ foi construída e diagonalizada. Para assegurar que a amostragem configuracional da análise de covariância foi suficiente para fornecer um conjunto consistente de autovetores, a raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP: *root mean square inner products*) (equação 33) foi calculada entre intervalos crescentes da primeira metade da análise (de 5000 ps até 7500 ps) com a segunda metade (de 7500 ps até 10000 ps) envolvendo o subespaço composto pelos primeiros 10 autovetores. A Figura 5.9 mostra a evolução do RMSIP calculado para o VEGF complexado ao Flt-1_{D2} e para o VEGF complexado ao v107. A linha preta contínua refere-se à sobreposição entre autovetores obtidos do mesmo sistema mas de diferentes subpartes da trajetória (e.g. VEGF_Flt-1_{D2} 5000-7500 x VEGF_Flt-1_{D2} 7500-10000), servindo como uma medida da convergência da simulação. Os gráficos superiores referem-se ao espaço completo (isto é, o espaço formado por todos os autovetores) e os gráficos inferiores referem-se ao espaço considerado essencial (isto é, o espaço formado pelos primeiros 10 autovetores). As simulações convergiram razoavelmente bem, com valores de sobreposição de ~0,6 (espaço completo) e ~0,5 (espaço essencial). O VEGF ligado ao v107 mostra convergência um pouco melhor (HORTA, 2008b). As linhas descontínuas referem-se à sobreposição entre os autovetores do sistema ligado (por exemplo, VEGF_Flt-1_{D2}) com os autovetores do VEGF livre para a mesma subparte da trajetória (por exemplo, VEGF_Flt-1_{D2} 5000-7500 x VEGF livre 5000-7500). A linha pontilhada representa a primeira subparte de

2500 ps e a linha tracejada representa a segunda subparte de 2500 ps. Os autovetores do VEGF ligado com o v107 têm boa sobreposição com os autovetores do VEGF livre, mas o mesmo não ocorre com o VEGF ligado com o Flt-1_{D2}. Isso indica que o comportamento dinâmico do VEGF livre é mais semelhante ao comportamento dinâmico do VEGF_{v107}, se comparado ao VEGF_{Flt-1_{D2}}. Em outras palavras, a ligação ao receptor induz modificações dinâmicas mais intensas no VEGF. Todos os sistemas preservaram um movimento do tipo borboleta como principal modo de movimento. Apesar dessa semelhança, algumas diferenças podem ser observadas nas estruturas extremas (Figura 5.10). No caso do VEGF livre, observa-se um deslocamento simétrico dos pólos; no caso do VEGF complexado ao Flt-1, observa-se que os pólos superiores estão mais próximos do que os inferiores, o que indica uma certa assimetria desse modo; e no caso do VEGF complexado ao v107, observa-se também uma certa assimetria, mas cada pólo possui uma conformação intrínseca diferente. Essa diferença de conformação entre os pólos do v107 é também detectada em outras análises, como por exemplo na superposição das estruturas médias (Figura 5.2) e na diferença do número de ligações de hidrogênio do tipo intra-cadeia (Tabela 5.2). Juntos, estes resultados podem ser uma consequência da diferença de orientação das duas cópias do v107 na região de complexação.

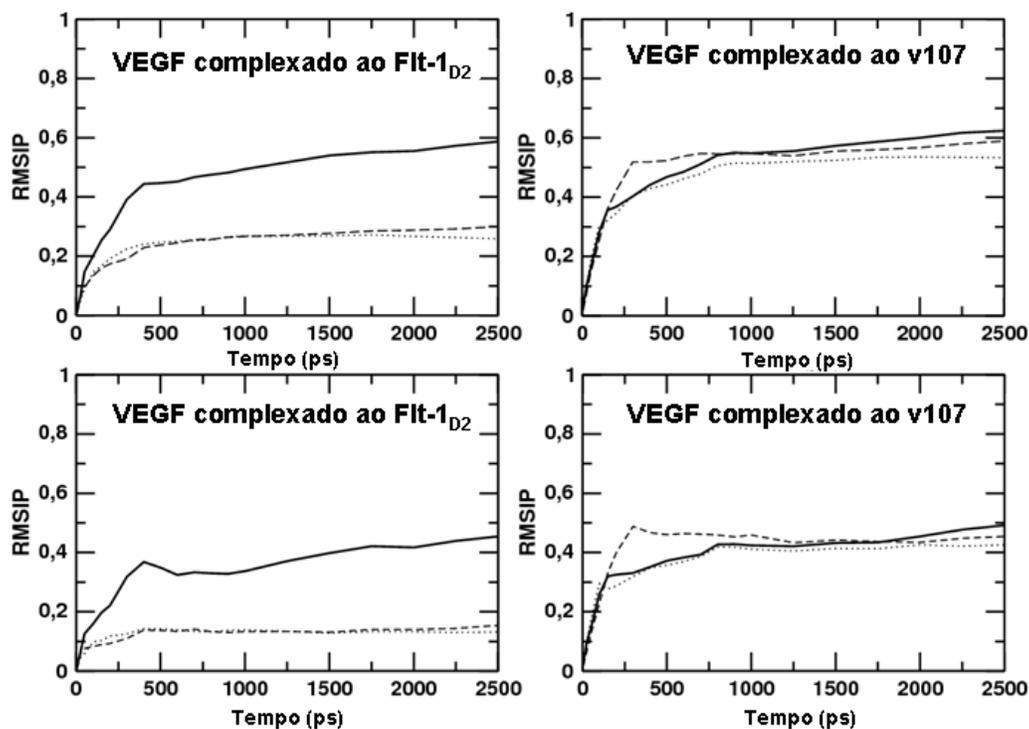


Figura 5.9: Gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo. Os painéis superiores correspondem à análise sobre o espaço completo (isto é, incluindo todos os autovetores) e os painéis inferiores ao espaço considerado essencial (isto é, incluindo somente os primeiros 10 autovetores). As linhas contínuas correspondem à sobreposição entre autovetores do mesmo sistema, mas diferentes subpartes de 2500 ps. As linhas não contínuas correspondem à sobreposição dos autovetores do VEGF complexado com o VEGF livre, sendo que as linhas pontilhadas e tracejadas correspondem, respectivamente, à primeira e à segunda subpartes.

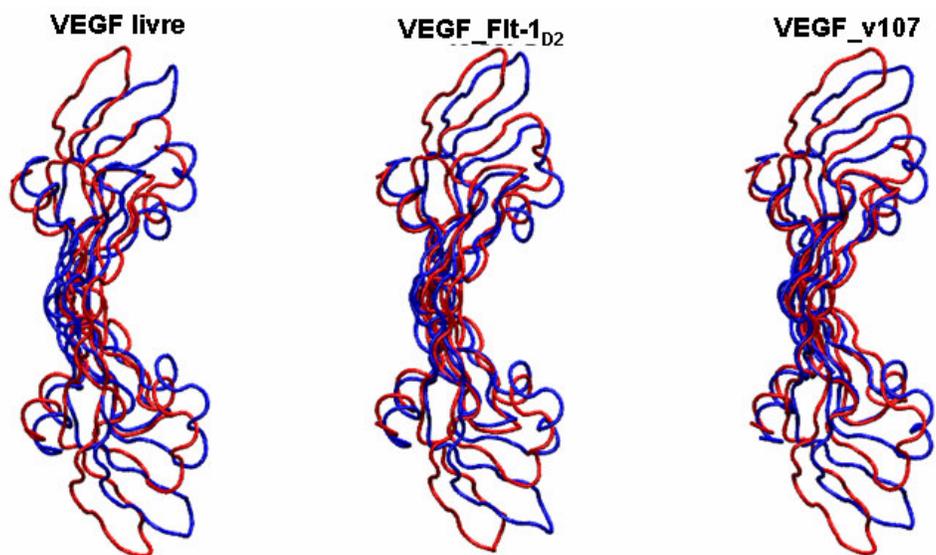


Figura 5.10: Estruturas extremas obtidas da projeção de cada trajetória no primeiro modo de movimento correspondente.

A Tabela 5.3 lista os valores mínimos, máximos, amplitude máxima, autovalores e porcentagem do RMSF total relativos ao primeiro autovetor de cada trajetória. Pode-se notar que a complexação reduz a amplitude máxima atingida pela projeção da trajetória no primeiro modo de movimento. O autovalor e a porcentagem do RMSF total também se reduzem quando da complexação, sugerindo que a dinâmica do VEGF livre é mais coletiva. É possível que a perda de coletividade durante o processo de complexação esteja relacionada com fatores entrópicos importantes.

Tabela 5-3: Propriedades do primeiro autovetor da PCA.

	VEGF livre	VEGF_Flt-1 _{D2}	VEGF_v107
Valor mínimo*	-2.214	-1.391	-1.679
Valor máximo*	1.989	1.706	1.627
Amplitude max.*	4.202	3.097	3.306
Autovalor	0.578	0.303	0.300
% do RMSF	72.8 %	66.1 %	65.4 %

* Obtidos da projeção da trajetória no primeiro modo. Valores em nm.

5.5 – Conclusões

As respostas biológicas geradas pelos membros da família de VEGF são relacionadas a características diferentes de cada VEGF na ativação de receptores, que correspondem a pequenas diferenças estruturais. A compreensão de como essas pequenas diferenças estruturais regulam a transdução de sinal e, conseqüentemente, as respostas biológicas, pode ser uma chave para a modulação consciente do processo de angiogênese por um desenho inteligente de promotores e inibidores. Além do grande esforço experimental, que revelou propriedades estruturais e funcionais específicas para cada fator de crescimento vascular endotelial que governam a ativação dos receptores, o uso de metodologias teóricas pode auxiliar na interpretação dos dados experimentais, na proposta de novos experimentos e no desenho racional de novos inibidores (ou promotores).

Neste capítulo, foram analisados os efeitos da complexação com o segundo domínio do receptor Flt-1 e com o inibidor peptídico v107 sob três aspectos: estrutura, interações e dinâmica. No aspecto estrutural, em acordo com os resultados

experimentais, foi mostrado que a estrutura do VEGF não é significativamente afetada pela complexação. No entanto, foi mostrado também que o pequeno peptídeo de 19 aminoácidos, v107, é capaz de promover maiores mudanças na estrutura média e no padrão de ligações de hidrogênio do que o receptor Flt-1_{D2}. No contexto das interações, uma análise de partição de energia por resíduo foi utilizada para analisar as contribuições de cada resíduo do VEGF na interação com o receptor Flt-1_{D2} e com o inibidor v107. Novas interações foram identificadas e descritas. É provável que as interações de cargas complementares sirvam para orientar na complexação e no reconhecimento molecular. A análise da distribuição conformacional das cadeias laterais revelou rearranjos interessantes que poderiam ser explorados num futuro melhoramento das metodologias de “docking” e desenho de fármacos. Finalmente, no aspecto dinâmico, foram descritas flutuações atômicas, correlações e análise de componentes principais. As flutuações não foram afetadas muito significativamente pela complexação, sendo de alguma forma menores nos estados complexados, como era de se esperar. Os mapas de correlação dinâmica cruzada mostraram que os movimentos do VEGF livre são mais correlacionados do que nos complexos. A análise de componentes principais revelou que, apesar da estrutura média do VEGF complexado com o Flt-1_{D2} ser mais parecida com a do VEGF livre, se comparada ao VEGF complexado com o v107, o comportamento dinâmico não o é. A sobreposição dos modos essenciais do VEGF complexado com o v107 com os do VEGF é maior, indicando que o receptor Flt-1_{D2} é capaz de induzir maiores modificações no comportamento dinâmico do que o inibidor v107. Uma diminuição da importância do primeiro autovetor é observada quando da complexação, indicando que os movimentos do VEGF livre são mais coletivos do que os movimentos do VEGF complexado. A importância de movimentos coletivos na entropia conformacional de processos biológicos como catálise e

complexação com o receptor tem suporte em experimentos de RMN (JARYMOWYCZ, 2006). Em alguns casos de ligação proteína-proteína ou proteína-ligante a entropia desempenha papel fundamental (JUSUF, 2002). Mesmo que seja cedo para lançar a hipótese de que os movimentos correlacionados poderiam influenciar a entropia conformacional do processo de complexação do VEGF, os resultados aqui mostrados indicam que isso não deve ser ignorado.

6 - O papel do nó de cistina na estrutura e na dinâmica do VEGF

6.1 – Introdução

O fator de crescimento vascular endotelial faz parte de uma superfamília de proteínas caracterizada pela presença de ligações dissulfeto muito conservadas que formam o chamado “nó de cistina” (MULLER, 1997a). O VEGF tem oito resíduos de cisteína em cada monômero, seis responsáveis por três ligações dissulfeto intramoleculares (Cys26 – Cys68, Cys57 – Cys102, Cys61 – Cys104) e dois responsáveis por duas ligações dissulfeto entre os dois monômeros (Cys51 – Cys60* e Cys51* - Cys60; em que o asterísco indica que o resíduo pertence ao outro monômero).

Em 1994, Pötgens e colaboradores (PÖTGENS, 1994) demonstraram experimentalmente que a dimerização covalente é necessária para a atividade biológica do VEGF já que, a mutação dos resíduos Cys51 ou Cys60 para serina impede a dimerização e leva à perda de atividade. A mutação do resíduo Cys57 para serina, porém, não impede a formação do dímero, nem perturba drasticamente a atividade biológica do VEGF. O mesmo trabalho mostrou também que a mistura dos mutantes C57S e C60S, na mesma proporção, origina um dímero com uma única ligação dissulfeto entre os monômeros e que esta espécie heterodimérica é tão ativa quanto o VEGF original.

Em 2002, Muller e colaboradores (MULLER, 2002) mostraram que o nó de cistina não tem importância na manutenção da estabilidade termodinâmica do VEGF. Aliás, o trabalho mostrou que a mutação, por alanina, de pares de resíduos de cisteína envolvidos nas ligações dissulfeto estabiliza o VEGF em ~2 kcal/mol. Entretanto,

observou-se que as ligações dissulfeto são importantes para manter a estabilidade térmica (isto é, a resistência à desnaturação provocada pelo aumento da temperatura) e para a manter a integridade estrutural do VEGF.

De forma geral, a literatura mostra que as ligações dissulfeto são importantes para regular a estabilidade termodinâmica, induzir um determinado tipo de enovelamento e até modular a atividade de algumas proteínas (BARFORD, 2004; ISHIKAWA, 2007). Estudos de dinâmica molecular foram utilizados para investigar o papel das ligações dissulfeto nos movimentos internos de proteínas (TIDOR, 1993; MOGHADDAM, 2006). Como um fator restritivo, sabe-se que essas ligações implicam na redução da entropia do sistema, no aumento das correlações dos movimentos internos, na alteração do padrão de ligações de hidrogênio e na alteração de interações de longo alcance (MOGHADDAM, 2006).

O uso de simulações de dinâmica molecular no refino de estruturas obtidas por homologia, obtidas por métodos *ab initio* e geradas por mutações de resíduos na seqüência de uma proteína de estrutura tridimensional conhecida é muito discutido na literatura (VENCLOVAS, 2001; SCHONBRUN, 2002; MARK, 2004). O paradigma de que simulações de dinâmica molecular não são capazes de refinar essas estruturas na ausência de dados experimentais vem sendo derrubado. O trabalho de Mark e colaboradores (MARK, 2004) mostra que estruturas de proteínas com até 100 resíduos, geradas por homologia ou por métodos *ab initio* de predição estrutural, foram, de forma geral, refinadas e tornaram-se bem semelhantes a suas estruturas cristalográficas. Os autores ressaltam que, no passado, a maior parte dos trabalhos mostrava que a ineficiência das simulações no refino de estruturas era devida, basicamente, à não inclusão da descrição atômica completa do sistema, à não inclusão discreta do solvente e ao curto tempo das simulações, que não eram longas o suficiente para que as

mudanças conformacionais necessárias ocorressem. Nesse trabalho, os autores mostram que, para um conjunto de 15 estruturas de proteínas com tamanho médio de 100 aminoácidos, mudanças conformacionais importantes começam a acontecer após ~5 ns e que, em alguns casos, são necessários tempos superiores a 100 ns para obter-se a estrutura refinada.

6.2 - Objetivos

No presente Capítulo, pretende-se verificar a viabilidade do uso de simulações de dinâmica molecular no refino de estruturas tridimensionais de proteínas mutantes partindo da proteína nativa.

O propósito de gerar estruturas razoáveis para as proteínas mutantes é impulsionado pelo desejo de investigar o papel do nó de cistina por simulações computacionais na estrutura e na dinâmica do VEGF visto que ele não estabiliza termodinamicamente a proteína.

6.3 - Detalhes computacionais

6.3.1 - Estruturas iniciais

Para investigar o papel das ligações dissulfeto, oito simulações de dinâmica molecular foram realizadas. Cinco delas partiram da mesma estrutura utilizada como ponto de partida na simulação do VEGF livre, ou seja, a primeira estrutura (modelo 1 do

conjunto de estruturas de código PDB: 1KAT) de RMN, determinada por Pan e colaboradores (PAN, 2002). Para estas cinco simulações, a estrutura inicial foi primeiramente manipulada para a construção dos mutantes. O mutante C51A/C60A, caracterizado pela ausência das ligações dissulfeto entre os monômeros (ver Figura 6.1), foi construído pela substituição dos resíduos Cys51 e Cys60 por alanina. O mutante heterodímero C51A/C60A*, caracterizado pela ausência de uma das ligações dissulfeto entre os monômeros, foi construído pela substituição do resíduo Cys51 de um monômero e do resíduo Cys60 do outro monômero por alanina. O mutante heterodímero C51S/C60S* foi construído da mesma forma que o C51A/C60A*, porém, os resíduos de cisteína foram substituídos por serina. O mutante C57A/C102A foi construído pela substituição dos resíduos Cys57 e Cys102 por alanina e o mutante C61A/C104A pela substituição dos resíduos Cys61 e Cys104 também por alanina (ver Figura 6.1). As três outras simulações tiveram como ponto de partida estruturas cristalográficas depositadas no PDB. Muller e colaboradores (MULLER, 2002) determinaram as estruturas tridimensionais dos mutantes C51A/C60A, C57A/C102A e C61A/C104A (códigos PDB: 1MJV, 1MKG e 1MKK, respectivamente) por difração de raios-X. O símbolo § foi utilizado para indicar que estas simulações partiram de estruturas cristalográficas.

