

Laboratório Nacional de Computação Científica
Programa de Pós Graduação em Modelagem Computacional

**ESTUDO POR MODELAGEM E DINÂMICA
MOLECULAR DA INTERAÇÃO DA INTEGRINA
ALPHA6BETA1 COM O DOMÍNIO
TIPO-DISINTEGRINA DE ADAM2 e ADAM9
HUMANAS.**

Por

Mônika Aparecida Coronado

PETRÓPOLIS, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**ESTUDO POR MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DA
INTERAÇÃO DA INTEGRINA ALPHA6BETA1 COM O DOMÍNIO
TIPO-DISINTEGRINA DE ADAM2 E ADAM9 HUMANAS.**

Mônika Aparecida Coronado

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO LABORATÓRIO
NACIONAL DE COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA COMO PARTE DOS REQU-
SITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM MODELAGEM COMPUTACIONAL

Aprovada por:

Prof. Jorge Hernandez Fernandez, Ph.D

(Presidente)

Prof. Laurent Dardenne, Ph.D

Prof. Solange Maria de Toledo Serrano, Ph.D

Prof. Christina Barha Fidalgo, Ph.D

Prof. Helio José Correia Barbosa, Ph.D

Prof. Monika Pickholz, Ph.D

PETRÓPOLIS, RJ - BRASIL
MARÇO DE 2008

Coronado, Mônica Aparecida

C822e estudo por modelagem e dinâmica molecular da interação da integrina alpha6beta1 com o domínio tipo-disintegrina de adam2 e adam9 humanas. / Mônica Aparecida Coronado. Petrópolis, RJ. : Laboratório Nacional de Computação Científica, 2008.

xxiv, 161 p. : il.; 29 cm

Orientador: Jorge Hernandez Fernandez

Dissertação (M.Sc.) – Laboratório Nacional de Computação Científica, 2008.

1.Dinâmica Molecular. 2.Integrinas. 3.ADAM. 4.Disintegrin-*like*. 5.SVMP. I. Fernandez, Jorge Hernandez. II. LNCC/MCT. III. Título.

CDU 572.33

Alegria e Dor

“A alegria é como uma borboleta que esvoaça baixinho sobre os campos mas a dor é como um pássaro de grandes asas negras e robustas que nos transporta acima da vida que existe lá em baixo ao sol por entre a verdura. E esse pássaro voa alto, até onde os anjos da dor estão de vigília sobre o leito da morte.” Edith Sodergran - 16 anos.

Dedico a essa força superior que
calou-me as palavras duras, me levantou
todas as vezes que cai, me enviou proteção,
abriu meu sorriso e
fez-me entender o que é o verdadeiro
AMOR

Agradecimientos

Usted se me llevó la vida Y el alma entera,
Y se ha clavado aquí en is huesos
El dolor con esta angustia y esta pena.
Usted no sabe que se siente perder,
No sabe que se siente caer y caer
En un abismo profundo y sin fe.
Usted se me llevó la vida,
Y aquí me tiene, Como una roca que el océano golpea,
Que ahí está, pero no siente.
Usted no sabe lo importante que fue,
No sabe que su ausencia fue un trago de hiel
Que se ha quedado clavado en mi piel.
Usted no sabe, lo que es el amor
Y el miedo que causa la desolación,
Usted no sabe, que daño causó,
Como ha destrozado a este corazón,
Que tan sólo palpitaba Con el sonido de su voz,
Con el sonido de su voz.
Usted se me llevó la vida,
Todas mis ganas,
Y me ha dejado congelada la razón
Y viva la desesperanza.
Usted no sabe que se siente perder

No sabe que su adios fue morirme de sed,
Que desgarró en este cuerpo su ser.
Usted no sabe de verdad como se ama,
Usted no sabe como he sufrido yo,
Usted es fría,
Y su maldad me hiere el alma,
Usted llenó mi vida, toda de dolor...
Usted no sabe, lo que es el amor
Y el miedo que causa la desolación,
Usted no sabe, que daño causó,
Como ha destrozado a este corazón...

* A cada dia aprendo a amar, não posso agradecer pelas dores e pelas cicatrizes causadas. Sou muito mais do que seus olhos possam ver, peço todos os dias a Deus para te carregar no colo.

“As razões às vezes se perdem no tempo, mas jamais devemos desistir de Amar”.

* Quando aqui cheguei de uma maneira carinhosa fui chamada (Sorriso) e este carinhoso apelido permaneceu por dois anos, obrigado a todos do BNH.....não quero simplesmente passar pela vida, quero mostram pra que vim....

“A felicidade é o seu limite, e o paraíso é você mesmo quem faz”.

* Obrigada a vocês, pessoal da limpeza, do café, aos guardas da portaria, as meninas da secretaria, como já diz o ditado: “Nos menores frascos os melhores perfumes”

“Não se admirem se um dia um beija-flôr invadir

A porta da tua casa te der um beijo e partir...

Fui eu que mandei o beijo, que é pra matar meu desejo

Faz tempo que não lhe vejo..... Ah! que saudade sem fim...”

*Vou agradecer em silêncio, e sempre pedir por vocês onde eu estiver. Obrigada a todos que fizeram presença em minha vida, e que participaram direta ou indiretamente da minha história....

*“São coisas que não se esquece, Só finge que
desconhece Não dá pra esconder verdades sobre o que ficou...”*

* MARIA

“Maria, Maria é um dom, uma certa magia...”

*Pai, Mãe, Paulo, Rafaél, Sabrina, Fernando, Viviane, Magda, Regina, Reinaldo, Chandra, Fernanda, Claudia, Luciane, Vera, Fábio, Gê, Elen, Fabíola, Aline, Márcia, Fernando, Marisa, Rangel, Juliana(s), Fábio, Cristina, Alvim, Raquel, Henrique.....Deus os abençoe.....

“Quem tem um amigo tem um anjo...”.

* Jorge H. F. agradeço por dividir comigo parte do seu conhecimento.

*“Nós também sabemos o quanto a verdade é muitas vezes cruel,
e nos perguntamos se a ilusão não é mais consoladora”.*

* Ana Tereza, Savino, Suse agradeço imensamente o suporte no desenvolvimento desta dissertação, Ernesto obrigada por aceitar ser meu revisor, suas contribuições só me deram mais confiança.

“Onde há dúvida há liberdade”.

*Sou humana como qualquer uma das pessoas que fizeram parte deste trabalho e podem ter certeza, cheia de fraquezas e defeitos.....

“Deus tem um tempo pra agir e pra curar, só é preciso confiar.”

“Já está chegando a hora de ir, venho aqui me despedir e dizer...

Em qualquer lugar por onde eu andar, vou lembrar de vocês.

Só me resta agora dizer adeus e depois o meu caminho seguir.

O meu coração aqui vou deixar não ligue se acaso eu chorar

Mas agora adeus...”

Eu moro em um cenário do lado imaginário, entro e saio quando eu quero...

Esse trabalho se tornou possível com o apoio financeiro da CAPES e o suporte e infra-estrutura do LNCC e LABINFO.

Resumo da Dissertação apresentada ao LNCC/MCT como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

**ESTUDO POR MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DA
INTERAÇÃO DA INTEGRINA ALPHA6BETA1 COM O DOMÍNIO
TIPO-DISINTEGRINA DE ADAM2 E ADAM9 HUMANAS.**

Mônika Aparecida Coronado

Março , 2008

Orientador: Jorge Hernandez Fernandez, Ph.D

A integração entre o citoesqueleto celular e a matriz extracelular mediada pelas integrinas gera a produção de força mecânica sobre a membrana plasmática. Isto permite às células gerar tração durante sua migração e tensão durante o remodelamento da MEC. Várias proteínas com diferentes funções já foram identificadas como ligantes das subunidades α e β das integrinas. O estudo de proteínas capazes de se ligar e interferir na sinalização via integrina, como as tipo-disintegrina e rico em cisteínas presentes nos venenos de serpente e proteínas conhecidas como ADAM (*A Disintegrin And Metaloprotease*), torna-se cada vez mais importante. Assim, o isolamento, a caracterização e a determinação da estrutura de várias disintegrinas oferecem valiosas ferramentas para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos para um vasto número de doenças, sendo excelentes candidatos-protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos que interfiram nas funções celulares moduladas por proteínas de adesão.

Entretanto, as formas como a integrina e a ADAM interagem ainda não foram bem esclarecidas. Neste contexto, este trabalho visa analisar em escala molecular a estrutura da integrina alpha6beta1 e do domínio tipo-disintegrina das ADAMs 2 e 9 humanas, e a forma como estas proteínas interagem, aplicando metodologias de biologia computacional estrutural como modelagem e dinâmica molecular.

Com o objetivo de estudar a interação destas proteínas, modelos estruturais foram construídos por homologia a partir das estruturas 3D de proteínas obtidas por cristalografia de raio-X, e realizaram-se simulações de dinâmica molecular com solvente explícito para as proteínas isoladas e em complexo.

Através do estudo estrutural e funcional pelo método “*in silico*” da integrina $\alpha\beta$ 1 e ADAMs 2 e 9 humanas, e das análises dos resultados das simulações e da flutuação dos resíduos de contato entre as duas proteínas durante a dinâmica molecular, foram desenhados e caracterizados novos candidatos peptídicos para inibição da integrina $\alpha\beta$ 1. Nas simulações da movimentação angular do domínio β -A/Hybrid, visando a possível “ativação” da integrina $\alpha\beta$ 1 através da interação com o domínio tipo-disintegrina de ADAM9 e ligantes peptídicos, obtivemos resultados positivos para os peptídeos A9b e A9e. Este estudo aponta para o desenvolvimento de inibidores protéicos viáveis da integrina $\alpha\beta$ 1 com base nestas estruturas. Nossos resultados ainda comprovam pelas metodologias “*in silico*” a eficácia dos modelos construídos, conseguindo reproduzir o comportamento das proteínas em estudo.

Abstract of Dissertation presented to LNCC/MCT as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Sciences (M.Sc.)

**MOLECULAR MODELING AND DYNAMICS OF HUMAN
ALPHA6BETA1 INTEGRIN AND DISINTEGRIN-LIKE DOMAINS
OF ADAM 2 AND ADAM 9.**

Mônika Aparecida Coronado

March, 2008

Advisor: Jorge Hernandez Fernandez, Ph.D

The production of mechanical force on plasma membrane is mediated by integrins, connecting ECM components and cell cytoskeleton. This allows cells to generate traction during migration and tension during ECM remodeling. Integrins are membrane-spanning adhesion receptors that mediate dynamic linkages between intracellular actin cytoskeleton and the extracellular adhesive matrix, outside-in/inside-out signaling, migration and detachment. Several proteins with different functions have already been identified as integrin ligands, and some important candidates as disintegrin-like and cystein-rich domains present in the snake venom metalloproteinases and ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) become important as they interfere in cell signaling pathways mediated by these transmembrane receptors. Thus, the isolation, characterization and structure determination of disintegrin-like domains offer valuable tools for the development of new therapeutic compounds for a wide range of diseases. These compounds may provide new treatments for diseases such as cancer and inflammation pathologies. However, the mechanisms of ADAM-Integrin interaction have not been well clarified, yet. In this perspective, this study aims to analyze the molecular structure of the alfa6beta1 integrin and the disintegrin-like domain of human ADAM2 and ADAM9. Computational biology methods such as homology modeling and molecular dynamics

were used in order to study the dynamics of the interaction of these proteins.