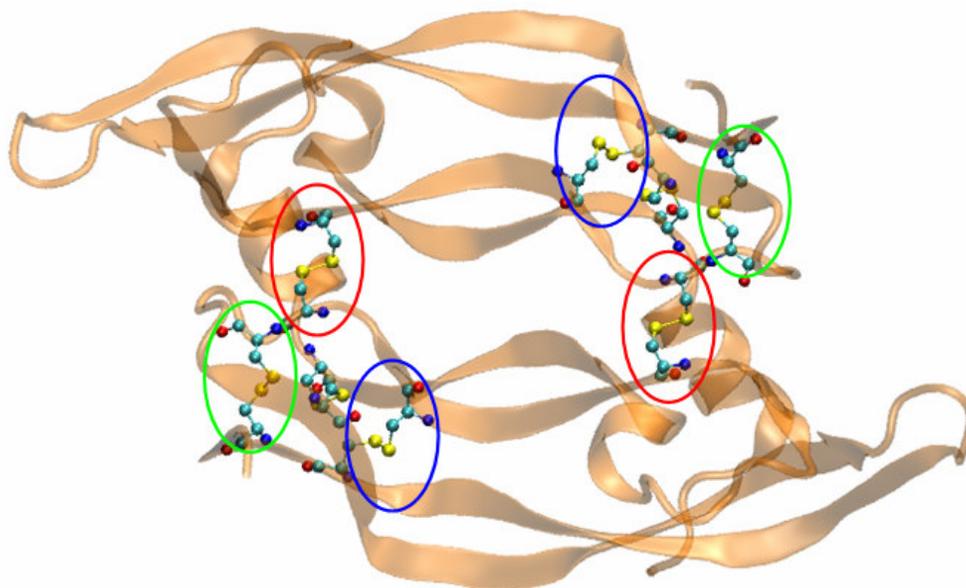


Figura 6.1: As elipses em vermelho mostram as ligações dissulfeto entre monômeros. Elas são formadas pelos resíduos Cys51 de um monômero e Cys60 do outro. Os mutantes C51A/C60A* e C51S/C60S* foram construídos para apresentarem somente uma dessas ligações dissulfeto. As elipses em azul mostram as ligações dissulfeto formadas pelos resíduos Cys57 e Cys102 e as elipses em verde mostram as ligações formadas por Cys61 e Cys104.

6.3.2 - Dinâmica molecular e análises posteriores

As oito simulações de dinâmica molecular foram realizadas no *ensemble* NPT, pelo uso do programa GROMACS (LINDAHL, 2001) e do campo de forças OPLS *all atom* (KAMINSKI, 2001). Cada simulação teve 10 ns de duração. Os procedimentos computacionais utilizados estão descritos nas Seções 4.3.2 e 5.3.2. Os mapas de correlação foram calculados de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.3.3 e a análise de componentes principais seguiu o procedimento descrito na Seção 4.3.4.

6.4 - Resultados e discussão

6.4.1 - Estabilidade das simulações

A Figura 6.2 mostra o RMSD relativo à estrutura inicial, o raio de giro (Rg) e a área superficial acessível ao solvente (SASA) de cada simulação cujo ponto de partida foi a estrutura de RMN do VEGF (ver Seção 6.3.1). A Figura 6.3 mostra os mesmos dados para as simulações que tiveram estruturas cristalográficas como ponto de partida. Nota-se a razoável estabilização das trajetórias. Todas as simulações tiveram valores de RMSD maiores do que o VEGF nativo (abreviado por WT VEGF: *wild type* VEGF). Observa-se também raios de giro e SASA maiores para os mutantes do que para o WT VEGF.

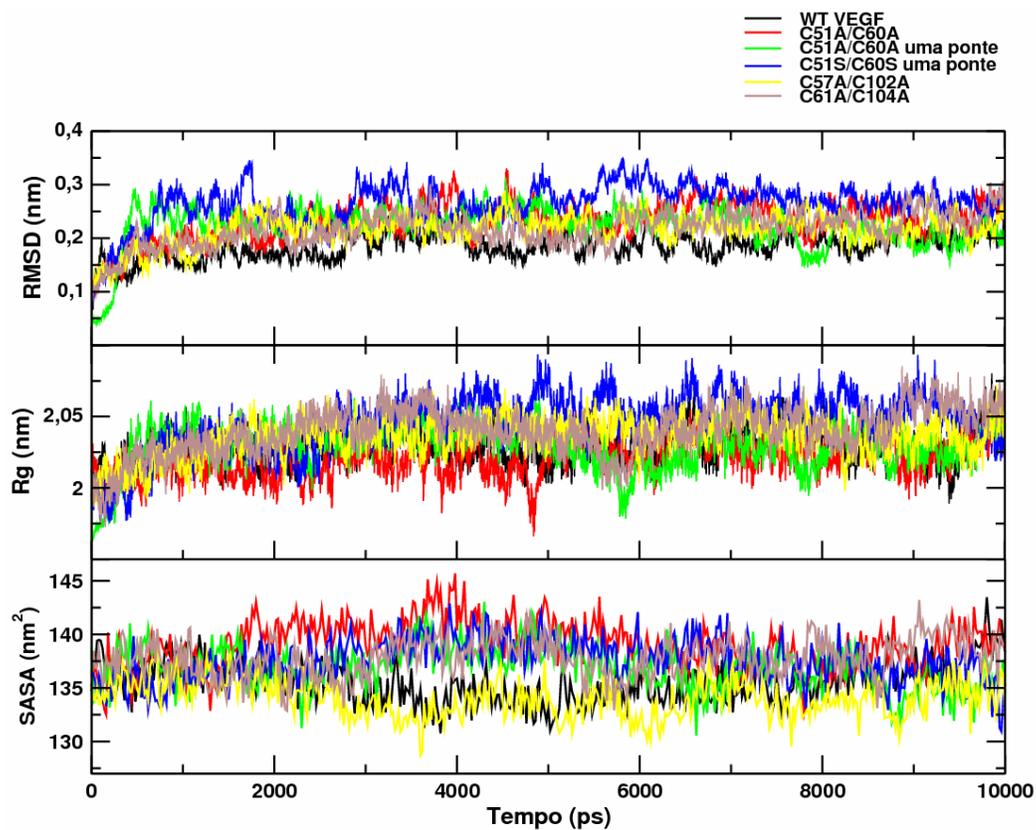


Figura 6.2: (a) RMSD dos átomos de $C\alpha$, (b) raio de giro, (c) área superficial acessível ao solvente (SASA) dos sistemas cujo ponto de partida foi a estrutura do VEGF modificada. A legenda no canto superior direito relaciona as cores aos sistemas.

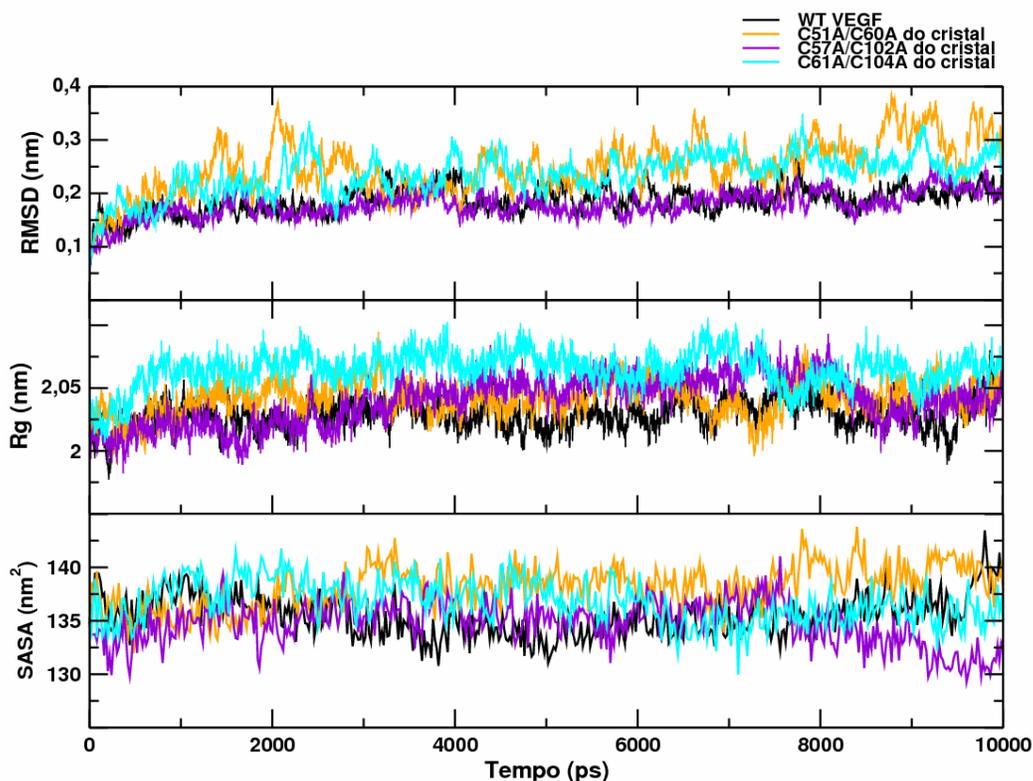


Figura 6.3: (a) RMSD dos átomos de $C\alpha$, (b) raio de giro, (c) área superficial acessível ao solvente (SASA) dos sistemas cujo ponto de partida foram estruturas cristalográficas. A legenda no canto superior direito relaciona as cores aos sistemas.

6.4.2 - Análise Estrutural

A Figura 6.4 mostra as sobreposições de estruturas médias obtidas da simulação com estruturas cristalográficas. A Tabela 6.1 mostra valores médios de RMSD entre estruturas obtidas da simulação e estruturas cristalográficas. A estrutura média do mutante C51A/C60A (em azul na Figura 6.4a) assemelha-se mais à estrutura cristalográfica deste mutante (em vermelho, código PDB: 1MJV), RMSD de $\sim 0,147$ nm, do que com a estrutura cristalográfica do VEGF (código PDB: 2VPF), RMSD de

~0,211 nm. Isso indica que, mesmo partindo da estrutura inicial do VEGF, a simulação convergiu corretamente para a estrutura do mutante.

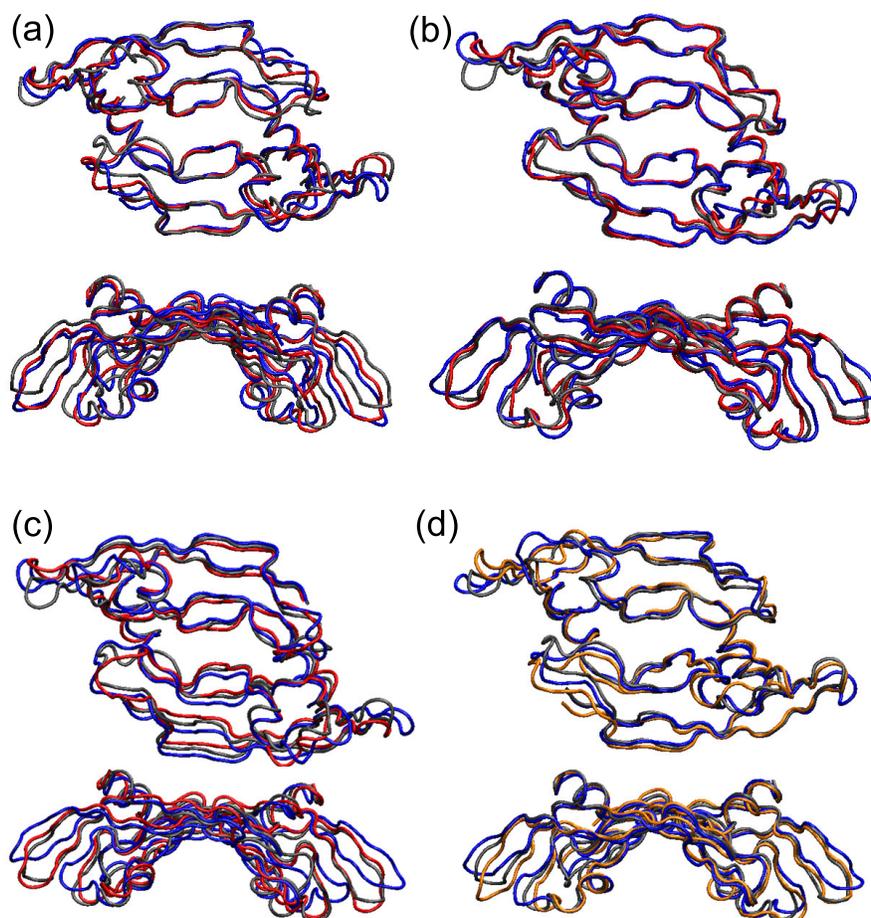


Figura 6.4: Sobreposição de estruturas médias de dinâmica molecular e estruturas cristalográficas. (a) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C51A/C60A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C51A/C60A em vermelho. (b) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C57A/C102A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C57A/C102A em vermelho. (c) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C61A/C104A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C61A/C104A em vermelho. (d) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C51A/C60A* em azul, e estrutura média do mutante C51S/C60S* em amarelo.

A estrutura média do mutante C57A/C102A (em azul, Figura 6.4b) assemelha-se muito às estruturas do VEGF e do cristal desse mutante, e tem o mesmo valor de RMSD, ~0,149 nm. Este resultado já era esperado, visto que o valor de RMSD entre as estruturas experimentais cristalográficas do VEGF e desse mutante é 0,119 nm. Em outras palavras, a mutação dos resíduos Cys57 e Cys102 para alanina não afeta significativamente a estrutura.

Tabela 6-1: Valores médios (em nm) de RMSD entre estruturas obtidas das simulações de dinâmica molecular e estruturas cristalográficas.

	VEGF ^a	C51A/C60A ^b	C57A/C102A ^c	C61A/C104A ^d
C51A/C60A	0,211 ± 0,023	0,147 ± 0,014	0,213 ± 0,019	0,286 ± 0,023
C57A/C102A	0,149 ± 0,020	0,189 ± 0,035	0,149 ± 0,015	0,254 ± 0,023
C61A/C104A	0,171 ± 0,023	0,242 ± 0,033	0,177 ± 0,024	0,261 ± 0,035
C51A/C60A*	0,155 ± 0,022	0,196 ± 0,035	0,177 ± 0,018	0,263 ± 0,026
C51S/C60S*	0,194 ± 0,019	0,201 ± 0,024	0,195 ± 0,017	0,287 ± 0,031
C51A/C60A [§]	0,207 ± 0,025	0,208 ± 0,041	0,222 ± 0,025	0,264 ± 0,018
C57A/C102A [§]	0,147 ± 0,018	0,192 ± 0,027	0,146 ± 0,014	0,233 ± 0,026
C61A/C104A [§]	0,244 ± 0,022	0,259 ± 0,039	0,247 ± 0,020	0,211 ± 0,023

códigos PDB: 2VPF^a, 1MJV^b, 1MKG^c, 1MKK^d.

* Estruturas que apresentam apenas uma ligação dissulfeto entre os monômeros.

[§] Estruturas que tiveram como ponto de partida as estruturas cristalográficas.

A estrutura média do mutante C61A/C104A (em azul, Figura 6.4c) assemelha-se mais à estrutura do VEGF do que à estrutura do cristal desse mutante. Os valores de RMSD são ~0,171 e ~0,261 nm em relação ao VEGF e ao cristal do mutante, respectivamente. Isso indica que, nesse tempo de simulação, a estrutura não converge para a estrutura esperada.

As estruturas dos mutantes que possuem apenas uma ligação dissulfeto entre os monômeros, C51A/C60A* e C51S/C60S*, permanecem mais semelhantes ao VEGF do que ao cristal do mutante C51A/C60A (ver Tabela 6-1 e Figura 6.4d). Isto indica que a ausência de uma ligação dissulfeto não altera de forma significativa a estrutura do VEGF e, possivelmente, explica porque heterodímeros com uma ligação dissulfeto entre monômeros são capazes de ativar os receptores de VEGF e promover angiogênese (PÖTGENS, 1994).

Para verificar se as simulações foram eficientes na obtenção de estruturas médias razoáveis para as proteínas mutantes, outras simulações foram realizadas a partir das estruturas cristalográficas desses mutantes. Para isso, os sistemas C51A/C60A[§], C57A/C102A[§] e C61A/C104A[§] foram construídos conforme descrito na Seção 6.3.1. A principal questão é compreender se os desvios observados para as simulações que não convergiram para a estrutura do cristal, principalmente C61A/C104A, são devidos a problemas da simulação (isto é, tempo de simulação insuficiente, problemas relacionados ao campo de força, etc.) ou se as estruturas de alguns cristais não correspondem às suas estruturas em solução.

Para o mutante C51A/C60A[§], o valor de RMSD, ~0,208 nm em relação a sua estrutura cristalográfica, é maior do que o valor ~0,147 nm obtido para a simulação que teve como ponto de partida o VEGF. Isto indica que a simulação foi capaz de reproduzir a estrutura experimental.

Para o mutante C57A/C102A[§], o RMSD em relação à estrutura cristalográfica das simulações partindo do VEGF, ~0,189 nm, e da estrutura cristalográfica, ~0,192, é muito semelhante. Isto indica que a simulação foi capaz de reproduzir a estrutura experimental deste mutante.

No caso do mutante C61A/C104A[§], valores elevados de RMSD são observados para a simulação partindo do VEGF, ~0,261 nm, e para a simulação partindo do cristal, ~0,211 nm. Esses resultados indicam que a estrutura deste mutante em solução tem, possivelmente, diferenças significativas em relação a sua estrutura cristalográfica. O valor muito elevado de RMSD (~0,261 nm) da simulação partindo do VEGF indica que a simulação não foi capaz de reproduzir a estrutura experimental, mas este resultado pode ser explicado. A estrutura cristalográfica deste mutante mostra que, na interface entre os monômeros, quatro resíduos sofrem mudanças conformacionais drásticas em suas cadeias laterais (MULLER, 2002). Estes resíduos são His27, Glu30, Ile29 e Leu32. As reorientações das cadeias laterais desses resíduos, na melhor das hipóteses, ocorreriam na escala de tempo de ps a ns, mas como estes resíduos estão na interface e impedidos espacialmente, tempos muito maiores são esperados que não seriam observáveis na escala de tempo da simulação.

6.4.3 - Ligações de hidrogênio

A Figura 6.5 mostra a evolução temporal do número de ligações de hidrogênio para cada sistema, calculado utilizando o módulo “g_hbond” do pacote GROMACS (LINDAHL, 2001). A Tabela 6.2 mostra os números médios e os desvios padrão de ligações de hidrogênio obtidos de 2500 configurações sobre os últimos 5 ns das trajetórias. Como na Seção 5.4.2, os números foram obtidos pela definição de dois grupos e pelo cálculo da existência ou não da ligação de hidrogênio, segundo o seguinte critério: (i) distância de corte entre os átomos doador e receptor de 3,5 Å; e (ii) ângulo de corte receptor-doador-hidrogênio de 30°. Os pares de grupos analisados foram: (i)

proteína/proteína; (ii) cadeia-principal/cadeia-principal; (iii) cadeia-lateral/cadeia-lateral; (iv) cadeia-1/cadeia-2 (entre cadeias); (v) cadeia-1/cadeia-1; e (vi) cadeia-2/cadeia-2.