Using “*in silico*” experimentation, detailed models of human $\alpha 6\beta 1$ and human ADAM 2 and 9 were obtained. Based on these models, the molecular basis of $\alpha 6\beta 1$ -ADAM *dsld* interactions was assessed, and the most important structural components in ligand recognition/discrimination were identified. Using the collected structural information, we designed different small peptide-based inhibitors, based on the structure of the interaction loop of human ADAM 9 disintegrin-like domain. Here proposed A9a inhibitor was tested “*in vitro*”, showing satisfactory results in blocking cell adhesion on specific substrates by $\alpha 6\beta 1$ -laminin affinity inhibition in nanomolar concentrations. Our results also show the efficacy of the constructed models, the power of computational biology tools in new drug-design technologies, and clearly suggest that here presented $\alpha 6\beta 1$ inhibitors are good candidates for further development of new therapeutic agents against inflammation pathologies.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ASPECTOS BIOLÓGICOS	1
1.1.1	Integrinas	2
1.1.2	Aspectos Estruturais das Integrinas	8
1.1.3	Integrinas e Sinalização Celular	9
1.1.4	Sinalização <i>outside-in</i>	15
1.1.5	Sinalização <i>inside-out</i>	16
1.1.6	Integrina Alfa6Beta1	17
1.1.7	Disintegrinas	19
1.1.8	Disintegrina e Metástase	22
1.1.9	Tipo-disintegrina	23
1.1.10	Proteínas ADAM - A Disintegrin and Metalloprotease . . .	24
1.1.11	ADAM2	31
1.1.12	ADAM9	34
1.2	ASPECTOS COMPUTACIONAIS	35
1.2.1	Modelagem de Proteínas por Homologia e Dinâmica Molec- ular de Proteínas	36
2	OBJETIVOS	50
2.1	Objetivos Gerais:	50
2.2	Objetivos Específicos:	50

3	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1	Modelagem Molecular por Homologia	52
3.2	Avaliação dos Modelos	53
3.3	Dinâmica Molecular	53
3.4	Modelagem e Dinâmica Molecular	53
3.4.1	Construção do Modelo da Integrina Alfa6beta1	53
3.4.2	Construção do Modelo da ADAM2 e ADAM9	56
3.4.3	Validação dos Modelos	57
3.4.4	Solvatação e Equilíbrio do Sistema	57
3.5	Modelagem da Interação Alfa6beta1-ADAM	58
3.5.1	Construção do Complexo Formado pela Integrina Alfa6beta1 e ADAM2 <i>dsld</i> e ADAM9 <i>dsld</i>	58
3.5.2	Desenho de Ligantes Peptídicos	58
3.5.3	Construção do Complexo Formado pela Integrina Alfa6beta1- <i>Hybrid</i> com ADAM9 <i>dsld</i> e Peptídeos Inibidores.	59
3.6	Descrição do Ensaio de migração “ <i>in vitro</i> ”	60
3.6.1	Células	60
3.6.2	Tratamento das Células	60
3.6.3	Ensaio de Migração <i>in vitro</i>	60
3.6.4	Análise Estatística	61
4	RESULTADOS e DISCUSSÃO	62
4.1	Construção do Modelo da Integrina Alfa6beta1	62
4.1.1	Identificação e Seleção da Proteína Molde	62
4.1.2	Validação do Modelo	67
4.1.3	Sítios de Reconhecimento de Ligantes	71
4.1.4	Coordenação dos Íons <i>MIDAS</i> , <i>ADMIDAS</i> e <i>LIMBS</i>	71
4.2	Construção do Modelo da ADAM2 e ADAM9	81
4.2.1	Identificação e Seleção da Proteína Molde	81

4.2.2	Estrutura da Arquitetura MDC (Metaloprotease, Disintegrina, Rico em cisteína)	81
4.2.3	Alinhamento das seqüências ADAM2, ADAM9, ADAM23, VAP1 E VAP2	84
4.2.4	Validação do Modelo	86
4.2.5	Análise da Arquitetura Estrutural Proposta para as Proteínas ADAM2 e ADAM9 após Dinâmica de $2ns$	92
4.2.6	Escolha do Domínio ADAM <i>dsl</i> d para Modelagem da Interação de ADAM2 e ADAM9 com a Integrina Alfa6beta1	94
4.3	Modelagem dos Complexos Integrina Alfa6beta1-ADAM2/ADAM9	97
4.3.1	Construção do Modelo de Interação da Integrina Alfa6beta1-ADAM2 <i>dsl</i> d e ADAM9 <i>dsl</i> d	97
4.3.2	Coordenação dos Íons MIDAS, ADMIDAS e LIMBS para o Complexo Alfa6beta1-ADAM2 <i>dsl</i> d	99
4.3.3	Coordenação dos Íons MIDAS, ADMIDAS e LIMBS para o Complexo Alfa6beta1-ADAM9 <i>dsl</i> d	101
4.4	Resultados da Análise da Flutuação, Equilíbrio e Energia de Interação do Complexo Integrina-ADAM <i>dsl</i> d.	104
4.4.1	Análise da Arquitetura Estrutural do Complexo Alfa6beta1-ADAM2 <i>dsl</i> d em $25ns$ de DM	104
4.4.2	Resultados da Análise dos Contatos Integrina Aplha6beta1-ADAM2 <i>dsl</i> d Durante a Dinâmica Molecular.	108
4.4.3	Análise da Arquitetura Estrutural do Complexo Alfa6beta1-ADAM9 <i>dsl</i> d em $25ns$ de Dinâmica Molecular.	109
4.4.4	Resultados da Análise dos Contatos Integrina Aplha6beta1-ADAM9 <i>dsl</i> d Durante a Dinâmica Molecular.	112
4.5	Estrutura de ADAM2 e ADAM9 murinas.	119
4.5.1	Mudança Conformacional da Integrina Alfa6beta1 em Complexo com seus Ligantes.	120

4.6	Coordenação do Íon de Cálcio do Sítio-III das ADAMs.	124
4.7	Resultados Preliminares dos Testes “ <i>in vitro</i> ” dos Inibidores Sintetizados.	127
5	CONCLUSÕES	131
6	PERSPECTIVAS	133
	Referências Bibliográficas	134
	Apêndice	
A	Figuras Representativas	154
B	<i>Scripts</i> de Modelagem Molecular	158
B.1	<i>Malign.py</i>	158
B.2	<i>Model.py</i>	159
B.3	<i>Otimize.py</i>	160

Lista de Figuras

Figura

1.1	Diagrama da Porção Extracelular da Estrutura da Integrina Alfavbeta3.	5
1.2	Esquema das Associações entre as Subunidades Alfa e Beta.	8
1.3	<i>Clustering</i> de Integrinas.	15
1.4	Eventos de Sinalização.	15
1.5	Sinalização Outside-in e Inside-out	18
1.6	Organização das Pontes Dissulfeto entre as Disintegrinas.	22
1.7	Diagrama das SVMPs.	25
1.8	Diagrama da Estrutura Modular da ADAM.	27
1.9	Mecanismo de Produção de IL-6.	35
1.10	Alinhamento entre seqüências <i>Molde</i> e <i>Alvo</i>	39
1.11	Mapa de Ramachandran.	40
1.12	Equação do Campo de Força.	42
1.13	Energia Potencial de Ligação.	43
1.14	Energia Potencial Angular.	43
1.15	Energia Potencial Diedro Impróprio.	44
1.16	Energia Potencial Torcional Impróprio.	45
1.17	Raio de van der Waals.	46
4.1	Diagrama da Estrutura Extracelular da Integrina AlfavBeta3.	63
4.2	Alinhamento das Seqüências de AlfaV, AlfaIIb e Alfa6.	64
4.3	Alinhamento das Seqüência de Beta3 e Beta1.	65
4.4	Representação dos Domínios β -A e β -propeller da Integrina.	66

4.5	Sobreposição da Integrina Alfa6beta1 com AlfaVbeta3.	68
4.6	Alinhamento Estrutural da Integrina Alfa6beta1-Hybrid com AlfaVbeta3-Hybrid.	69
4.7	Estrutura da Interface entre as Cadeias Alfa e Beta da Integrina Alfa6beta1.	69
4.8	Gráfico de Ramachandran Correspondente à Estrutura da “cabeça” da Integrina Alfa6beta1 com o Domínio β - <i>Hybrid</i>	70
4.9	Estrutura da “cabeça” da Integrina Alfa6beta1	72
4.10	Superfície Eletrostática da Integrina Alfa6beta1.	73
4.11	Coordenação dos Íons <i>ADMIDAS</i> , <i>MIDAS</i> e <i>LIMBS</i> na Integrina Alfa6beta3.	74
4.12	Coordenação dos Íons <i>MIDAS</i> , <i>ADMIDAS</i> e <i>LIMBS</i> no Modelo da Alfa6beta1.	76
4.13	Matriz de Clusterização da Integrina Alfa6beta1.	77
4.14	Matriz de Clusterização da Integrina Alfa6beta1- <i>Hybrid</i>	78
4.15	Gráfico de RMSD e Flutuação de Estrutura para Integrina Alfa6beta1.	79
4.16	Gráfico de RMSD e Flutuação da Estrutura para Integrina Alfa6beta1- <i>Hybrid</i>	80
4.17	Arquitetura de uma proteína MDC.	82
4.18	Domínio tipo-disintegrina de VAP-1.	83
4.19	Alinhamento das ADAMs 2, 9, e ADAM23 com VAP1 e VAP2.	85
4.20	Gráfico de Ramachandran e Gráfico de Parâmetros da Cadeia Lateral e Cadeia Principal da ADAM2.	87
4.21	Gráfico de Ramachandran e Gráfico de Parâmetros da Cadeia Lateral e Cadeia Principal da ADAM9.	88
4.22	Diagrama Modular da ADAM9.	89
4.23	Sobreposição da Estrutura da VAP1 e ADAM-Humana.	90
4.24	Comparação do Domínio Tipo-disintegrina (subdomínio Da e Ds) das Proteínas ADAM2, ADAM9 e ADAM23 Humanas e SVMPs VAP1 e VAP2 da Classe PIII.	91
4.25	Matriz de Clusterização da ADAM2.	93
4.26	Matriz de Clusterização da ADAM9.	94
4.27	Gráfico da Flutuação da Estrutura de ADAM2.	95
4.28	Gráfico da Flutuação da Estrutura de ADAM9.	96
4.29	Domínio Tipo-disintegrina de ADAM2 e ADAM9.	98

4.30	Coordenação dos Cátions Divalentes <i>ADMIDAS</i> , <i>MIDAS</i> e <i>LIMBS</i>	102
4.31	Coordenação dos Cátions Divalentes <i>ADMIDAS</i> , <i>MIDAS</i> e <i>LIMBS</i>	103
4.32	Matriz de Clusterização para Integrina Alfa6beta1-ADAM2 <i>dsld</i>	105
4.33	Gráfico de Energia Representando os Potenciais de <i>Lennard-Jones</i> e <i>Coulomb</i>	106
4.34	Gráfico de Flutuação para o Complexo Integrina Alfa6beta1-ADAM2 <i>dsld</i>	107
4.35	Contatos entre ADAM2 <i>dsld</i> e <i>loop</i> SDL da Integrina Alfa6beta1.	110
4.36	Contatos entre ADAM2 <i>dsld</i> e Domínio β -A e β -propeller da Integrina Alfa6beta1.	111
4.37	Clusterização do Complexo Integrina Alfa6beta1-ADAM9 <i>dsld</i>	112
4.38	Gráficos de Energia Representando os Potencial de <i>Lennard-Jones</i> e <i>Coulomb</i>	114
4.39	Gráfico de Flutuação para o Complexo Integrina Alfa6beta1-ADAM9 <i>dsld</i>	115
4.40	Contato entre ADAM9 <i>dsld</i> e Loop SDL da Integrina Alfa6beta1.	116
4.41	Contato entre ADAM9 <i>dsld</i> e Domínio β -A da Integrina Alfa6beta1.	117
4.42	Contato entre ADAM9 <i>dsld</i> e Domínio β -propeller da Integrina Alfa6beta1	118
4.43	Alinhamento entre ADAM2, ADAM9 murino e humana e VAP1.	122
4.44	Esquema Representativo do Sistema Definido para o Estudo do Ângulo de Abertura do Domínio Hybrid em Complexos Integrina-Ligante.	123
4.45	Estruturas Representativas da Determinação da Abertura Angular da Alfa6beta1-Hybrid em Complexo com Diferentes Ligantes.	125
4.46	Coordenação do Cálcio-III	129
4.47	Resultados obtidos " <i>in vitro</i> " para os peptídeos testados em laboratório.	130
A.1	Estrutura Esquemática Multi-domínios das Metaloproteases Zinco-depedentes.	154
A.2	Esquema de Modelagem por Homologia.	155
A.3	Esquema de Dinâmica Molecular.	156
A.4	Esquema representativo da Câmara de <i>Transwell</i>	157