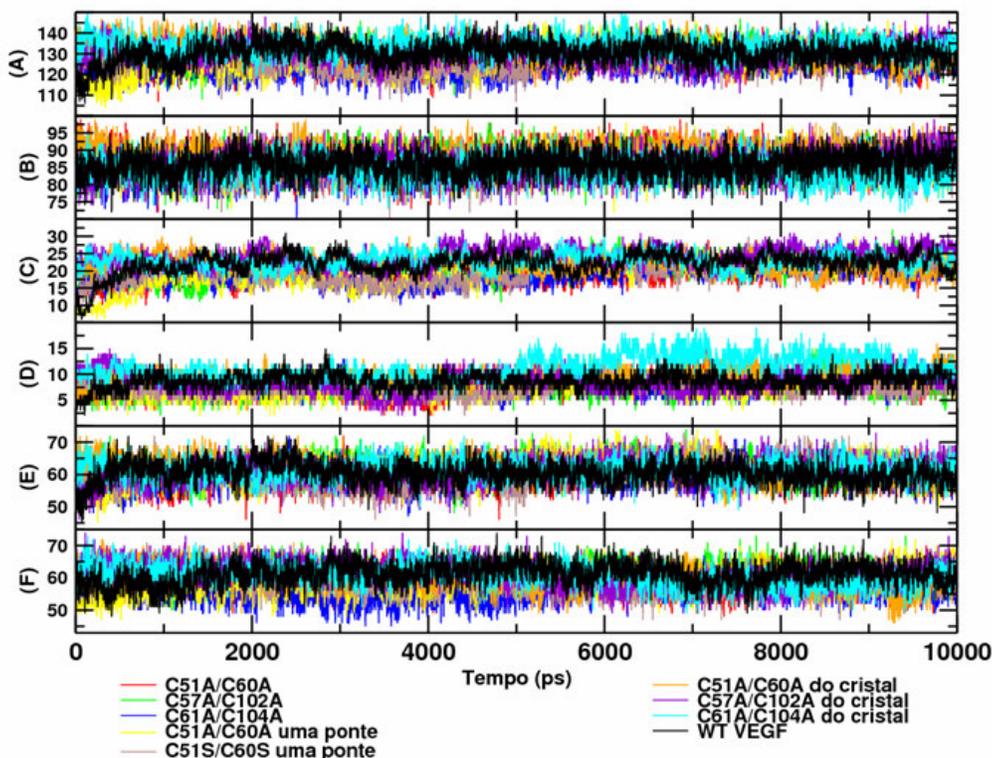


Figura 6.5: Evolução temporal do número de ligações de hidrogênio para cada sistema. (a) proteína/proteína; (b) cadeia-principal/cadeia-principal; (c) cadeia-lateral/cadeia-lateral; (d) cadeia-1/cadeia-2 (entre cadeias); (e) cadeia-1/cadeia-1; e (f) cadeia-2/cadeia-2.

O número de ligações de hidrogênio proteína-proteína variou de um valor mínimo de 126,0 para o C61A_C104A a um valor máximo de 133,7 para o C61A_C104A[§]. Este resultado mostra que as diferentes estruturas iniciais da dinâmica molecular (isto é, uma proveniente do VEGF e uma do cristal do mutante) para o mesmo mutante levam aos resultados mais discrepantes. Uma possível interpretação deste resultado é a

necessidade de reorganização das cadeias laterais localizadas na interface da estrutura proveniente do VEGF. Isto é reforçado quando se nota que as ligações de hidrogênio entre cadeias (cadeia-1/cadeia-2), que para a simulação C61A_C104A tem valor médio de 8,0 e para a simulação C61A_C104A[§] tem valor médio de 12,8, são bem diferentes entre os dois sistemas. É possível que, com um tempo de simulação mais longo, C61A_C104A se aproxime de C61A_C104A[§].

Tabela 6-2: Número médio e desvio padrão de ligações de hidrogênio.

	Proteína / Proteína	Cad. Principal / Cad. Principal	Cad. Lateral / Cad. Lateral	Cadeia-1 / Cadeia-2	Cadeia-1 / Cadeia-1	Cadeia-2 / Cadeia-2
WT VEGF	131 ± 4,8	86,1 ± 3,6	22,8 ± 2,3	8,8 ± 1,5	60,4 ± 3,3	61,7 ± 3,4
C51A_C60A	129,2 ± 4,8	87,8 ± 3,5	19,4 ± 2,2	9,2 ± 1,7	60,8 ± 3,2	59,1 ± 3,3
C57A_C102A	130,9 ± 4,7	86,4 ± 3,3	22,7 ± 2,3	7,3 ± 1,8	62,2 ± 3,4	61,3 ± 3,3
C61A_C104A	126,0 ± 4,5	86,6 ± 3,4	20,1 ± 2,3	8,0 ± 1,5	60,6 ± 3,1	57,4 ± 3,1
C51A_C60A*	131,4 ± 4,7	87,3 ± 3,4	22,1 ± 2,1	8,2 ± 1,6	62,6 ± 3,6	60,7 ± 3,4
C51S_C60S*	128,6 ± 4,7	86,7 ± 3,5	21,7 ± 2,4	8,0 ± 1,5	62,5 ± 3,4	58,1 ± 3,2
C51A_C60A [§]	129,8 ± 4,9	88,6 ± 3,3	21,0 ± 2,5	9,9 ± 1,5	60,8 ± 3,2	59,1 ± 3,4
C57A_C102A [§]	130,2 ± 5,3	86,2 ± 3,6	25,1 ± 2,4	8,7 ± 1,7	62,0 ± 3,3	60,0 ± 3,4
C61A_C104A [§]	133,7 ± 4,6	84,4 ± 3,5	23,1 ± 2,3	12,8 ± 1,9	61,5 ± 3,1	59,5 ± 3,3

* Estruturas que apresentam apenas uma ligação dissulfeto entre os monômeros.

[§] Estruturas que tiveram como ponto de partida as estruturas cristalográficas.

A comparação dos sistemas C51A_C60A com C51A_C60A[§] e C57A_C102A com C57A_C102A[§] permite afirmar que as simulações que partiram do VEGF convergem de forma bem razoável para as simulações que partiram da estrutura dos respectivos cristais.

As estruturas com uma ponte, C51A_C60A* e C51S_C60S*, possuem valores próximos dos valores calculados para o WT VEGF. Isto indica que a mutação de uma única ponte não afeta drasticamente o perfil de ligações de hidrogênio.

6.4.4 - Flutuações atômicas

Como na Seção 5.4.6, os fatores-B dos átomos de C α foram calculados sobre 40 blocos de 250 ps com intervalos de tempo de 2 ps. Em cada bloco, foi efetuada a média dos fatores-B. A média dos fatores-B entre os monômeros foi também obtida. A Figura 6.6 mostra a evolução temporal dos fatores-B para as simulações de C51A/C60A, C57A/C102A e C61A/C104A e a Figura 6.7, para as simulações C51A/C60A[§], C57A/C102A[§] e C61A/C104A[§] (simulações de estruturas provenientes do cristal de cada mutante). É possível notar em todos os mapas que os valores de fator-B convergem razoavelmente. Gráficos de RMSD foram colocados abaixo de cada gráfico de fator-B para dar uma idéia do período de tempo em que cada bloco foi coletado. O painel inferior mostra a média dos fatores-B sobre os 40 blocos em comparação com a média calculada para o WT VEGF. A região compreendida entre os resíduos 60 e 70 (região que contém a alça-2) é a mais afetada pelas mutações, que aumentam a flexibilidade dessa região. A Seção 5.4.6 mostrou que a complexação com o receptor ou um inibidor aumenta a flexibilidade da alça-2, o que sugere que as mutações podem afetar as constantes de ligação pelo efeito dinâmico de alterar as flutuações atômicas dessa região da proteína.

A comparação entre as Figuras 6.6 e 6.7 permite observar as diferenças causadas pelas estruturas iniciais nas flutuações atômicas. As simulações que partiram da

estrutura modificada do VEGF (Figura 6.6) apresentam valores menores de fator-B do que as simulações que partiram das estruturas dos cristais (Figura 6.7).

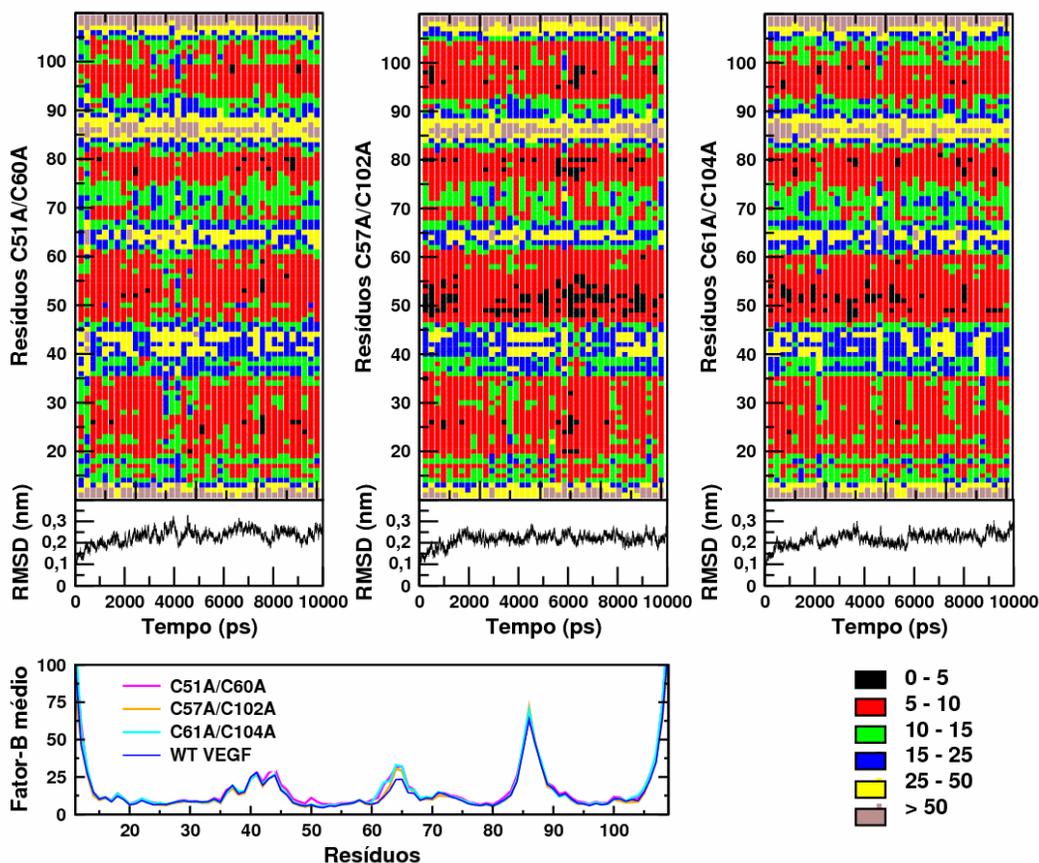


Figura 6.6: Os três painéis na parte superior da figura mostram a evolução temporal dos fatores-B coletados de janelas consecutivas de 250 ps. O painel da esquerda refere-se ao C51A/C60A, o do meio ao C57A/C102A e o da direita ao C61A/C104A. Os valores referem-se à média entre as duas cadeias. As intensidades dos fatores-B são dadas pela legenda no canto inferior direito. Abaixo de cada painel está um gráfico de RMSD calculado sobre os átomos de $C\alpha$. O RMSD médio de todos os 40 blocos aparece no painel inferior esquerdo.

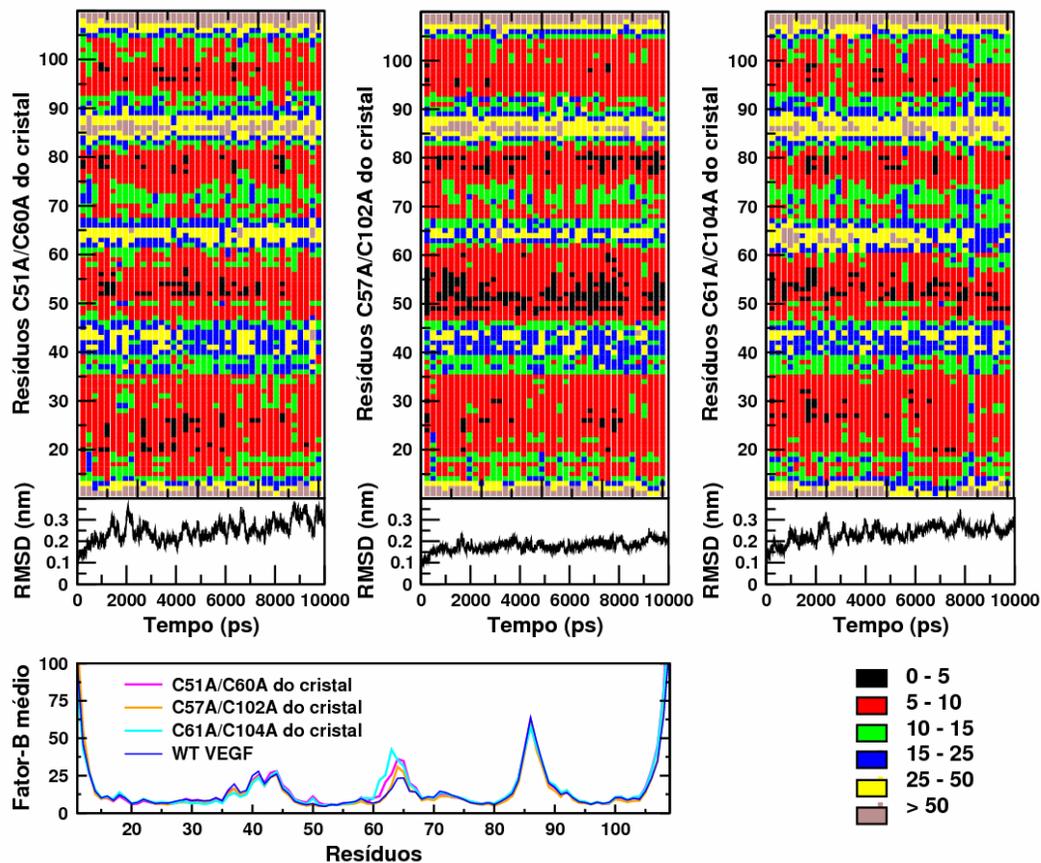


Figura 6.7: Os três painéis na parte superior da figura mostram a evolução temporal dos fatores-B coletados de janelas consecutivas de 250 ps. O painel da esquerda refere-se ao C51A/C60A[§], o do meio ao C57A/C102A[§] e o da direita ao C61A/C104A[§]. Os valores referem-se à média entre as duas cadeias. As intensidades dos fatores-B são dadas pela legenda no canto inferior direito. Abaixo de cada painel está um gráfico de RMSD calculado sobre os átomos de C α . O RMSD médio de todos os 40 blocos aparece no painel inferior esquerdo.

6.4.5 - Análise de componentes principais

Como nos Capítulos 4 e 5, a análise de componentes principais foi realizada. A raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP: *root mean square inner products*) (equação 33) foi calculada entre intervalos crescentes da primeira metade da análise (de 5000 ps até 7500 ps) com a segunda metade (de 7500 ps até 10000 ps) envolvendo o subespaço composto pelos primeiros 10 autovetores.

A Figura 6.8 mostra os gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo para as simulações dos mutantes construídos a partir da estrutura do VEGF. Observa-se em todos os gráficos a convergência dos autovetores para um RMSIP de $\sim 0,5$ (linhas pretas). Observa-se, também, que existe alta sobreposição dos autovetores dos mutantes com os autovetores do VEGF nativo (linhas vermelhas e verdes). Em princípio, isto indica que o comportamento dinâmico dos mutantes é semelhante ao do VEGF nativo. Em outras palavras, apesar de existirem diferenças estruturais e diferenças nas flutuações atômicas dos mutantes com o VEGF (Seções 6.4.4 e 6.4.3), a natureza dos autovetores se mantém. Entretanto, a Figura 6.9, que mostra gráficos de RMSIP para as simulações dos mutantes construídos a partir das estruturas cristalográficas, descreve um comportamento bem diferente. Para esses sistemas, a convergência dos autovetores é observada para valores de RMSIP de $\sim 0,5$ (linhas pretas), mas a sobreposição com os autovetores do VEGF nativo (linhas vermelhas e verdes) é negligenciável (valores próximos a 0,1). Em outras palavras, no caso das simulações feitas a partir de estruturas cristalográficas, o comportamento dinâmico é bem diferente do VEGF nativo. Este importante resultado mostra que existe alta dependência das correlações nas flutuações

atômicas com a estrutura inicial e que, tempos de simulação mais longos devem diminuir a discrepância entre os resultados.

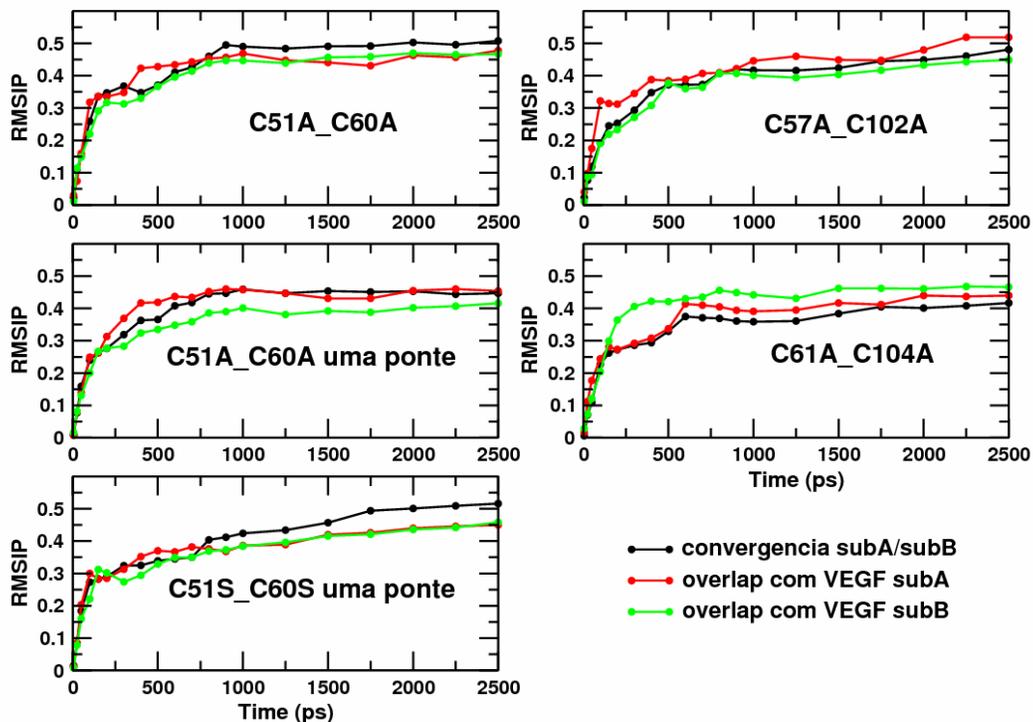


Figura 6.8: Gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo para as simulações dos mutantes construídos a partir da estrutura do VEGF. As linhas pretas correspondem à sobreposição entre autovetores do mesmo sistema, mas diferentes subpartes de 2500 ps. As linhas vermelhas e verdes correspondem à sobreposição dos autovetores dos mutantes com o WT VEGF.