Lista de Tabelas

Tabela

1.1	Ligantes de Integrina	7
1.2	Ligantes do Domínio Citoplasmático	11
1.3	Membros da Família ADAM	32

Lista de Siglas e Abreviaturas

- 3D: Tridimensional
- 2ERP: Cristal da VAP1-obtido do PDB
- 1L5G: Cristal da Integrina alphavbeta3 obtido do PDB
- ADAM: A Disintegrin and Metalloprotease
- ADAMTS: A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin Motifs
- ADMIDAS: Adjacent Metal Ion-Dependent Adhesion Site
- Å: Angstroms
- ALA: Alanina
- ARG: Arginina
- ASN: Asparagina
- ASP: Ácido aspártico
- BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
- CAP: Subdomínio das Integrinas
- Cl⁻: Íon Cloro
- CYS: Cisteína
- CO: Colágeno
- DM: Dinâmica Molecular
- DNA (ou ADN): Ácido Desoxirribonucléico
- EGF: Epidermal Growth Factor
- ERK: Extracellular Regulated Kinase
- FA: Focal Adhesion
- FAK: Focal Adhesion Kinase

- *fs*: Fento segundo
- GLN: Glutamina
- GLU: Ácido glutâmico
- gp = GP: Glicoproteína
- HB-EGF: Heparin Binding-epidermal Growth Factor
- HIS: Histidina
- hOB: Osteoblasto Humano
- ICAM: Intracellular Cell Adhesion Molecule
- ICAP: Integrin Cytoplasmic Associated Protein
- IL-6: Interleucina-6
- ILK: Integrin Linked Kinase
- JAB: Jun Activion Domain Binding Protein
- JNK: Jun N-terminal Kinase
- LEU: Leucina
- LIMBS:Ligand-Induced Metal Binding
- LYS: Lisina
- MAdCAM:Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule
- MAPK: Mitogen Activated Proteins Kinase
- MDC: Metalloproteinase Disintegrin Cystein
- MEC: Matriz Extra Celular
- MET: Metionina
- Mg^{+2} : Íon Magnésio
- MIBDP: Muscle-specific 1-Integrin Binding Protein
- MIDAS:Metal Ion-Dependent Adhesion Site
- MK: Midkine
- Mn^{+2} : Íon Manganês
- Na^{+} : Íon Sódio
- NPT: N=Número de particulas do sistema; P=Pressão: T=Temperatura

- NVT: N=Número de partículas do sistema; V=Volume: T=Temperatura
- *ns*: Nano segundo
- OP: Osteopontina
- PC: Protein Kinase-C
- PDGF: Platelet-derived Growth Fctor
- *ps*: Pico segundo
- PDB: *Protein Data Bank*
- pdf: Função Densidade de Probabilidade
- PHE: Fenilalanina
- PI-3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
- PME: Particle Mesh Ewald
- PRO: Prolina
- RACK: Receptor for Activated Protein Kinase-C
- RMN: Ressonância Magnética Nuclear
- RMSD: Root Mean Square Deviation
- Rx: Raios-X
- SDL: Specificity Determining Loop
- SER: Serina
- SH3: Src Homology 3
- SNP: Sistema Nervoso Periférico
- SPC: *Simple Point Charge*
- SVMP: Snake Venom Metalloproteinase
- S-S: Ligação dissulfídica
- TRP: Triptofano
- TYR: Tirosina
- VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
- VAL: Valina
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

- vWF: Factor von Willebrand
- WAIT=WD: Protein Associated with Integrin Tails

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS

Uma das razões pelas quais a multicelularidade evoluiu tão lentamente pode estar relacionada com a dificuldade em desenvolver os mecanismos de comunicação elaborados de que o organismo pluricelular necessita. Para poder administrar seu próprio comportamento em benefício do organismo como um todo, suas células devem ser capazes de se comunicar entre si de forma complexa.

As células de um animal pluricelular, durante o desenvolvimento, respondem a um conjunto específico de sinais extracelulares produzidos por outras células. Esses sinais atuam em várias combinações para regular o comportamento celular. A maioria dos sinais medeia uma forma de sinalização na qual são secretados intermediários locais que são removidos rapidamente, destruídos ou imobilizados de forma que agem somente nas células vizinhas. Outros sinais permanecem ligados à superfície externa da célula sinalizadora e medeiam sinalização dependente de contato. O controle centralizado é exercido pela sinalização endócrina, na qual os hormônios produzidos pelas células endócrinas são transportados pelo sangue para as células-alvo por todo o corpo e, pela sinalização sináptica, na qual os neurotransmissores, secretados pelas células nervosas, atuam localmente nas células pós-sinápticas.

Independentemente da natureza do sinal, a *célula-alvo* é ativada por meio de uma proteína específica chamada receptor, à qual a molécula sinalizadora se

liga de forma específica, iniciando uma resposta na célula-alvo. Na maioria dos casos, essas moléculas são proteínas transmembrânicas na superfície da célula-alvo. Ao se ligarem a uma molécula sinalizadora extracelular (um *ligante*), esses receptores são ativados e geram uma cascata de sinais intracelulares, que alteram o comportamento da célula. Em outros casos, os receptores são intracelulares e a molécula sinalizadora tem que penetrar na célula-alvo para ativá-los: isso requer que ela seja suficientemente pequena e hidrofóbica para que possa se difundir através da membrana plasmática (Alberts et al., 2002).

A sinalização celular requer, além das moléculas sinalizadoras extracelulares, um conjunto complementar de proteínas receptoras em cada célula que permita a ela responder de uma forma característica, às moléculas sinalizadoras. Algumas moléculas sinalizadoras pequenas e hidrofóbicas, como os hormônios esteróides e tireóides, difundem-se através da membrana plasmática da célula-alvo e ativam receptores intracelulares que regulam diretamente a transcrição de genes específicos. A maioria das moléculas sinalizadoras extracelulares é hidrofílica e ativa os receptores somente na superfície da célula-alvo; esses receptores atuam como transdutores de sinal, convertendo os eventos de ligação extracelular em sinais intracelulares que modificam o comportamento da célula-alvo.

As células-alvo podem usar uma variedade de mecanismos intracelulares para responder abruptamente a aumentos graduais na concentração de um sinal extracelular ou para converter um sinal de curta duração em uma resposta de longa duração. Além disso, eles de modo geral podem, por meio de adaptação, ajustar reversivelmente sua sensibilidade a um sinal para permitir a resposta da célula a alterações na concentração de uma determinada molécula sinal em uma larga escala de concentrações (Alberts et al., 2002).

1.1.1 Integrinas

As células do corpo de qualquer organismo pluricelular mantêm-se unidas entre si e com o material adjacente, ou seja, com a matriz extracelular (MEC). Esta

adesão mantém os tecidos unidos e, portanto, é essencial à sobrevivência. A ligação da matriz celular à célula requer proteínas de adesão celular transmembrana, que atuam como receptores da matriz e conectam a matriz ao citoesqueleto celular (Alberts et al., 2002). Além disso, a ancoragem ao substrato, para células que crescem aderidas, é de fundamental importância para sua sobrevivência e proliferação. Se tal ancoragem é prejudicada ou perdida, as células entram em processo de morte celular programada, ou apoptose. As células provenientes de tumores são capazes de burlar este mecanismo apoptótico e dessa forma podem disseminar o foco tumoral para outras partes do corpo, efeito característico de formação de metástase (Alberts et al., 2002).

As interações entre células ou entre células e a MEC são fatores chave em processos de adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular. Tais interações são mediadas por moléculas específicas, localizadas nas membranas celulares. Várias classes de moléculas de adesão da superfície celular já foram identificadas e caracterizadas. Dentre os principais representantes destas classes de moléculas estão as integrinas (Hynes, 1992a), as caderinas (Petruzzelli et al., 1999), os membros da super família das imunoglobulinas, as selectinas (Plow et al., 2000), as proteoglicanas da superfície celular (Humphries et al., 2003) e as ADAMs (**A Disintegrin and Metaloprotease**)(Albelda et al., 1990).

Os principais receptores de células animais para a ligação da maioria das proteínas de matriz extracelular, incluindo os colágenos, a fibronectina e as lamininas, são as integrinas. As integrinas, como outras moléculas de adesão celular, diferem dos receptores de superfície celular para hormônios e para outras moléculas sinalizadoras solúveis extracelulares, pois elas normalmente interagem com seus ligantes com baixa afinidade. Essas proteínas estão, de modo geral, presentes em concentrações 10 a 100 vezes mais elevadas na superfície celular (Alberts et al., 2002), formando uma classe de moléculas de adesão (Hynes, 1992a; Petruzzelli et al., 1999). Estas interações são cruciais para diversos processos biológicos, tais como diferenciação, migração e proliferação celular, desenvolvimento embrionário, transdução

de sinais, respostas imunológicas, manutenção da estrutura celular, cicatrização de ferimentos e metástase tumoral (Muramatsu et al., 2004; Baker e Hagg, 2007).

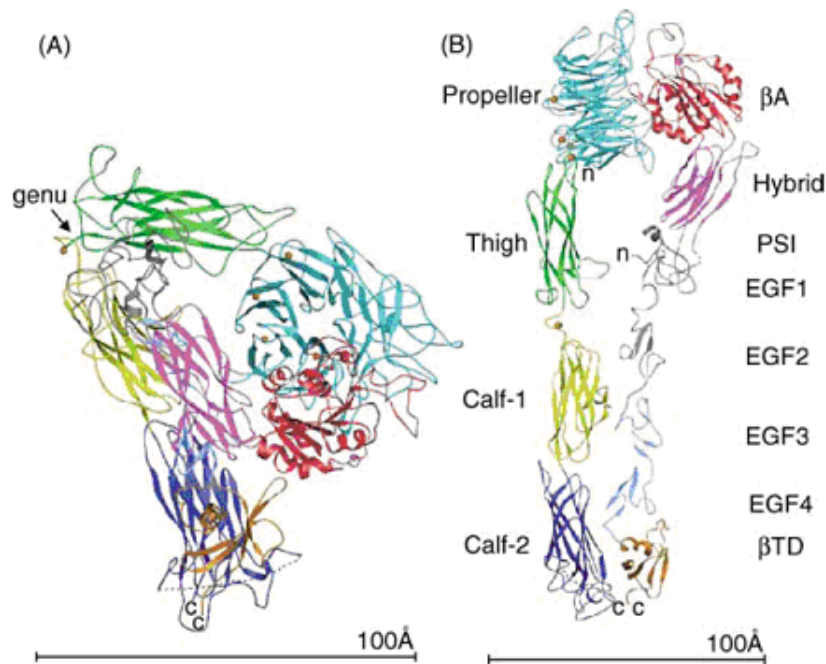
Dentre as proteínas expressas em metazoários, as integrinas são as mais abundantes e constituem uma das famílias mais estudadas e bem descritas. Desde sua descoberta, essa família de proteínas se tornou uma das mais bem conhecidas e estudadas, devido a sua enorme importância como potencial agente terapêutico no tratamento de diversas patologias, como por exemplo, a esclerose múltipla, asma, trombose e alguns processos inflamatórios (Buckley e Simmons, 1997).

O termo *integrina* foi inicialmente proposto para enfatizar a função destes receptores na integração do citoesqueleto celular com a MEC (Hynes et al., 2002). Estruturalmente, as integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas, formadas por uma subunidade α (120 a 180 kDa) e uma subunidade β (90 a 110 kDa) ligadas não covalentemente entre si (Fig.1.1). As subunidades α possuem em seus domínios citoplasmáticos seqüências altamente conservadas (GFFKR), o que poderia estar relacionado a mecanismos de transdução de sinais ou à interação de suas subunidades α e β (Wagner e Wyss, 1994). A associação dos diferentes tipos de subunidades α e β pode formar proteínas com diferentes especificidades de ligação e, conseqüentemente, com diferentes atividades biológicas (Fig.1.2) (Plow et al., 2000; Baker e Hagg, 2007).