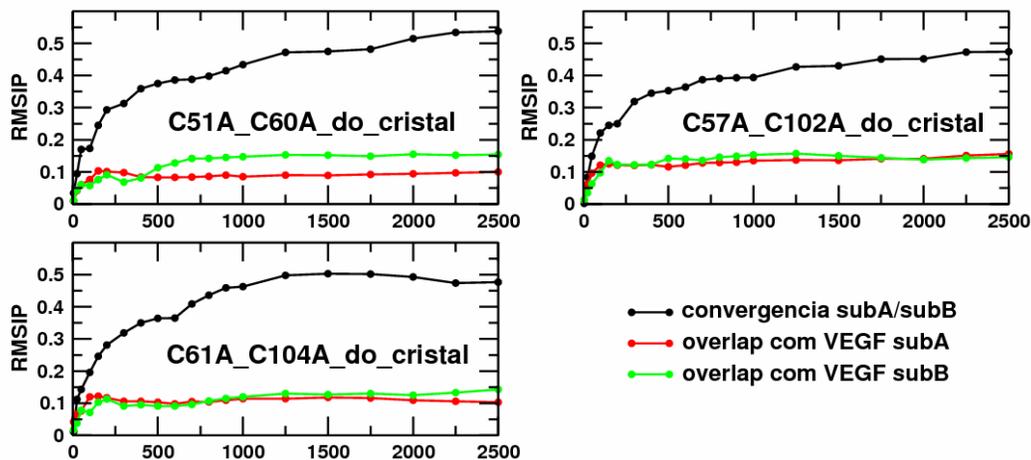


Figura 6.9: Gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo para as simulações dos mutantes construídos a partir das suas estruturas cristalográficas correspondentes. As linhas pretas correspondem à sobreposição entre autovetores do mesmo sistema, mas diferentes subpartes de 2500 ps. As linhas vermelhas e verdes correspondem à sobreposição dos autovetores dos mutantes com o WT VEGF.

6.5 – Conclusões

É possível refinar a estrutura de alguns mutantes em um tempo acessível (10 ns) de simulação. Flutuações atômicas também se mostraram razoavelmente refinadas. Entretanto, tempos de simulação maiores devem ser empregados para que os modos de movimento converjam satisfatoriamente. Considerando que, no trabalho de refinamento estrutural por dinâmica molecular de Mark e colaboradores (MARK, 2004), sistemas muito menores e simulações muito mais longas foram utilizadas, obtivemos, neste capítulo, razoável sucesso.

A ausência das ligações dissulfeto não acarreta mudança estrutural muito significativa do VEGF, mas perturba a estrutura dos pólos do VEGF, responsáveis pela ligação ao receptor.

Sob o aspecto dinâmico, as flutuações da alça-2 aumentam consideravelmente frente às mutações. Essa modificação pode estar relacionada com a atividade dessas proteínas, visto que, o efeito da complexação com o receptor influencia dinamicamente essa região.

7 - Modelagem e dinâmica molecular de complexos VEGF/VEGFR: investigação da seletividade na ativação de receptores de angiogênese

7.1 – Introdução

Como descrito na Seção 1.3 e ilustrado na Figura 1.1, os receptores de VEGF são ativados seletivamente por diferentes fatores de crescimento. A ativação diferencial permite o chaveamento de diversos processos biológicos (ver Seções 1.2 e 1.6). Portanto, entender as bases moleculares da ativação seletiva desses receptores é um passo importante quando se objetiva a modulação racional da angiogênese e de outros processos que envolvem estes fatores de crescimento.

O conhecimento das estruturas tridimensionais dos complexos VEGF/VEGFR é necessário para entender a natureza das interações entre essas proteínas no nível molecular. As conjecturas acerca do reconhecimento molecular dependem, dentre outros fatores, da natureza das interações formadas na interface dessas proteínas. Entretanto, para os sistemas VEGF/VEGFR, apenas duas estruturas tridimensionais de complexos estão registradas no PDB. Uma corresponde ao complexo VEGFA/Flt-1_{D2} (códigos PDB: 1FLT (WIESMANN, 1997) e 1QTY (STAROVASNIK, 1999)) que foi estudado no Capítulo 5 e, a outra corresponde ao complexo PlGF/Flt-1_{D2} (código PDB: 1RV6 (CHRISTINGER, 2004)).

As estruturas tridimensionais dos domínios-2 e -3 extracelulares (domínios de ligação ao VEGF) do receptor KDR ainda não foram determinadas. Trabalhos de mutagênese mostram que, em sua maior parte, os resíduos do VEGF responsáveis pela

ativação do KDR são diferentes dos responsáveis pela ativação do Flt-1 (KEYT, 1996; LI, 2000). Isso sugere que o modo de ligação entre o VEGF e o KDR seja diferente do modo de ligação entre o VEGF e o Flt-1. Porém, essa análise não é conclusiva.

Os outros fatores de crescimento, VEGFB, VEGFC, VEGFD e VEGFE, ativam determinados receptores, mas também se desconhece as estruturas tridimensionais dos respectivos complexos.

7.2 - Objetivos

Gerar uma estrutura tridimensional para o domínio-2 extracelular do receptor KDR por homologia. Essa estrutura permitirá a comparação com o domínio-2 do receptor Flt-1 e a construção de complexos VEGF/KDR.

Construir os complexos VEGFA/KDR, PlGF/Flt-1, PlGF/KDR, VEGFB/Flt-1 e VEGFB/KDR com o objetivo de investigar porque o VEGFA ativa os dois receptores e porque o PlGF e o VEGFB só ativam o receptor Flt-1.

7.3 - Detalhes computacionais

Neste Capítulo, 11 sistemas moleculares foram estudados: VEGFA livre, VEGFA/Flt-1_{D2}, VEGFA/KDR_{D2}, PlGF livre, PlGF/Flt-1_{D2}, PlGF/KDR_{D2}, VEGFB livre, VEGFB/Flt-1_{D2}, VEGFB/KDR_{D2}, Flt-1_{D2} livre e KDR_{D2} livre. A partir desse ponto, o subscrito _{D2} será omitido, mas subentende-se que todos os receptores estudados contêm somente o domínio-2 extracelular.

Alguns sistemas estudados nesse Capítulo (VEGF livre e VEGF/Flt-1) já foram estudados em Capítulos anteriores e, portanto, as mesmas estruturas e trajetórias foram aqui utilizadas.

7.3.1 - Modelagem do receptor KDR

A seqüência de aminoácidos do KDR (VEGFR-2) humano foi extraída do banco de dados de proteínas *Swiss-Prot* sob o número de acesso P35968. As duas cópias do Flt-1 na estrutura do complexo VEGF/Flt-1 (código PDB: 1FLT (WIESMANN, 1997)) foram utilizadas como molde. A Figura 7.1 mostra o alinhamento das seqüências do KDR e do molde, obtido pelo programa *ClustalW* (HIGGINS, 1994). O grau de identidade na seqüência primária das duas proteínas é de 40 %.

```

          10      20      30      40
VEGFR1  1  GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRE--LVIPCRVTSPNITVTL 38
VEGFR2  1  RSPFIASVSDQHGCVVYITENKNKTVVIPCLGSISMLNVSL 40

          50      60      70      80
VEGFR1 38  -KKFPLD LIPDGKR I I WDSRKGFIISNATYKEIGLLTCE 77
VEGFR2 41  CARYPEKR FV P DGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCE 80

          90
VEGFR1 78  ATVNGHLYK-TNYLTHRQ 94
VEGFR2 81  AKINDESYQSIMYIVVVV 98

```

Figura 7.1: Alinhamento das seqüências primárias dos receptores VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR).

A seqüência do domínio-2 do KDR foi enovelada sobre a seqüência do molde utilizando o programa Modeller (SALI, 1993) e respeitando o alinhamento descrito. A

qualidade das estruturas tridimensionais geradas para o domínio-2 do KDR foi aferida pelos programas *ProCheck* (LASKOWSKI, 1993), *Profile-3D* (LUTHY, 1992) e *Prove* (PONTIUS, 1996). A melhor estrutura de um conjunto de 50 foi escolhida.

7.3.2 - Modelagem dos complexos

Os modelos dos complexos VEGFA/KDR, PIGF/KDR, VEGFB/Flt-1 e VEGFB/KDR foram gerados por sobreposição das estruturas das proteínas não complexadas nos complexos de estruturas conhecidas VEGFA/Flt-1 (código PDB: 1FLT) ou PIGF/Flt-1 (código PDB: 1RV6), que serviram de molde (ver Tabela 7.1).

Tabela 7-1: Estruturas iniciais dos complexos estudados nesse Capítulo.

Complexo	Origem do Fator	Origem do Receptor	Complexo molde	Resíduos do Fator/monômero	Resíduos do receptor/cópia
VEGFA/Flt-1	1FLT	1FLT	-	11-109	132-226
VEGFB/Flt-1	2C7W	1FLT	1FLT	13-107	132-226
PIGF/Flt-1	1RV6	1RV6	-	22-116	132-223
VEGFA/KDR	1FLT	modelo*	1FLT	11-109	132-230
VEGFB/KDR	2C7W	modelo*	1FLT	13-107	132-230
PIGF/KDR	1RV6	modelo*	1RV6	22-116	132-230

* Modelo construído de acordo com a Seção 7.3.1.

7.3.3 - Estruturas iniciais das proteínas livres

Além dos complexos, as proteínas livres VEGFA, VEGFB, PIGF, Flt-1 e KDR foram estudadas neste capítulo. As análises do VEGFA livre utilizaram a trajetória gerada no Capítulo 4. As estruturas iniciais usadas para o VEGFB, PIGF e Flt-1 foram extraídas dos arquivos PDB de códigos 2C7W, 1RV6 e 1FLT, respectivamente. A estrutura inicial do KDR foi descrita na Seção 7.3.1.

7.3.4 - Dinâmica molecular

Exceto pelos sistemas VEGFA livre e VEGFA/Flt-1, já descritos, cujos resultados das simulações encontram-se em Capítulos anteriores, as trajetórias dos outros 9 sistemas foram geradas por simulações de dinâmica molecular. A metodologia empregada nas simulações está descrita nas Seções 4.3.2 e 5.3.2. As simulações dos receptores Flt-1 e KDR duraram 20 ns, ao passo que as demais simulações duraram 10 ns.

7.3.5 - Análise de área superficial acessível ao solvente

A área superficial acessível ao solvente (SASA) por resíduo foi calculada pelo programa *NACCESS* (HUBBARD, 1993). Um *script* em linguagem PERL foi desenvolvido para operar em conjunto com este programa. O *script* executa o programa *NACCESS* sobre numa trajetória PDB, captura os valores de SASA por resíduo, armazena em um *array* e calcula as médias e os desvios padrão. O *script* interpreta se a

proteína é um dímero ou um monômero e realiza médias por cadeia, além de calcular os valores de SASA, total, polar e apolar.

7.4 - Resultados e discussão

7.4.1 - Modelo do KDR e validação

A estrutura tridimensional do domínio-2 do receptor KDR foi obtida por modelagem comparativa utilizando como molde o domínio-2 do receptor Flt-1. O programa *Procheck* (LASKOWSKI, 1993) foi utilizado para avaliar a qualidade da cadeia principal do modelo antes e depois da simulação (Figura 7.2).

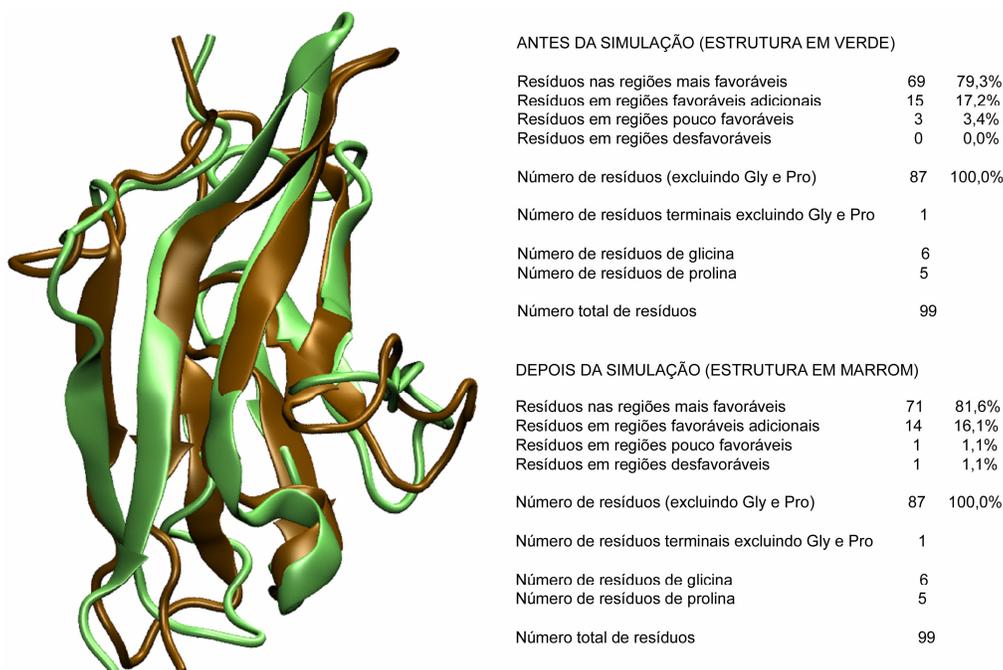


Figura 7.2: Estrutura do domínio-2 do receptor KDR obtida por homologia antes (em verde) e depois (em marrom) da dinâmica molecular.

Depois de 20 ns de simulação, 81,6% dos resíduos ocuparam as regiões mais favoráveis do gráfico de Ramachandran e 16,1% regiões favoráveis adicionais, totalizando 97,7% em regiões favoráveis. A estrutura final (em marrom na Figura 7.2) se diferencia da estrutura inicial principalmente em regiões de alças.

A função de qualidade de volume protéico, obtida pelo programa *Prove* (PONTIUS, 1996), indicou que o modelo está inserido na faixa que compreende cristais de alta resolução.

A estrutura final foi também avaliada pelo programa *Profile-3D* (LUTHY, 1992) que forneceu um valor de 32,57, contra 26,66 do molde, para a função de auto-compatibilidade. Todos os parâmetros avaliados indicam a alta qualidade da estrutura obtida.

7.4.2 – *Análise geral dos complexos*

Seis complexos foram analisados no presente Capítulo. Dois deles, VEGF/Flt-1 e PIGF/Flt-1, já possuíam estruturas tridimensionais conhecidas (códigos PDB: 1FLT e 1RV6, respectivamente). As outras quatro estruturas foram geradas por sobreposição nas estruturas conhecidas (ver Seção 7.3.2).

As estruturas geradas para os complexos VEGF/KDR, VEGFB/Flt-1, VEGFB/KDR e PIGF/KDR não apresentaram sobreposição de átomos e, após minimização de energia, nenhum contato de alta energia foi observado. Este procedimento já havia sido utilizado por Iyer e colaboradores (IYER, 2001) que utilizaram sobreposição estrutural para a geração do complexo PIGF/Flt-1 antes da determinação da estrutura do complexo.

Um dos requisitos básicos para o reconhecimento molecular entre proteínas (isto é, para que duas ou mais proteínas se liguem com a afinidade necessária) é a complementaridade entre suas superfícies ou formas (do inglês: *shape complementarity*) (STITES, 1997). Todos os complexos gerados mostram um bom encaixe entre as formas protéicas. Isto indica que, o fato dos fatores VEGFB e PlGF não ativarem o receptor KDR não está relacionado com a falta de complementaridade entre suas formas.

O complexo VEGF/KDR também mostra excelente complementaridade. Isto indica que, ao contrário do que foi proposto por Keyt e colaboradores (KEYT, 1996), o VEGF deve se complexar com o KDR numa orientação muito semelhante com a que se complexa com o Flt-1 (Figura 7.3). A diferença entre a afinidade pelos dois receptores e a diferença entre os resíduos que participam das interações são, provavelmente, conseqüências de interações específicas. Seria estranho observar duas proteínas com alto grau de homologia complexarem de forma diferente com receptores que também têm alto grau de homologia.

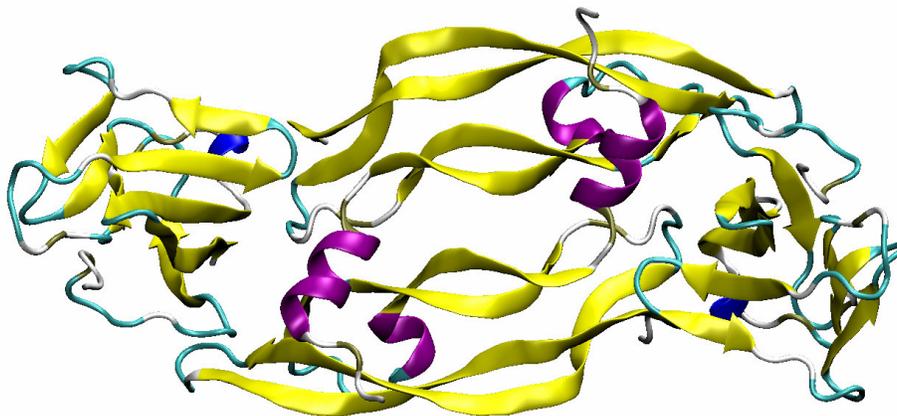


Figura 7.3: Estrutura cristalográfica do complexo VEGF/Flt-1 mostrando a orientação do VEGF e das duas cópias do receptor Flt-1.

7.4.3 - Estabilidade das simulações

Onze simulações foram analisadas neste Capítulo. A Figura 7.4 mostra a evolução temporal do RMSD relativa às estruturas iniciais de cada simulação. As simulações dos fatores livres VEGF, VEGFB e PIGF (Figura 7.4a) mostraram-se bem estáveis, com valores médios de RMSD de $\sim 0,2$ nm. A Figura 7.4b mostra o RMSD dos receptores Flt-1 e KDR, cujas simulações duraram 20 ns. Nota-se que o receptor Flt-1, que partiu da estrutura cristalográfica (código PDB: 1FLT), teve um RMSD estável e com valor de $\sim 0,1$ nm desde o início da simulação. O receptor KDR, proveniente do modelo gerado por homologia, sofreu consideráveis mudanças estruturais nas regiões de alças e, após 13 ns de simulação, permaneceu estável com valor de RMSD de $\sim 0,3$ nm. A Figura 7.4c mostra o RMSD dos complexos. Os complexos VEGF/Flt-1 e PIGF/Flt-1 partiram de estruturas cristalográficas (códigos PDB: 1FLT e 1RV6, respectivamente) e os complexos VEGF/KDR, VEGFB/Flt-1, VEGFB/KDR e PIGF foram gerados por sobreposição das estruturas. Após 5 ns o RMSD de todos os complexos havia convergido. O valor mais alto de RMSD ($\sim 0,4$ nm) foi o do complexo PIGF/KDR e o valor mais baixo do complexo VEGFB/Flt-1 ($\sim 0,2$ nm), ambos gerados por sobreposição.

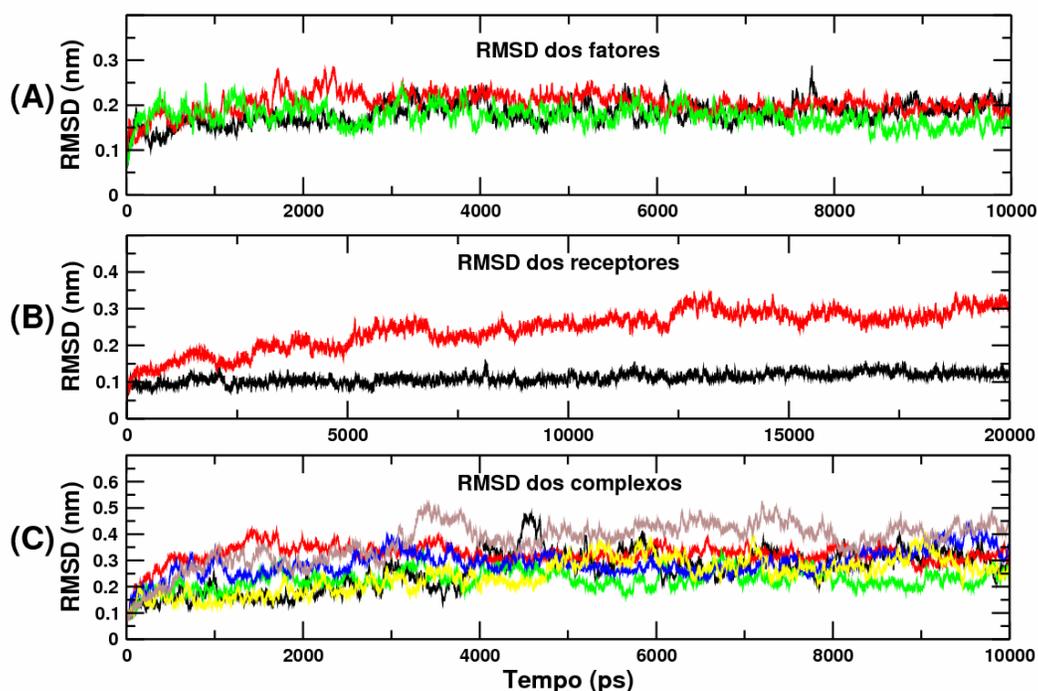


Figura 7.4: Gráficos de RMSD dos fatores livres, receptores livres e dos complexos. (a) VEGF (em preto), VEGFB (em vermelho) e PIGF (em verde). (b) Flt-1 (em preto) e KDR (em vermelho). (c) VEGF/Flt-1 (em preto), VEGF/KDR (em vermelho), VEGFB/Flt-1 (em verde), VEGFB/KDR (em azul), PIGF/Flt-1 (em amarelo) e PIGF/KDR (em marrom).

7.4.4 - Análise visual das interações iônicas

As interações polares podem ocorrer entre resíduos neutros, resíduos carregados e resíduos neutros, ou entre dois ou mais resíduos carregados. Estas interações desempenham um papel importante no reconhecimento entre proteínas. As interações iônicas (usualmente conhecidas por pontes salinas) ocorrem entre aminoácidos de cargas opostas e são as interações mais fortes.

Do ponto de vista termodinâmico, os contatos hidrofóbicos contribuem de forma mais significativa para a formação de um complexo de proteínas em água. Isto ocorre porque a água, que é um solvente prótico de alta constante dielétrica, solvata melhor os resíduos polares, favorecendo o colapso das espécies hidrofóbicas. No entanto, na formação de um complexo protéico, os resíduos na interface proteína-proteína, necessariamente, passam por um processo de dessolvatação que envolve um custo energético (ELCOCK, 2001). O custo associado a este processo é a energia livre de dessolvatação que tem o mesmo valor da energia livre de solvatação, porém, sinais opostos. Portanto, resíduos polares estão associados a um alto custo de dessolvatação e, no caso de resíduos carregados, este custo é ainda maior. Para que um complexo protéico seja formado, as interações entre resíduos da interface devem superar o custo de dessolvatação. A interação entre superfícies hidrofóbicas favorece a formação do complexo (visto que a água solvata muito fracamente estas superfícies). Por motivos óbvios, a interação entre uma superfície hidrofóbica e um resíduo polar desfavorece a formação do complexo. As interações entre resíduos polares podem favorecer ou desfavorecer a formação do complexo. Se os átomos com cargas parciais positivas possuem orientação que permita a interação com átomos com cargas parciais negativas, ou seja, interações complementares, haverá um favorecimento da formação do complexo. Caso contrário, não. Uma interação que é, na maior parte das vezes, proibitiva para a formação do complexo, é a interação entre resíduos de mesma carga, visto que, para aproximar estes resíduos um alto custo de dessolvatação está associado e a interação formada é repulsiva. Porém, a formação de interações iônicas entre resíduos de cargas opostas é favorecida quando a energia da interação formada supera a energia de dessolvatação.

Se todos os resíduos fossem hidrofóbicos, o colapso sempre seria favorecido em água e não existiria seletividade. Felizmente, as proteínas só reconhecem proteínas muito complementares e esta seleção fina da natureza é regida, principalmente, pela complementaridade de cargas e superfícies.

A Figura 7.5 mostra as interfaces dos complexos. Os resíduos carregados estão mostrados em representação de haste e esfera, e a estrutura secundária em fita. Na natureza, observa-se a formação dos complexos VEGF/Flt-1, VEGF/KDR, VEGFB/Flt-1 e PIGF/Flt-1. Os complexos VEGFB/KDR e PIGF/KDR não são formados. Na parte superior da Figura 7.5, complexos que envolvem o receptor Flt-1, observa-se que todos os complexos formam interações específicas entre resíduos de cargas opostas. Nos complexos mostrados na parte inferior, que envolvem o receptor KDR, interações complementares estão presentes no complexo VEGF/KDR, mas ausentes nos complexos VEGFB/KDR e PIGF/KDR. Este resultado contribui para o entendimento da ativação seletiva dos receptores de VEGF e mostra a coerência dos modelos construídos neste trabalho.

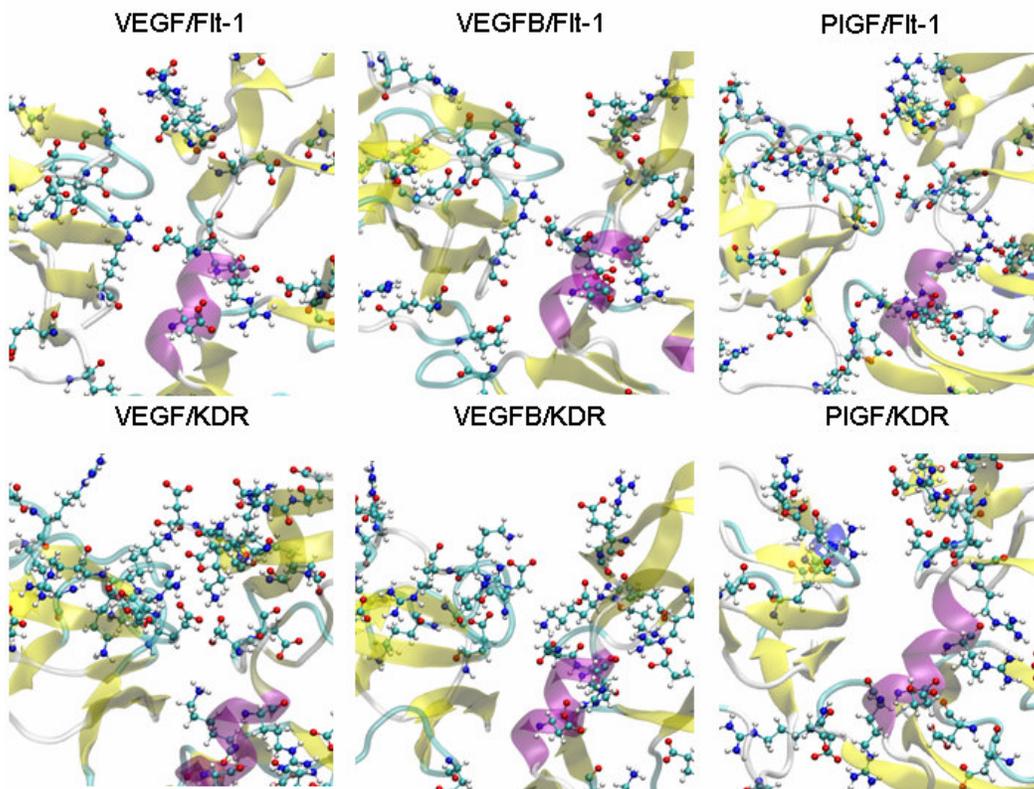


Figura 7.5: Interfaces fator/receptor. Em cada quadro o receptor está mostrado à esquerda e o fator à direita. Os resíduos carregados aparecem na representação de esfera e bastão.

7.4.5 - Análise de ligações de hidrogênio

As ligações de hidrogênio com o solvente foram analisadas para estimar a diferença de energia de dessolvatação na formação dos complexos. Para isso, consideramos que a diferença de energia livre de dessolvatação é proporcional à variação do número de ligações de hidrogênio sob a formação do complexo, dado por:

$$\Delta_{LH} = \text{número de ligações de hidrogênio do complexo com o solvente} - \text{número de ligações de hidrogênio do fator com o solvente} - 2 \text{ vezes o número de ligações de}$$

hidrogênio do receptor com o solvente (pois cada fator complexa-se com duas cópias do receptor). A Tabela 7.2 contém o número de ligações de hidrogênio que cada espécie faz com o solvente. A variação do número de ligações de hidrogênio sob a formação do complexo está na Tabela 7.3.

Tabela 7-2: Número de ligações de hidrogênio que cada sistema faz com o solvente.

Sistema	Número de ligações de hidrogênio com o solvente
VEGF livre	460 ± 24
VEGFB livre	426 ± 10
PlGF livre	462 ± 9
Flt-1 livre	228 ± 7
KDR livre	233 ± 8
VEGF/Flt-1	915 ± 18
VEGF/KDR	918 ± 15
VEGFB/Flt-1	861 ± 14
VEGFB/KDR	721 ± 40
PlGF/Flt-1	843 ± 14
PlGF/KDR	736 ± 41

Tabela 7-3: Variação do número de ligações de hidrogênio após a formação do complexo.

Sistema	ΔLH (variação do núm. de ligações de H sob a complexação)
VEGF/Flt-1	$915 - 460 - 456 = -1$
VEGF/KDR	$918 - 460 - 466 = -8$
VEGFB/Flt-1	$861 - 426 - 456 = -21$
VEGFB/KDR	$721 - 426 - 466 = -171$
PIGF/Flt-1	$843 - 462 - 456 = -75$
PIGF/KDR	$736 - 462 - 466 = -192$

O complexo VEGF/KDR ($\Delta LH = -8$) é o único complexo com KDR em que a variação do número de ligações de hidrogênio é pequena. Este resultado é esperado, pois na natureza não se observa a formação dos complexos VEGFB/KDR ($\Delta LH = -171$) e PIGF/KDR ($\Delta LH = -192$). Apesar do valor de -75 ligações de hidrogênio para a formação do complexo PIGF/Flt-1, este valor não deve ser proibitivo, visto que este complexo é formado na natureza. Esta análise fornece uma razão termodinâmica para os dados experimentais.

A variação do número de ligações de hidrogênio foi calculada individualmente também para o fator e para o receptor, com o propósito de analisar onde o efeito da dessolvatação é mais pronunciado. A Tabela 7.4 mostra o número de ligações de hidrogênio das espécies individuais (fator ou receptor) no complexo. A Tabela 7.5 mostra a variação do número de ligações de hidrogênio das espécies individuais na formação dos complexos. Dada por: $\Delta LH^* = \text{número de ligações de hidrogênio da espécie no complexo} - \text{número de ligações de hidrogênio da espécie livre}$.

Tabela 7-4: Número de ligações de hidrogênio com o solvente de cada espécie individual no complexo.

Sistema	Número de ligações de hidrogênio com o solvente
VEGF no complexo VEGF/Flt-1	496 ± 12
VEGF no complexo VEGF/KDR	487 ± 11
VEGFB no complexo VEGFB/Flt-1	430 ± 10
VEGFB no complexo VEGFB/KDR	354 ± 20
PIGF no complexo PIGF/Flt-1	448 ± 10
PIGF no complexo PIGF/KDR	378 ± 24
Flt-1 no complexo VEGF/Flt-1	210 ± 6
Flt-1 no complexo VEGFB/Flt-1	215 ± 5
Flt-1 no complexo PIGF/Flt-1	198 ± 5
KDR no complexo VEGF/KDR	216 ± 6
KDR no complexo VEGFB/KDR	184 ± 14
KDR no complexo PIGF/KDR	179 ± 10

Considerando que, cada complexo possui duas cópias do receptor e, portanto, devemos considerar o dobro dos valores para os receptores na Tabela 7.5, o efeito é mais pronunciado na dessolvatação do receptor. Alguns resultados positivos na Tabela 7.5 são curiosos. Eles indicam que, ao se complexar, algumas espécies formam mais ligações de hidrogênio com a água do que quando livres. Este é o caso do VEGF quando se liga aos receptores Flt-1 e KDR e do VEGFB quando se liga ao receptor Flt-1.

Tabela 7-5: Variação do número de ligações de hidrogênio com solvente da espécie individual sob a formação do complexo.

Sistema	ΔLH^* (variação do núm. de ligações de H sob a complexação)
VEGF no complexo VEGF/Flt-1	496 – 460 = 36
VEGF no complexo VEGF/KDR	487 – 460 = 27
VEGFB no complexo VEGFB/Flt-1	430 – 426 = 4
VEGFB no complexo VEGFB/KDR	354 – 426 = – 72
PIGF no complexo PIGF/Flt-1	448 – 462 = – 14
PIGF no complexo PIGF/KDR	378 – 462 = – 84
Flt-1 no complexo VEGF/Flt-1	210 – 228 = – 18
Flt-1 no complexo VEGFB/Flt-1	215 – 228 = – 13
Flt-1 no complexo PIGF/Flt-1	198 – 228 = – 30
KDR no complexo VEGF/KDR	216 – 233 = – 17
KDR no complexo VEGFB/KDR	184 – 233 = – 49
KDR no complexo PIGF/KDR	179 – 233 = – 54

A Tabela 7.6 mostra o número de ligações de hidrogênio entre o fator e o receptor em cada complexo. Os valores mais elevados são encontrados para os complexos VEGF/Flt-1, VEGF/KDR, VEGFB/Flt-1 e PIGF/Flt-1. Como já dito, estes complexos são observados. Os complexos VEGFB/KDR e PIGF/KDR possuem os menores valores. As interfaces dos complexos que se formam naturalmente possuem um número maior de ligações de hidrogênio. Mais um indicativo de que o reconhecimento molecular se dá pela complementaridade das interações polares.

Tabela 7-6: Número de ligações de hidrogênio entre o fator e o receptor em cada complexo.

Sistema	Número de ligações de hidrogênio Fator/Receptor
VEGF ↔ Flt-1	10 ± 1
VEGF ↔ KDR	10 ± 2
VEGFB ↔ Flt-1	8 ± 1
VEGFB ↔ KDR	5 ± 2
PlGF ↔ Flt-1	8 ± 2
PlGF ↔ KDR	6 ± 1

7.4.6 - Análise de superfícies moleculares

A área superficial acessível ao solvente (SASA) por resíduo foi calculada para todos os sistemas. Os resultados estão dispostos nas Figuras 7.6 a 7.10. Nas três primeiras figuras, estão dispostas as áreas por resíduo dos fatores VEGF (Figura 7.6), VEGFB (Figura 7.7) e PlGF (Figura 7.8), livres e complexados. As áreas por resíduo dos receptores Flt-1 (Figura 7.9) e KDR (Figura 7.10), livres e complexados estão dispostas nas duas últimas figuras.

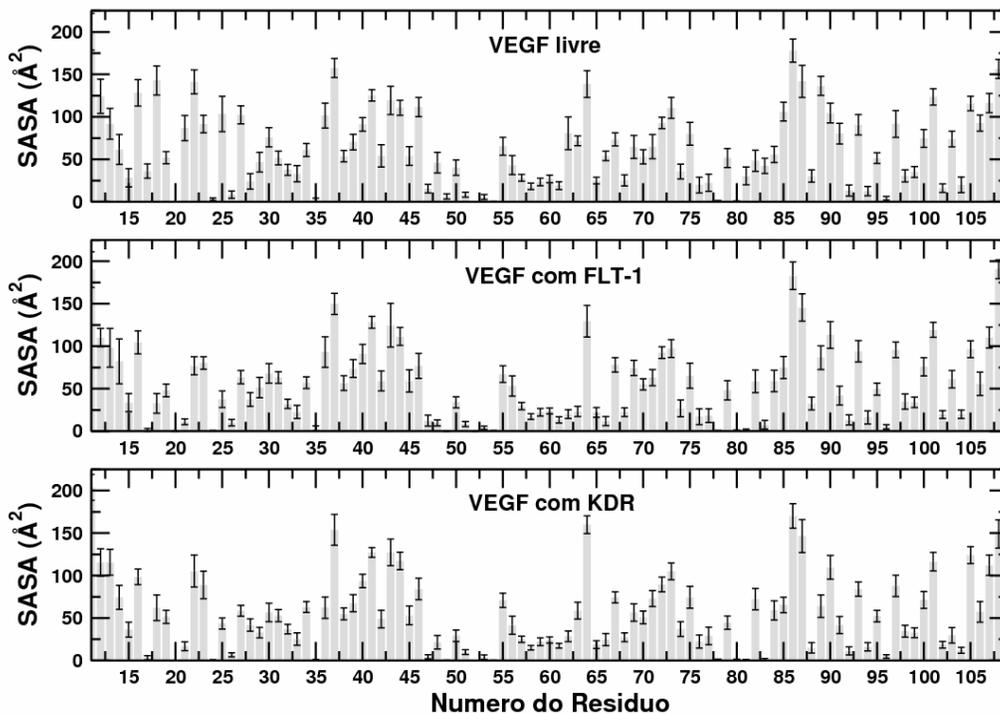


Figura 7.6: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do VEGF livre, do VEGF complexado com o receptor Flt-1 e do VEGF complexado com receptor KDR.

No VEGF (Figura 7.6), ocorrem modificações nas áreas individuais dos resíduos quando da complexação. Ou seja, alguns resíduos do VEGF livre têm um aumento ou diminuição da área superficial acessível ao solvente (SASA) quando comparado ao VEGF/Flt-1 ou VEGF/KDR. Os resíduos 16-18, 21-23, 25, 27-29, 48, 62, 63, 81-83, 89-91 são os exemplos mais evidentes. Essa modificação se dá de forma muito parecida para os dois receptores.

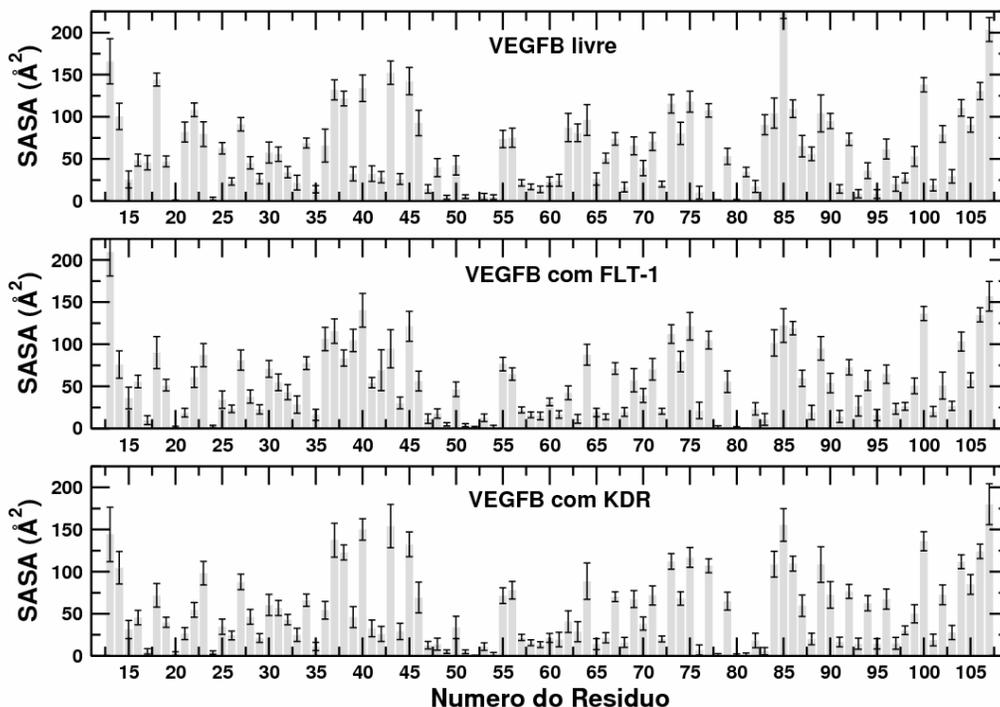


Figura 7.7: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do VEGFB livre, do VEGFB complexado com o receptor Flt-1 e do VEGFB complexado com receptor KDR.