A interação das integrinas com seus ligantes depende de cátions divalentes extracelulares (Ca^{2+} ou Mg^{2+}), refletindo a presença de domínios de ligação a cátions divalentes nas porções extracelulares das subunidades α e β . Os tipos de cátions divalentes podem influenciar a afinidade e a especificidade da ligação de uma integrina a seus ligantes (Hynes et al., 2002; Alberts et al., 2002).

Originalmente foram descritas três subunidades β (β_1 , β_2 e β_3), porém, atualmente este número expandiu-se para oito, enquanto que o número de subunidade α chega a dezoito. Até o momento, encontram-se vinte e cinco combinações descritas (Tabela 1.1 e Fig.1.2) (Hynes, 1992a; Humphries et al., 2003; Arnaout, 2002; Baker e Hagg, 2007).

Figura 1.1: Diagrama da Porção Extracelular da Estrutura da Integrina Alfavbeta3.



A-Estrutura inativa - Indicado pela seta, região de flexibilidade; B-Estrutura ativa-Quando estendida a região Genu, a integrina assume a forma estendida, os 12 domínios são classificados. Os domínios PSI, EGF1 e EGF2 não são visualizados (indicados em cinza). Os domínios EGF3 e EGF4 estão sendo usados para mostrar o local aproximado do EGF1 e EGF2. As esferas de metal (em alaranjado) na base do domínio β -propeller, e o íon ADMIDAS (cor magenta) podem ser visualizadas. N e C indicam as extremidades amino e carboxi terminal respectivamente. (Extraída de XIONG et al., 2003)

A grande maioria das integrinas, mas não a sua totalidade, reconhece seqüências Arg-Gly-Asp (RGD) presentes em alguns componentes da matriz, tais como a fibronectina, a vitronectina e o fibrinogênio (Yamada et al., 1991). Algumas integrinas reconhecem seletivamente uma única proteína da MEC, enquanto outras podem se ligar a dois ou mais ligantes. Da mesma forma, as proteínas da MEC podem se ligar a várias integrinas (Albelda et al., 1990; Hynes et al., 2002). A grande maioria das interações mediadas por integrinas são heterotípicas, como por exemplo, a ligação da integrina $\alpha 5 \beta 1$ à fibronectina. Entretanto, podem ocorrer também interações heterofílicas entre integrinas, como a ligação entre as integrinas $\alpha 2 \beta 1$ e $\alpha 3 \beta 1$ (Symington et al., 1993) e interações homofílicas onde a integrina $\alpha 3 \beta 1$ faz ligações entre si para mediar à adesão intercelular (Sriramarao et al.,

1993).

Baseado na sua subunidade β , as integrinas foram classificadas em vários subgrupos (Tabela 1.1). De acordo com esta organização, os subgrupos apresentam certas características fisiológicas semelhantes. As integrinas $\beta 2$, por exemplo, são expressas exclusivamente nos leucócitos e medeiam o recrutamento dos mesmos aos sítios de inflamação (Springer, 1990, 1997). As integrinas $\beta 1$, por sua vez, contribuem para a organização dos tecidos através da ligação de moléculas da MEC com a membrana basal do tecido muscular, epitelial, nervoso e endotelial (Hynes, 1992a; Hynes et al., 2002), através de sua ligação a macromoléculas do tecido conectivo, tais como a fibronectina, o colágeno e a laminina (Green et al., 1998). As Integrinas $\beta 3$ estão envolvidas na adesão de ligantes “vasculares” tais como a fibronectina, o fibrinogênio, a vitronectina, a trombospondina e o fator de von Willebrand (Green et al., 1998; Coppolino e Dedhar, 2000).