No VEGFB (Figura 7.7), ocorrem modificações similares. Porém os resíduos mais evidentes são 18, 21, 22, 25, 39, 41-43, 46, 48, 62-64, 66, 83, 85, 88, 90, 102 e 105. No entanto, é importante notar que o padrão apresentado pelo VEGFB com Flt-1 difere do VEGFB com KDR, principalmente, para os resíduos: 39, 41-43, 63.

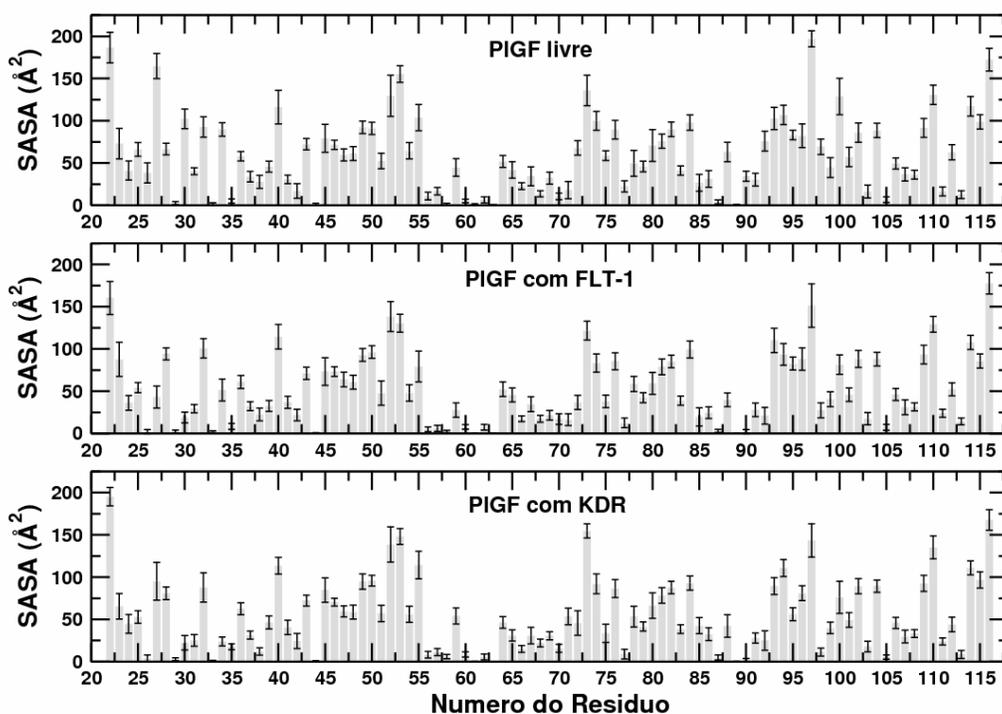


Figura 7.8: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do PIGF livre, do PIGF complexado com o receptor Flt-1 e do PIGF complexado com receptor KDR.

No PIGF (Figura 7.8), também ocorrem modificações nas áreas superficiais. Os resíduos mais evidentes são 26, 27, 30, 34, 72, 75, 98, 100. O PIGF com Flt-1 também apresenta diferenças se comparado ao PIGF com KDR. Os resíduos mais evidentes são 27, 34, 59 e 71.

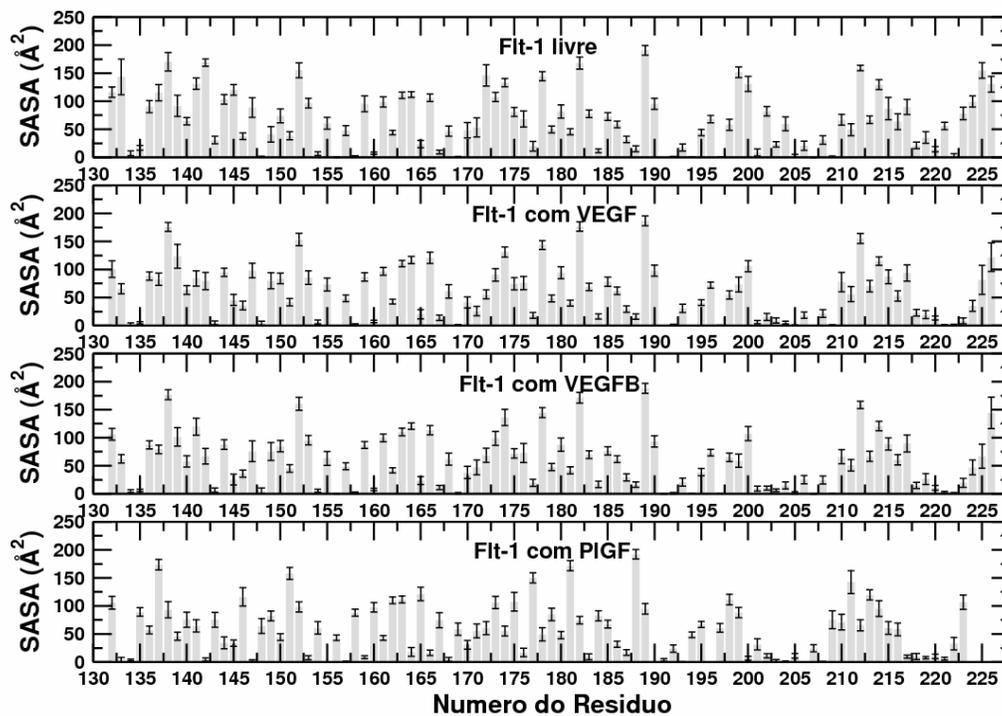


Figura 7.9: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do receptor Flt-1 livre, do receptor Flt-1 complexado com VEGF, do receptor Flt-1 complexado com VEGFB e do receptor Flt-1 complexado com PIGF.

A mesma análise pode ser feita para os receptores. No Flt-1 (Figura 7.9), alguns resíduos sofrem modificações mais evidentes em suas áreas superficiais. Estes resíduos são 133, 141, 142, 145, 172, 199, 200, 202, 204, 221-225.

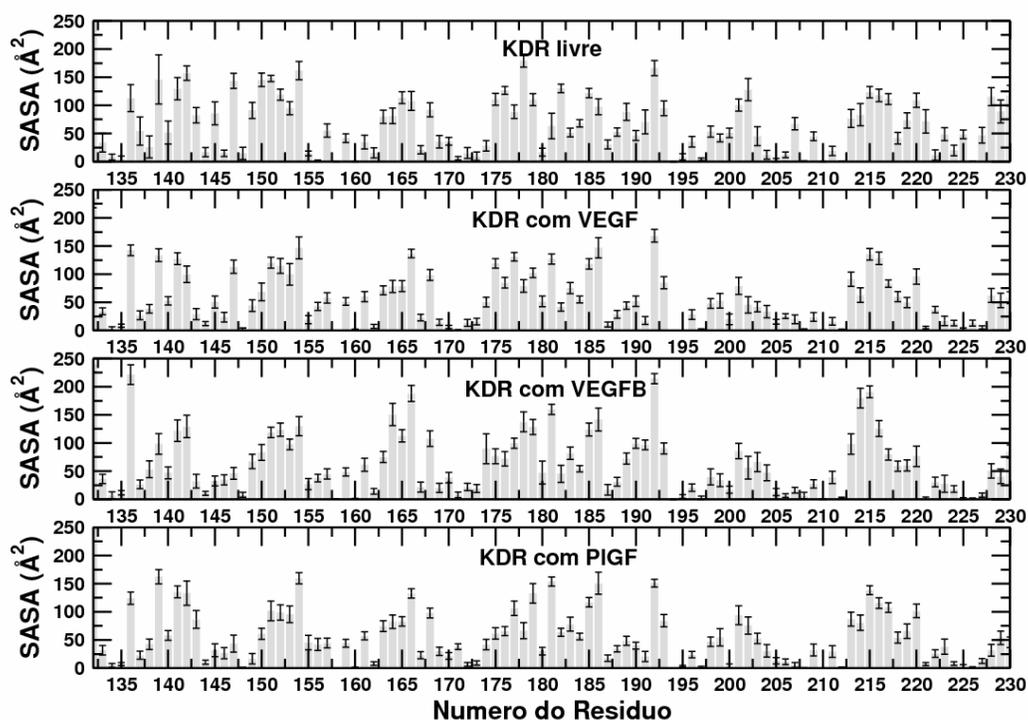


Figura 7.10: Valores médios e desvios padrão da área superficial acessível ao solvente por resíduo do receptor KDR livre, do receptor KDR complexado com VEGF, do receptor KDR complexado com VEGFB e do receptor KDR complexado com PIGF.

No KDR (Figura 7.10), os resíduos que modificam suas áreas superficiais sob a complexação de forma mais evidente são 136, 137, 142, 143, 145, 149-152, 156, 165, 166, 176-178, 186, 189, 200-202, 207, 209, 217, 221, 228, 229. Porém este resultado não é observado uniformemente entre o KDR com VEGF e KDR com outros fatores. Os resíduos que apresentam maiores diferenças são 136, 139, 143, 164-166, 189-192, 214-216.

A análise por resíduo mostra as regiões de maiores modificações na área superficial devido à complexação das proteínas. Diferenças significativas são

observadas quando se compara os complexos observados experimentalmente com aqueles que não são formados na natureza.

A análise de SASA também foi feita de forma global. A Tabela 7.7 mostra os valores médios e desvios padrão totais e também divididos em polar e apolar para todos os sistemas.

Tabela 7-7: Área superficial acessível ao solvente (SASA) em Å².

	Total	Polar	Apolar
VEGF	12944 ±167	5077 ±105	7867 ±115
VEGF/Flt-1	22062 ±234	8751 ±132	13311 ±153
VEGF/KDR	22214 ±205	9149 ±136	13065 ±128
VEGFB	11584 ±152	4012 ±92	7572 ±112
VEGFB/Flt-1	21116 ±245	7745 ±137	13371 ±158
VEGFB/KDR	22749 ±343	8699 ±198	14050 ±200
PIGF	11493 ±122	4776 ±82	6718 ±88
PIGF/Flt-1	20241 ±224	8268 ±117	11973 ±168
PIGF/KDR	21353 ±152	9123 ±112	12230 ±117
Flt-1	6376 ±93	2395 ±56	3981 ±70
KDR	7352 ±190	2812 ±88	4540 ±123

A área interfacial pode ser definida como (KUNDROTAS, 2006)

$$S_{interface} = 1/2(SASA_{fator} + 2SASA_{receptor} - SASA_{complexo}), \quad \text{Equação 34}$$

onde a SASA do receptor é multiplicada por 2 pois em cada complexo existem duas cópias do receptor. A área da interface de cada complexo está mostrada na Tabela 7-8.

Tabela 7-8: Área interfacial de cada complexo.

	Total	Polar	Apolar	%Polar	%Apolar
Área Interfacial VEGF/Flt-1	1817 ±60	559 ±43	1259 ±51	30,7	69,3
Área Interfacial VEGF/KDR	2717 ±171	776 ±72	1941 ±116	28,6	71,4
Área Interfacial VEGFB/Flt-1	1610 ±47	529 ±34	1081 ±47	32,8	67,2
Área Interfacial VEGFB/KDR	1769 ±94	468 ±35	1301 ±79	26,5	73,5
Área Interfacial PlGF/Flt-1	2003 ±43	650 ±39	1354 ±30	32,4	67,6
Área Interfacial PlGF/KDR	2422 ±175	638 ±73	1784 ±108	26,4	73,7

A área da interface de cada complexo é 70 % apolar e 30 % polar, aproximadamente. Os complexos com maior porcentagem de área apolar são justamente os que não são observados na natureza, VEGFB/KDR e PlGF/KDR. Uma razão para isso é que a falta de complementaridade entre as superfícies polares destes complexos causa mudanças conformacionais nas cadeias laterais dos resíduos polares no sentido de diminuir a repulsão.

A área encoberta (BA: *buried area*) é a parte da área de uma proteína que está em contato com a outra proteína. A porcentagem da área encoberta de uma proteína no complexo é a área interfacial dividida pela área total da proteína vezes 100. A Tabela 7-9 mostra as porcentagens de área encoberta e suas frações polares e apolares relativas ao receptor. A Tabela 7-10 mostra o mesmo para os fatores.

Tabela 7-9: Área encoberta (BA: *buried area*) do receptor pelo fator.

	% BA tot.	P/A	% Polar	% Apolar	%BA Polar	%BA Apolar
BA do Flt-1 pelo VEGF	28,5	0,44	8,7	19,7	23,3	31,6
BA do KDR pelo VEGF	36,9	0,40	10,5	26,4	27,5	42,7
BA do Flt-1 pelo VEGFB	25,2	0,49	8,2	16,9	22,0	27,1
BA do KDR pelo VEGFB	24,0	0,36	6,3	17,6	16,6	28,6
BA do Flt-1 pelo PlGF	31,4	0,48	10,1	21,2	27,1	33,9
BA do KDR pelo PlGF	32,9	0,36	8,6	24,2	22,7	39,2

% BA tot. é a percentagem da área superficial total que está na interface. P/A é a razão Polar/Apolar. % Polar é a percentagem da área total que compreende resíduos polares e está na parte encoberta. % Apolar é a percentagem da área total que compreende resíduos apolares e está na parte encoberta. A soma % Polar + % Apolar é igual a % BA tot. % BA Polar e % BA Apolar corresponde à percentagem da área Polar e da área Apolar, respectivamente, que se encontra encoberta.

A Tabela 7-9 indica, por exemplo, que 28,5 % da área total do Flt-1 está encoberta pelo VEGF no complexo formado por estas espécies. Indica ainda que 8,7 % é polar e 19,7% é apolar. % BA Polar indica que 23,3 % da área polar do Flt-1 está encoberta pelo VEGF e % BA Apolar indica que 31,6 % da área apolar do Flt-1 está encoberta pelo VEGF. P/A indica a razão polar/apolar. Este valor relativo pode ser comparado entre os diversos complexos. Repare que estes valores são os mesmos na Tabela 7-10. Apesar da diferença entre as percentagens polar e apolar, a razão entre elas é a mesma. A razão polar/apolar é consideravelmente mais alta nos complexos que são observados.

Tabela 7-10: Área encoberta (BA: *buried area*) do fator pelo receptor.

	% BA tot.	P/A	% Polar	% Apolar	% BA Polar	%BA Apolar
BA do VEGF pelo Flt-1	28,0	0,44	8,6	19,4	22,0	32,0
BA do VEGF pelo KDR	41,9	0,40	12,0	30,0	30,5	49,3
BA do VEGFB pelo Flt-1	27,7	0,49	9,1	18,6	26,3	28,5
BA do VEGFB pelo KDR	30,5	0,36	8,0	22,4	23,3	34,3
BA do PIGF pelo Flt-1	34,8	0,48	11,3	23,5	27,1	40,2
BA do PIGF pelo KDR	42,1	0,36	11,1	31,0	26,7	53,1

% BA tot. é a percentagem da área superficial total que está na interface. P/A é a razão Polar/Apolar. % Polar é a percentagem da área total que compreende resíduos polares e está na parte encoberta. % Apolar é a percentagem da área total que compreende resíduos apolares e está na parte encoberta. A soma % Polar + % Apolar é igual a % BA tot. % BA Polar e % BA Apolar corresponde à percentagem da área Polar e da área Apolar, respectivamente, que se encontra encoberta.

7.5 – Conclusões

O principal objetivo deste Capítulo foi investigar porque o VEGFA ativa os dois receptores e porque o PIGF e o VEGFB só ativam o receptor Flt-1. Todos os resultados apresentados estão coerentes. Os complexos entre VEGFB/KDR e PIGF/KDR apresentam a complementaridade de forma, porém as interações específicas entre resíduos polares ocorrem de forma proibitiva. As interações iônicas observadas nos complexos VEGF/Flt-1, VEGF/KDR, VEGFB/Flt-1 e PIGF/Flt-1 não estão presentes nos complexos VEGFB/KDR e PIGF/KDR. Diferenças significativas de solvatação são encontradas nesses complexos, indicando que a penalidade de dessolvatação é muito

maior nos complexos VEGFB/KDR e PlGF/KDR. O número de ligações de hidrogênio de interface é menor nos dois complexos. As razões polar/apolar nas superfícies moleculares também são discrepantes. Este Capítulo fornece bases moleculares que explicam a ativação diferencial dos receptores de angiogênese.

8 – Conclusões Gerais

Um conceito relativamente moderno em química de proteínas é que não apenas a estrutura, mas também a dinâmica são fundamentais na função biológica (HUANG, 2005). Esse conceito reforça a utilização de simulações de dinâmica molecular para obter informações que são de difícil acesso experimental. Para enzimas, já é bem estabelecido que movimentos de diferentes frequências estão associados com a catálise. Em alguns casos, foi demonstrado que movimentos coletivos lentos e de alta amplitude influenciam na velocidade de reações enzimáticas. É provável que, assim como a estrutura, esses movimentos tenham sido selecionados num processo evolutivo para o aprimoramento da eficiência catalítica. No caso de proteínas sinalizadoras como VEGF, os movimentos coletivos podem ter sido selecionados para aumentar a seletividade, a afinidade e ou a cinética de ligação aos receptores.

Mostramos, nesta tese, que movimentos correlacionados ocorrem na dinâmica do VEGF, principalmente, entre resíduos da região de interação com o receptor. A existência de tais correlações abre fronteiras para explicar fenômenos observáveis que não podem ser explicados apenas por argumentos estruturais.

A seletividade diferencial por receptores é algo mal compreendido na literatura sob o aspecto molecular. Esta tese fornece bases moleculares que explicam a atividade diferencial de fatores de crescimento por receptores.

De forma geral, a tese apresenta os primeiros estudos teóricos, do ponto de vista de estrutura e dinâmica molecular de uma proteína sinalizadora muito importante, o VEGF. Estes estudos servirão como base para novos desenhos de drogas, racionalização

de novos experimentos e para o melhor entendimento da biologia dos fatores de crescimento.

9 – Perspectivas

Resta ainda muito a ser compreendido no tocante ao reconhecimento molecular dos fatores de crescimento pelos seus receptores. Os outros membros da família dos fatores de crescimento vascular endotelial também estão envolvidos em diversos processos biológicos e patológicos de importância e, portanto, são importantes alvos para estudos de interação, modelagem e estudos estruturais.

Com exceção do domínio-2, os demais domínios imunoglobulínicos extracelulares do receptor Flt-1 não possuem estrutura tridimensional determinada. A determinação da estrutura desses domínios pode abrir novas portas para o desenho de fármacos.

Estudos mais amplos da inibição do domínio quinase, utilizando ferramentas como docagem e dinâmica molecular podem acelerar o desenvolvimento de fármacos.

Novas metodologias experimentais e a construção de modelos apropriados podem comprovar as hipóteses levantadas nessa tese sobre a importância dos movimentos correlacionados e seus efeitos entrópicos na termodinâmica de ligação aos receptores.

10 – Referências Bibliográficas

Adams, R. H. e Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., v.8, p.464-478. 2007.

Agarwal, P. K., Billeter, S. R. e Hammes-Schiffer, S. Nuclear quantum effects and enzyme dynamics in dihydrofolate reductase catalysis. Journal of Physical Chemistry B, v.106, n.12, Mar, p.3283-3293. 2002.

Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., Nguyen, H. V., Aiello, L. M., Ferrara, N. e King, G. L. Vascular Endothelial Growth-Factor in Ocular Fluid of Patients with Diabetic-Retinopathy and Other Retinal Disorders. New England Journal of Medicine, v.331, n.22, Dec, p.1480-1487. 1994.

Aiello, L. P., Pierce, E. A., Foley, E. D., Takagi, H., Chen, H., Riddle, L., Ferrara, N., King, G. L. e Smith, L. E. H. Suppression of Retinal Neovascularization in-Vivo by Inhibition of Vascular Endothelial Growth-Factor (Vegf) Using Soluble Vegf-Receptor Chimeric Proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.92, n.23, Nov, p.10457-10461. 1995.

Alexandrov, V., Lehnert, U., Echols, N., Milburn, D., Engelman, D. e Gerstein, M. Normal modes for predicting protein motions: A comprehensive database assessment and associated Web tool. Protein Science, v.14, p.633-643. 2005.

Allen, M. P. e Tildesley, D. J. Computer Simulation of Liquids. Oxford: Clarendon. 1987

Amadei, A., Ceruso, M. A. e Di Nola, A. On the convergence of the conformational coordinates basis set obtained by the essential dynamics analysis of proteins' molecular dynamics simulations. Proteins-Structure Function and Genetics, v.36, n.4, Sep, p.419-424. 1999a.

Amadei, A., Chillemi, G., Ceruso, M. A., Grottesi, A. e Di Nola, A. Molecular dynamics simulations with constrained roto-translational motions: theoretical basis and statistical mechanical consistency. J. Chem. Phys., v.112, p.9-23. 2000.

Amadei, A., De Groot, B. L., Ceruso, M. A., Paci, M., Di Nola, A. e Berendsen, H. J. C. A kinetic model for the internal motions of proteins: Diffusion between multiple harmonic wells. Proteins-Structure Function and Genetics, v.35, n.3, May, p.283-292. 1999b.

Amadei, A., Linssen, A. B. M. e Berendsen, H. J. C. Essential Dynamics of Proteins. Proteins Struct. Funct. Genet., v.17, p.412-425. 1993.

- Amadei, A., Linssen, A. B. M., Degroot, B. L., Vanaalten, D. M. F. e Berendsen, H. J. C. An efficient method for sampling the essential subspace of proteins. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, v.13, n.4, Feb, p.615-625. 1996.
- Astumian, R. D., Chock, P. B., Tsong, T. Y. e Westerhoff, H. V. Effects of Oscillations and Energy-Driven Fluctuations on the Dynamics of Enzyme Catalysis and Free-Energy Transduction. Physical Review A, v.39, n.12, Jun, p.6416-6435. 1989.
- Atilgan, A. R., Durrell, S. R., Jernigan, R. L., Demirel, M. C., Keskin, O. e Bahar, I. Anisotropy of Fluctuation Dynamics of Proteins with an Elastic Network Model. Biophys. J., v.80, p.505-515. 2001.
- Bahar, I. e Jernigan, R. L. Cooperative Fluctuations and Subunit Communication in Tryptophan Synthase. Biochemistry, v.38, p.3478-3490. 1999.
- Balasubramanian, S. P. e Reed, M. W. Ischemic vascular disease and solid cancers: opposing ends of the angiogenic spectrum? Med. Hypotheses, v.67, p.1317-1319. 2006.
- Barford, D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. Curr. Opin. Struct. Biol., v.14, p.679-686. 2004.
- Barleon, B., Totzke, F., Herzog, C., Blanke, S., Kremmer, E., Siemeister, G., Marmé, D. e Martiny-Baron, G. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. J. Biol. Chem., v.272, p.10382-10388. 1997.
- Baron, R. Biomolecular simulation: calculation of entropy and free energy, polypeptide and carbopeptoid folding, simplification of the force field for lipid simulations., Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 2006a.
- Baron, R., De Vries, A. H., Hünenberger, P. H. e Van Gunsteren, W. F. A comparison of atomic-level and coarse-grained models for liquid hydrocarbons from molecular dynamics configurational entropy estimates. J. Phys. Chem. B, v.110, p.8464-8473. 2006b.
- Benjamin, L. E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D. e Keshet, E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J. Clin. Invest., v.103, p.159-165. 1999.
- Benkovic, S. J. e Hammes-Schiffer, S. A perspective on enzyme catalysis. Science, v.301, n.5637, Aug, p.1196-1202. 2003.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F. e Hermans, J. Interaction models for water in relation to protein hydration, in Intermolecular forces (Pullman, BE, Ed), Dordrecht, N. L., p.331-342. 1981.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Vangunsteren, W. F., Dinola, A. e Haak, J. R. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. Journal of Chemical Physics, v.81, n.8, p.3684-3690. 1984.

- Berendsen, H. J. C., Vanderspoel, D. e Vandrunen, R. Gromacs - a Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation. Computer Physics Communications, v.91, n.1-3, Sep, p.43-56. 1995.
- Berweger, C. D., Vangunsteren, W. F. e Mullerplathe, F. Force-Field Parametrization by Weak-Coupling - Reengineering Spc Water. Chemical Physics Letters, v.232, n.5-6, Jan, p.429-436. 1995.
- Brooks, B. e Karplus, M. Harmonic dynamics of proteins: Normal modes and fluctuations in bovine pancreatic trypsin inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.80, p.6571-6575. 1983.
- Brooks, B. e Karplus, M. Normal modes for specific motions of macromolecules: Application to the hinge-bending mode of lysozyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.82, p.4995-4999. 1985.
- Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Li, Z. H., Lu, L., Song, H. Y., Kwon, B. S., Warren, R. E. e Donner, D. B. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. Int. J. Hematol., v.62, p.203-215. 1995.
- Carlson, H. A. Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target. Curr. Opin. Chem. Biol., v.6, p.447-452. 2002.
- Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat. Med., v.6, p.389-395. 2000.
- Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature, v.438, n.7070, Dec, p.932-936. 2005.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. e Nagy, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature, v.380, p.435-439. 1996.
- Chillemi, G., Falconi, M., Amadei, A., Zimatore, G., Desideri, A. e Dinola, A. The essential dynamics of Cu, Zn superoxide dismutase: Suggestion of intersubunit communication. Biophysical Journal, v.73, n.2, Aug, p.1007-1018. 1997.
- Christinger, H. W., Fuh, G., De Vos, A. M. e Wiesmann, C. The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. Journal of Biological Chemistry, v.279, n.11, Mar, p.10382-10388. 2004.
- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P. C., Pan, Y. C., Olander, J. V., Connolly, D. T. e Stern, D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. J. Exp. Med., v.172, p.1535-1545. 1990.

- Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., Van Veldhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D. e Carmeliet, P. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. Nat. Med., v.8, p.702-710. 2002.
- Cunningham, S. A., Stephan, C. C., Arrate, M. P., Ayer, K. G. e Brock, T. A. Identification of the extracellular domains of Flt-1 that mediate ligand interactions. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.231, p.596-599. 1997.
- Cusack, S., Smith, J., Finney, J., Tidor, B. e Karplus, M. Inelastic Neutron-Scattering Analysis of Picosecond Internal Protein Dynamics - Comparison of Harmonic Theory with Experiment. Journal of Molecular Biology, v.202, n.4, Aug, p.903-908. 1988.
- Davis-Smyth, T., Chen, H., Park, J., Presta, L. G. e Ferrara, N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. EMBO J., v.15, p.4919-4927. 1996.
- De Castro, G., Puglisi, F., De Azambuja, E., El Saghir, N. S. e Awada, A. Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the “do ut des” paradigm). Critical Reviews in Oncology/Hematology, v.59, p.40-50. 2006.
- De Falco, S., Gigante, B. e Persico, M. G. Structure and function of placental growth factor. Trends in Cardiovascular Medicine, v.12, n.6, Aug, p.241-246. 2002.
- De Oliveira, C. A. F., Guimarães, C. R. W., Barreiro, G. e De Alencastro, R. B. Human Cytomegalovirus Protease: Why is the Dimer Required for Catalytic Activity? Journal of Chemical Theory and Computation, v.3, n.1, January 09, 2007, p.278-288. 2007.
- De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. e Williams, L. T. The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science, v.255, p.989-991. 1992.
- Degroot, B. L., Amadei, A., Scheek, R. M., Vannuland, N. A. J. e Berendsen, H. J. C. An extended sampling of the configurational space of HPr from E-coli. Proteins-Structure Function and Genetics, v.26, n.3, Nov, p.314-322. 1996a.
- Degroot, B. L., Vanaalten, D. M. F., Amadei, A. e Berendsen, H. J. C. The consistency of large concerted motions in proteins in molecular dynamics simulations. Biophysical Journal, v.71, n.4, Oct, p.1707-1713. 1996b.
- Detmar, M., Brown, L. F., Schon, M. P., Elicker, B. M., Velasco, P., Richard, L., Fukumura, D., Monsky, W., Claffey, K. P. e Jain, R. K. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. J. Invest. Dermatol., v.111, p.1-6. 1998.

Dixit, S. B., Andrews, D. Q. e Beveridge, D. L. Induced fit and the entropy of structural adaptation in the complexation of CAP and λ -repressor with cognate DNA sequences. Biophys. J., v.88, p.3147-3157. 2005.

Dolenc, J., Baron, R., Oostenbrink, C., Koller, J. e Van Gunsteren, W. F. Configurational Entropy Change of Netropsin and Distamycin upon DNA Minor-Groove Binding. Biophys. J., v.91, p.1460-1470. 2006.

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M. e Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am. J. Pathol., v.146, p.1029-1039. 1995.

Eckart, C. Some studies concerning rotating axes and poliatomic molecules. Phys. Rev., v.47, p.552-558. 1935.

Eisenmesser, E. Z., Bosco, D. A., Akke, M. e Kern, D. Enzyme dynamics during catalysis. Science, v.295, n.5559, Feb, p.1520-1523. 2002.

Eisenmesser, E. Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D. M., Wolf-Watz, M., Bosco, D. A., Skalicky, J. J., Kay, L. E. e Kern, D. Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. Nature, v.438, n.7064, Nov, p.117-121. 2005.

Elcock, A. H., Sept, D. e Mccammon, J. A. Computer Simulation of Protein-Protein Interactions. J. Phys. Chem. B, v.105, p.1504-1518. 2001.

Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H. e Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. Journal of Chemical Physics, v.103, n.19, Nov, p.8577-8593. 1995.

Estabrook, R. A., Luo, J., Purdy, M. M., Sharma, V., Weakliem, P., Bruice, T. C. e Reich, N. O. Statistical coevolution analysis and molecular dynamics: Identification of amino acid pairs essential for catalysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.102, p.994-999. 2005.

Fairbrother, W. J., Champe, M. A., Christinger, H. W., Keyt, B. A. e Starovasnik, M. A. ^1H , ^{13}C , and ^{15}N backbone assignment and secondary structure of the receptor-binding domain of vascular endothelial growth factor. Protein Sci., v.6, p.2250-2260. 1997.

Fairbrother, W. J., Christinger, H. W., Cochran, A. G., Fuh, C., Keenan, C. J., Quan, C., Shriver, S. K., Tom, J. Y. K., Wells, J. A. e Cunningham, B. C. Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. Biochemistry, v.37, n.51, Dec, p.17754-17764. 1998.

Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. Nat. Rev. Cancer, v.2, p.795-803. 2002.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J. e Moore, M. W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature, v.380, p.439-442. 1996.

Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H. P., Nguyen, T. N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K. J. e Schwall, R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. Nat. Med., v.4, p.336-340. 1998.

Ferrara, N. e Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr. Rev., v.18, p.4-25. 1997.

Ferrara, N., Gerber, H. P. e Lecouter, J. The biology of VEGF and its receptors. Nature Medicine, v.9, n.6, Jun, p.669-676. 2003.

Ferrara, N. e Kerbel, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. Nature, v.438, p.967-974. 2005.

Folkman, J. Angiogenesis. Annual Review of Medicine, v.57, p.1-18. 2006.

Folkman, J. e Shing, Y. Angiogenesis. J. Biol. Chem., v.267, p.10931-10934. 1992.

Frauenfelder, H., Petsko, G. A. e Tsernoglou, D. Temperature-Dependent X-Ray-Diffraction as a Probe of Protein Structural Dynamics. Nature, v.280, n.5723, p.558-563. 1979.

Frenkel, D. e Smit, B. Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications. San Diego, CA, USA: Academic Press. 1996

Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. e Carbone, D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nat. Med., v.2, p.1096-1103. 1996.

Gerber, H.-P., Dixit, V. e Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor Induces Expression of the Antiapoptotic Proteins Bcl-2 and A1 in Vascular Endothelial Cells. J. Biol. Chem., v.273, p.13313-13316. 1998a.

Gerber, H.-P., Hillan, K. J., Ryan, A. M., Kowalski, J., Keller, G. A., Rangell, L., Wright, B. D., Radtke, F., Aguet, M. e Ferrara, N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. Development, v.126, p.1149-1159. 1999a.

Gerber, H.-P., Malik, A. K., Solar, G. P., Sherman, D., Liang, X. H., G., M., Hong, K., Marsters, J. C. e Ferrara, N. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. Nature, v.417, p.954-958. 2002.

Gerber, H.-P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V. e Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway. REQUIREMENT FOR Flk-1/KDR ACTIVATION. J. Biol. Chem., v.273, p.30336-30343. 1998b.

Gerber, H. P. e Ferrara, N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. J. Mol. Med., v.81, p.20-31. 2003.

Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z. e Ferrara, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat. Med., v.5, p.623-628. 1999b.

Gibrat, J. F. e Go, N. Normal Mode Analysis of Human Lysozyme - Study of the Relative Motion of the 2 Domains and Characterization of the Harmonic Motion. Proteins-Structure Function and Genetics, v.8, n.3, p.258-279. 1990.

Go, N., Noguti, T. e Nishikawa, T. Dynamics of small globular protein in terms of low-frequency vibrational modes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.80, p.3696-3700. 1983.

Greenleaf, W. J., Woodside, M. T. e Block, S. M. High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, v.36, p.171-190. 2007.

Gridley, T. Vessel guidance. Nature, v.445, p.722-723. 2007.

Hamacher, K. e Mccammon, J. A. Computing the Amino Acid Specificity of Fluctuations in Biomolecular Systems. J. Chem. Theory Comput., v.2, p.873-878. 2006.

Harris, P. A., Cheung, M., Hunter, R. N., Brown, M. L., Veal, J. M., Nolte, R. T., Wang, L., Liu, W., Crosby, R. M., Johnson, J. H., Epperly, A. H., Kumar, R., Luttrell, D. K. e Stafford, J. A. Discovery and evaluation of 2-anilino-5-aryloxazoles as a novel class of VEGFR2 kinase inhibitors. J. Med. Chem., v.48, p.1610-1619. 2005.

Harte, W. E. J., Swaminathan, S. e Beveridge, D. L. Molecular Dynamics of HIV-1 Protease. Proteins Struct. Funct. Genet., v.13, p.175-194. 1992.

Hasegawa, M., Nishigaki, N., Washio, Y., Kano, K., Harris, P. A., Sato, H., Mori, I., West, R. I., Shibahara, M., Toyoda, H., Wang, L., Nolte, R. T., Veal, J. M. e Cheung, M. Discovery of Novel Benzimidazoles as Potent Inhibitors of TIE-2 and VEGFR-2 Tyrosine Kinase Receptors. J. Med. Chem., v.50, p.4453-4470. 2007.

Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N. R., Lyden, D., Tateno, M., Hicklin, D. J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R. G., Moore, M. A. S. e Rafii, S. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin-1 Stimulate Postnatal Hematopoiesis by Recruitment of Vasculogenic and Hematopoietic Stem Cells. J. Exp. Med., v.193, p.1005-1014. 2001.

Hayward, S. e Go, N. Collective variable description of native protein dynamics. Annu. Rev. Phys. Chem., v.46, p.223-250. 1995.

He, Y., Karpanen, T. e Alitalo, K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. Biochimica et Biophysica Acta, v.1654, p.3-12. 2004.

Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. e Fraaije, J. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. Journal of Computational Chemistry, v.18, n.12, Sep, p.1463-1472. 1997.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, v.22, p.4673-4680. 1994.

Hillisch, A., Pineda, L. F. e Hilgenfeld, R. Utility of homology models in the drug discovery process. Drug Discovery Today, v.9, p.659-669. 2004.

Hockney, R. W. The potential calculation and some applications. Methods in Computational Physics, v.9, p.136-211. 1970.

Hodous, B. L., Geuns-Meyer, S. D., Hughes, P. E., Albrecht, B. K., Bellon, S., Bready, J., Caenepeel, S., Cee, V. J., Chaffee, S. C., Coxon, A., Emery, M., Fretland, J., Gallant, P., Gu, Y., Hoffman, D., Johnson, R. E., Kendall, R., Kim, J. L., Long, A. M., Morrison, M., Olivieri, P. R., Patel, V. F., Polverino, A., Rose, P., Tempest, P., Wang, L., Whittington, D. A. e Zhao, H. Evolution of a Highly Selective and Potent 2-(Pyridin-2-yl)-1,3,5-triazine Tie-2 Kinase Inhibitor. J. Med. Chem., v.50, p.611-626. 2007.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T. e De Bruijn, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacological Reviews, v.56, n.4, Dec, p.549-580. 2004.

Horta, B. A. C., Cirino, J. J. V. e De Alencastro, R. B. Dynamical Behavior of the Vascular Endothelial Growth Factor: Biological Implications. Proteins, v.67, n.3, p.517-525. 2007.

Horta, B. A. C., Cirino, J. J. V. e De Alencastro, R. B. Correction of "Dynamical behavior of the vascular endothelial growth factor: Biological implications" (Proteins 2007; 67:517-525). Proteins, v.70, p.307-308. 2008a.

Horta, B. A. C., Cirino, J. J. V. e De Alencastro, R. B. On the structure, interactions, and dynamics of bound VEGF. Journal of Molecular Graphics and Modelling, v.26, p.1091-1103. 2008b.

Huang, Y. J. e Montelione, G. T. Proteins flex to function. Nature, v.438, p.36-37. 2005.

Hubbard, S. J. e Thornton, J. M. NACCESS. London: Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London 1993.

Hünenberger, P. H., Mark, A. E. e Van Gunsteren, W. F. Fluctuation and Cross-correlation Analysis of Protein Motions Observed in Nanosecond Molecular Dynamics Simulations. Journal of Molecular Biology, v.252, p.492-503. 1995.

Ichiye, T. e Karplus, M. Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. Proteins, v.11, p.205-217. 1991.

Irikura, K. K., Tidor, B., Brooks, B. R. e Karplus, M. Transition from B to Z DNA: contribution of internal fluctuations to the configurational entropy difference. Science, v.229, p.571-572. 1985.

Ishikawa, H., Kim, S., Kwak, K., Wakasugi, K. e Fayer, M. D. Disulfide bond influence on protein structural dynamics probed with 2D-IR vibrational echo spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.104, p.19309–19314. 2007.

Iyer, S., Leonidas, D. D., Swaminathan, G. J., Maglione, D., Battisti, M., Tucci, M., Persico, M. G. e Acharya, K. R. The crystal structure of human placental growth factor-1 (PlGF-1) an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. J. Biol. Chem., v.276, p.12153-12161. 2001.

Jarymowycz, V. A. e Stone, M. J. Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. Chemical Reviews, v.106, p.1624-1671. 2006.

Jusuf, S., Loll, P. J. e Axelsen, P. H. The Role of Configurational Entropy in Biochemical Cooperativity. J. Am. Chem. Soc., v.124, p.3490-3491. 2002.

Kaminski, G. A., Friesner, R. A., Tirado-Rives, J. e Jorgensen, W. L. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. Journal of Physical Chemistry B, v.105, n.28, Jul, p.6474-6487. 2001.

Karplus, M., Ichiye, T. e Pettitt, B. M. Configurational entropy of native proteins. Biophys. J., v.52, p.1083-1088. 1987.

Karplus, M. e Kuriyan, J. Molecular dynamics and protein function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.102, n.19, May, p.6679-6685. 2005.

Karplus, M. e Kushick, J. Method for estimating the configurational entropy of macromolecules. Macromolecules, v.17, p.325-332. 1981.

Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, L. T., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H. e Ferrara, N. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective variants by site-directed mutagenesis. Journal of Biological Chemistry, v.262, p.17294-17298. 1996.

Kiba, A., Yabana, N. e Shibuya, M. A set of loop-1 and-3 structures in the novel vascular endothelial growth factor (VEGF) family member, VEGF-ENZ-7, is essential for the activation of VEGFR-2 signaling. Journal of Biological Chemistry, v.278, n.15, Apr, p.13453-13461. 2003.

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S. e Ferrara, N. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis Suppresses Tumor-Growth In Vivo. Nature, v.362, n.6423, Apr, p.841-844. 1993.

- Kovacs, Z., Ikezaki, K., Samoto, K., Inamura, T. e Fukui, M. VEGF and fit: Expression time kinetics in rat brain infarct. Stroke, v.27, p.1865-1873. 1996.
- Ku, D. D., Zaleski, J. K., Liu, S. e Brock, T. A. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. Am. J. Physiol., v.265, p.H586-H592. 1993.
- Kundrotas, P. J. e Alexov, E. Electrostatic Properties of Protein-Protein Complexes. Biophys. J., v.91, p.1724-1736. 2006.
- Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S. e Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography v.26, p.283-291. 1993.
- Lee, A. L., Kinnear, S. A. e Wand, A. J. Redistribution and loss of side chain entropy upon formation of a calmodulin-peptide complex. Nature Structural Biology, v.7, n.1, Jan, p.72-77. 2000.
- Leung, D. W., Cahianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. e Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science, v.246, p.1306-1309. 1989.
- Levitt, M., Sander, C. e Stern, P. S. Protein Normal-Mode Dynamics - Trypsin-Inhibitor, Crambin, Ribonuclease and Lysozyme. Journal of Molecular Biology, v.181, n.3, p.423-447. 1985.
- Levy, R. M., Srinivasan, A. R., Olson, W. K. e Mccammon, J. A. Quasi-Harmonic Method for Studying Very Low-Frequency Modes in Proteins. Biopolymers, v.23, n.6, p.1099-1112. 1984.
- Li, B., Fuh, G., Meng, G., Xin, X., Gerritsen, M. E., Cunningham, B. e De Vos, A. M. Receptor-selective variants of human vascular endothelial growth factor. J. Biol. Chem., v.275, p.29823-29828. 2000.
- Lindahl, E., Hess, B. e Van Der Spoel, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. Journal of Molecular Modeling, v.7, n.8, p.306-317. 2001.
- Liu, S. Q., Liu, C. Q. e Fu, Y. X. Molecular motions in HIV-1 gp120 mutants reveal their preferences for different conformations. Journal of Molecular Graphics & Modelling, v.26, n.1, Jul, p.306-318. 2007.
- Luthy, R., Bowie, J. U. e Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature, v.356, p.83-85. 1992.
- Malecaze, F., Clamens, S., Simorre-Pinatel, V., Mathis, A., Chollet, P., Favard, C., Bayard, F. e Plouet, J. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. Arch. Ophthalmol., v.112, p.1476-1482. 1994.

Mark, A. E. e Fan, H. Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. Protein Sci., v.13, p.211-220. 2004.

Mazumder-Shivakumar, D. e Bruice, T. C. Computational Study of IAG-nucleoside hydrolase: determination of the preferred ground state conformation and the role of active site residues. Biochemistry, v.44, p.7805-7817. 2005.

Mccammon, J. A. e Harvey, S. C. Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. Cambridge: Cambridge University Press. 1987

Mcdonald, N. Q. e Hendrickson, W. A. A structural superfamily of growth-factors containing a cystine knot motif. Cell, v.73, p.421-424. 1993.

Mcdonald, N. Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A. e Blundell, T. L. New protein fold revealed by a 2.3 Å resolution crystal structure of nerve growth factor. Nature, v.354, p.411-414. 1991.

Mclachlan, A. D. Rapid Comparison of Protein Structures. Acta Crystallographica Section A, v.38, n.NOV, p.871-873. 1982.

Mclaren, J., Prentice, A., Charnock-Jones, D. S., Millican, S. A., Mueller, K. H., Sharkey, A. M. e Smith, S. K. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. J. Clin. Invest., v.98, p.482-489. 1996.

Mctigue, M. A., Wickersham, J. A., Pinko, C., Showalter, R. E., Parast, C. V., Tempczyk-Russell, A., Gehring, M. R., Mroczkowski, B., Kan, C. C., Villafranca, J. E. e Appelt, K. Crystal structure of the kinase domain of human vascular endothelial growth factor receptor 2: a key enzyme in angiogenesis. Structure Fold. Des., v.7, p.319-330. 2000.

Mesentean, S., Koppole, S., Smith, J. C. e Fischer, S. The principal motions involved in the coupling mechanism of the recovery stroke of the myosin motor. Journal of Molecular Biology, v.367, n.2, Mar, p.591-602. 2007.

Miyazaki, Y., Matsunaga, S., Tang, J., Maeda, Y., Nakano, M., Philippe, R. J., Shibahara, M., Liu, W., Sato, H., Wang, L. e Nolte, R. T. Novel 4-amino-furo[2,3-d]pyrimidines as Tie-2 and VEGFR2 dual inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett., v.15, p.2203-2207. 2005.

Moghaddam, M. E. e Naderi-Manesh, H. Role of Disulfide Bonds in Modulating Internal Motions of Proteins to Tune Their Function: Molecular Dynamics Simulation of Scorpion Toxin Lqh III. PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics, v.63, p.188-196. 2006.

Mulder, F. A. A., Mittermaier, A., Hon, B., Dahlquist, F. W. e Kay, L. E. Studying excited states of proteins by NMR spectroscopy. Nature Structural Biology, v.8, n.11, Nov, p.932-935. 2001.

Muller, Y. A., Christinger, H. W., Keyt, B. A. e Devos, A. M. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 angstrom resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. Structure, v.5, n.10, Oct, p.1325-1338. 1997a.

Muller, Y. A., Heiring, C., Misselwitz, R., Welfle, K. e Welfle, H. The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in vascular endothelial growth factor. Journal of Biological Chemistry, v.277, p.43410-43416. 2002.

Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. A., Cunningham, B. C. e Devos, A. M. Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.94, n.14, Jul, p.7192-7197. 1997b.

Nayeem, A., Sitkoff, D. e Krystek, S. A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: From sequence alignments to structural models. Protein Sci., v.15, p.808-824. 2006.

Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y. e Shibuya, M. A Novel Type of Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), Preferentially Utilizes KDR/Flk-1 Receptor and Carries a Potent Mitotic Activity without Heparin-binding Domain. J. Biol. Chem., v.273, p.31273 - 31282. 1998.

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., Von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K. e Eriksson, U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.93, p.2576-2581. 1996.

Palmer, A. G. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. Chemical Reviews, v.104, n.8, Aug, p.3623-3640. 2004.

Palmer, A. G. e Massi, F. Characterization of the dynamics of biomacromolecules using rotating-frame spin relaxation NMR spectroscopy. Chemical Reviews, v.106, n.5, May, p.1700-1719. 2006.

Pan, B., Li, B., Russell, S. J., Tom, J. Y. K., Cochran, A. G. e Fairbrother, W. J. Solution structure of a phage-derived peptide antagonist in complex with vascular endothelial growth factor. Journal of Molecular Biology, v.316, n.3, Feb, p.769-787. 2002.

Pieren, M., Prota, A. E., Ruch, C., Kostrewa, D., Wagner, A., Biedermann, K., Winkler, F. K. e Ballmer-Hofer, K. Crystal structure of the Orf virus NZ2 variant of vascular endothelial growth factor-E - Implications for receptor specificity. Journal of Biological Chemistry, v.281, n.28, Jul, p.19578-19587. 2006.

Pineda, J., Callender, R. e Schwartz, S. D. Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase. Biophysical Journal, v.93, n.5, Sep, p.1474-1483. 2007.

Plouet, J., Schilling, J. e Gospodarowicz, D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 cells. EMBO J., v.8, p.3801-3808. 1989.

Pontius, J., Richelle, J. e Wodak, S. J. Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures. J. Mol. Biol., v.264, p.121-136. 1996.

Potashman, M. H., Bready, J., Coxon, A., Demelfi, T. M., Dipietro, L., Doerr, N., Elbaum, D., Estrada, J., Gallant, P., Germain, J., Gu, Y., Harmange, J. C., Kaufman, S. A., Kendall, R., Kim, J. L., Kumar, G. N., Long, A. M., Neervannan, S., Patel, V. F., Polverino, A., Rose, P., Plas, S. V., Whittington, D., Zanon, R. e Zhao, H. Design, Synthesis, and Evaluation of Orally Active Benzimidazoles and Benzoxazoles as Vascular Endothelial Growth Factor-2 Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. J. Med. Chem., v.50, p.4351-4373. 2007.

Pötgens, A. J. G., Lubsen, N. H., Van Altena, M. C., Vermeulen, R., Bakker, A., Schoenmakers, J. G. G., Ruiter, D. J. e De Waal, R. M. W. Covalent Dimerization of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Is Essential for its Biological Activity. Journal of Biological Chemistry, v.269, p.32879-32885. 1994.

Radkiewicz, J. L. e Brooks, C. L. Protein Dynamics in Enzymatic Catalysis: Exploration of Dihydrofolate Reductase. J. Am. Chem. Soc., v.122, p.225-231. 2000.

Roberts, W. G. e Palade, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J. Cell. Sci., v.108, p.2369-2379. 1995.

Rozovsky, S., Jogl, G., Tong, L. e Mcdermott, A. E. Solution-state NMR investigations of triosephosphate isomerase active site loop motion: Ligand release in relation to active site loop dynamics. Journal of Molecular Biology, v.310, n.1, Jun, p.271-280. 2001a.

Rozovsky, S. e Mcdermott, A. E. The time scale of the catalytic loop motion in triosephosphate isomerase. Journal of Molecular Biology, v.310, n.1, Jun, p.259-270. 2001b.

Ruch, C., Skiniotis, G., Steinmetz, M. O., Walz, T. e Ballmer-Hofer, K. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. Nat. Struct. Mol. Biol., v.14, p.249-250. 2007.

Sali, A. e Blundell, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol., v.234, p.779-815. 1993.

Schäfer, H., Mark, A. E. e Van Gunsteren, W. F. Absolute entropies from molecular dynamics simulation trajectories. J. Chem. Phys., v.113, p.7809-7817. 2000.

Scheek, R. M., Vannuland, N. A. J., Degroot, B. L. e Amadei, A. Structure from Nmr and Molecular-Dynamics - Distance Restraining Inhibits Motion in the Essential Subspace. Journal of Biomolecular Nmr, v.6, n.1, Jul, p.106-111. 1995.

Schieborr, U. e Rüterjans, H. Bias-free separation of internal and overall motion of biomolecules. Proteins Struct. Funct. Genet., v.45, p.207-218. 2001.

Schlunegger, M. P. e Grütter, M. G. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta2. Nature, v.358, p.430-434. 1992.

Schonbrun, J., Wedemeyer, W. J. e Baker, D. Protein structure prediction in 2002. Curr. Opin. Struct. Biol., v.12, p.348-354. 2002.

Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. e Dvorak, H. F. Tumor-Cells Secrete a Vascular-Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites-Fluid. Science, v.219, n.4587, p.983-985. 1983.

Shibuya, M. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. J. Biochem. Mol. Biol., v.39, p.469-478. 2006.

Smith, J., Cusack, S., Poole, P. e Finney, J. Direct Measurement of Hydration-Related Dynamic Changes in Lysozyme Using Inelastic Neutron-Scattering Spectroscopy. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, v.4, n.4, Feb, p.583-588. 1987.

Starovasnik, M. A., Christinger, H. W., Wiesmann, C., Champe, M. A., De Vos, A. M. e Skelton, N. J. Solution structure of the VEGF-binding domain of Flt-1: Comparison of its free and bound states. Journal of Molecular Biology, v.293, n.3, Oct, p.531-544. 1999.

Stites, W. E. Protein-Protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis. Chemical Reviews, v.97, p.1233-1250. 1997.

Sutcliffe, M. J. e Scrutton, N. S. A new conceptual framework for enzyme catalysis - Hydrogen tunneling coupled to enzyme dynamics in flavoprotein and quinoprotein enzymes. European Journal of Biochemistry, v.269, n.13, Jul, p.3096-3102. 2002.

Tabruyn, S. P. e Griffioen, A. W. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.355, p.1-5. 2007.

Tai, K., Shen, T. Y., Borjesson, U., Philippopoulos, M. e Mccammon, J. A. Analysis of a 10-ns molecular dynamics simulation of mouse acetylcholinesterase. Biophysical Journal, v.81, n.2, Aug, p.715-724. 2001.

Tama, F. e Sanejouand, Y. H. Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. Protein Engineering, v.14, n.1, Jan, p.1-6. 2001.

Terman, B. C., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D. e Böhlen, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor Biochem. Biophys. Res. Commun., v.187, p.1579-1586. 1992.

Thomas, A., Hinsen, K., Field, M. J. e Perahia, D. Tertiary and quaternary conformational changes in aspartate transcarbamylase: A normal mode study. Proteins-Structure Function and Genetics, v.34, n.1, Jan, p.96-112. 1999.

Thornton, S. T. e Marion, J. B. Classical Dynamics of particles and systems. Belmont, CA, USA: Brooks/Cole Thomson Learning. 2004

Tidor, B. e Karplus, M. The Contribution of Cross-Links to Protein Stability: A Normal Mode Analysis of the Configurational Entropy of the Native State. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics, v.15, p.71-79. 1993.

Valadie, H., Lacapre, J. J., Sanejouand, Y. H. e Etchebest, C. Dynamical properties of the MscL of Escherichia coli: A normal mode analysis. Journal of Molecular Biology, v.332, n.3, Sep, p.657-674. 2003.

Van Der Greer, P., Hunter, T. e Lindberg, R. A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Annu. Rev. Cell Biol., v.10, p.251-337. 1994.

Vanaalten, D. M. F., Amadei, A., Linssen, A. B. M., Eijssink, V. G. H., Vriend, G. e Berendsen, H. J. C. The Essential Dynamics of Thermolysin - Confirmation of the Hinge-Bending Motion and Comparison of Simulations in Vacuum and Water. Proteins-Structure Function and Genetics, v.22, n.1, May, p.45-54. 1995a.

Vanaalten, D. M. F., Degroot, B. L., Findlay, J. B. C., Berendsen, H. J. C. e Amadei, A. A comparison of techniques for calculating protein essential dynamics. Journal of Computational Chemistry, v.18, n.2, Jan, p.169-181. 1997.

Vanaalten, D. M. F., Findlay, J. B. C., Amadei, A. e Berendsen, H. J. C. Essential dynamics of the cellular retinol-binding protein - Evidence for ligand-induced conformational changes. Protein Engineering, v.8, n.11, Nov, p.1129-1135. 1995b.

Venclovas, C., Zemla, A., Fidelis, K. e Moult, J. Comparison of performance in successive CASP experiments. PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics, v.Suppl. 5, p.163-170. 2001.

Vendruscolo, M. e Dobson, C. M. Dynamic visions of enzymatic reactions. Science, v.313, n.5793, Sep, p.1586-1587. 2006.

Volkman, B. F., Lipson, D., Wemmer, D. E. e Kern, D. Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. Science, v.291, n.5512, Mar, p.2429-2433. 2001.

Wagner, G. e Wuthrich, K. Dynamic-Model of Globular Protein Conformations Based on Nmr-Studies in Solution. Nature, v.275, n.5677, p.247-248. 1978.

Wiesmann, C., Christinger, H. W., Cochran, A. G., Cunningham, B. C., Fairbrother, W. J., Keenan, C. J., Meng, G. e De Vos, A. M. Crystal structure of the complex between VEGF and a receptor-blocking peptide. Biochemistry, v.37, n.51, Dec, p.17765-17772. 1998.

Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W., Eigenbrot, C., Wells, J. A. e Devos, A. M. Crystal structure at 1.7 angstrom resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. Cell, v.91, n.5, Nov, p.695-704. 1997.

Wolf-Watz, M., Thai, V., Henzler-Wildman, K., Hadjipavlou, G., Eisenmesser, E. Z. e Kern, D. Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. Nature Structural & Molecular Biology, v.11, n.10, Oct, p.945-949. 2004.

Yamazaki, Y. e Morita, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. Molecular Diversity, v.10, p.515-527. 2006.

Yancopoulos, G. D. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature, v.407, p.242-248. 2000.

Yang, R., Thomas, G. R., Bunting, S., Ko, A., Ferrara, N., Keyt, B., Ross, J. e Jin, H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. J. Cardiovasc. Pharmacol., v.27, p.838-844. 1996.

Zhang, Z. Y., Boyle, P. C., Lu, B. Y., Chang, J. Y. e Wriggers, W. Entropic folding pathway of human epidermal growth factor explored by disulfide scrambling and amplified collective motion simulations. Biochemistry, v.45, n.51, Dec, p.15269-15278. 2006.

Zoete, V., Meuwly, M. e Karplus, M. A Comparison of the Dynamic Behavior of Monomeric and Dimeric Insulin Shows Structural Rearrangements in the Active Monomer. J. Mol. Biol., v.342, p.913-929. 2004.

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](#)