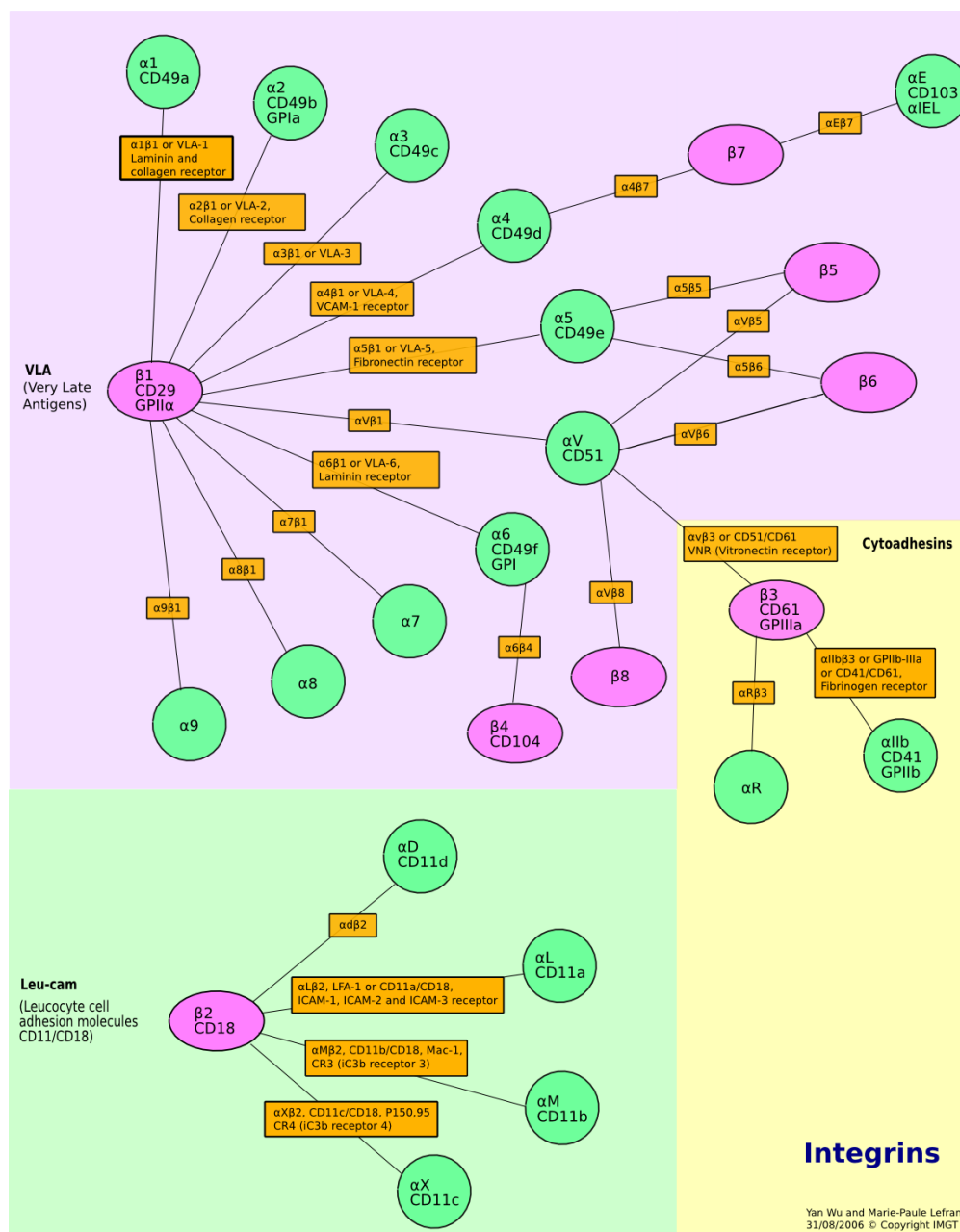
A integrina melhor estudada é a $\alpha \text{IIb} \beta 3$, presente na estrutura das plaquetas. Esta integrina reconhece a seqüência RGD presente no fibrinogênio e medeia a agregação plaquetária (Wagner e Wyss, 1994; Humphries et al., 2003; Jirouskova et al., 2007). A integrina $\alpha \nu \beta 3$ é expressa principalmente nas células endoteliais e possui uma importante função na angiogênese normal e tumoral. A integrina $\alpha 5 \beta 1$ esta amplamente distribuída em uma variedade de células e possui uma função crítica na adesão celular a MEC, bem como na formação de tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário (Hynes, 1999). Os principais ligantes das integrinas pertencem a duas categorias (Hynes, 1992a): moléculas de superfície celular, tais como moléculas de adesão intracelular, ICAMs (*Intracellular cell adhesion molecule*) ou moléculas de adesão celular das mucosas, MAdCAMs (*Mucosal addressin cell adhesion molecule*) (Petruzzelli et al., 1999) e uma variedade de proteínas presentes na MEC, tais como a fibronectina, a vitronectina, o fibrinogênio, o componente iC3b do sistema complemento, entre outros (Tabela 1.1) (Springer, 1990; Sawai et al., 2006).

Tabela 1.1: Ligantes de Integrina

SUBUNIDADE		LIGANTES
$\beta 1$	1	CO - laminina
	2	CO - laminina
	3	CO - laminina, fibronectina, trombospondina
	4	Fibronectina, VCAM-1
	5	Fibronectina
	6	Laminina
	7	Laminina
	8	OP, vitronectina, fibronectina, tenascina
	9	Tenascina, osteopontina, VCAM-1
	10	CO
	11	CO
	x	OP, vitronectina, fibronectina
$\beta 2$	L	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	M	IC3b, fibrinogênio, fator X, ICAM-1
	x	IC3b, fibrinogênio
	D	VCAM-1, ICAMs
$\beta 3$	IIb	Fibrinogênio, fibronectin, vWF, vitronectina, trombospondina, CO
	v	Fibronectina, fibrinogênio, vWF, trombospondina, vitronectina, CO, OP
$\beta 4$	6	Laminina
$\beta 5$	x	Fibronectina, vitronectina
$\beta 6$	x	Fibronectina, tenascina
$\beta 7$	4	Fibronectina, VCAM, MadCAM
	E	Caderina E
$\beta 8$	x	Fibronectina, VCAM-1, laminina, CO

vWF=Fator von Willebrand, VCAMs= Vascular cell adhesion molecule, ICAMs=Intracellular cell adhesion molecule, CO=Colágenos, OP=Osteopontina. Baseada em Petruzzelli et al. (1999).

Figura 1.2: Esquema das Associações entre as Subunidades Alfa e Beta.



Esquema de diferentes associações entre as subunidades alfa e beta. 17 cadeias alfa e 8 cadeias beta tem sido identificadas, a associação entre as cadeias apresenta 25 diferentes integrinas.

1.1.2 Aspectos Estruturais das Integrinas

A partir da estrutura cristalizada da integrina $\alpha \text{v} \beta 3$ foram descritas regiões importantes de adesão ao ligante que estão localizadas nas porções N-terminal das subunidades alfa e beta (Xiong et al., 2002).

Os domínios β -propeller (cadeia alfa) e β -A (cadeia beta) das integrinas

unem-se formando uma estrutura globular, a “cabeça” da integrina.

O motivo *MIDAS* (*Metal Ion-Dependent Adhesion Site*), descrito na literatura como sendo o sítio de adesão ao ligante dependente de íon metal localizado no domínio β -A da cadeia beta, é o íon que diretamente coordena a cadeia lateral de um dos resíduos ácidos em todos os ligantes de integrinas. Contíguo ao sítio *MIDAS*, localizam-se mais dois sítios de ligação metal divalentes, o *ADMIDAS* - (*Adjacent MIDAS*) e o *LIMBS* - (*Ligand-Induced Metal Binding Site*) (Plow et al., 2000; Choi et al., 2003; Chen et al., 2003; Craig et al., 2004).

Segundo Liddington e Bankston (2000), é sugerido que o estado de baixa afinidade de adesão da integrina é mais estável na ausência do ligante, sendo o mesmo caracterizado pela ligação das regiões de contato dos domínios citoplasmáticos e/ou extracelulares das cadeias alfa e beta, adotando assim, a integrina a conformação “T” ou fechada. Já na conformação “R” ou aberta, a ligação entre as subunidades alfa e beta é quebrada para propiciar o estado de alta afinidade de adesão de integrina (Fig.1.1).

1.1.3 Integrinas e Sinalização Celular

A integração, pelas integrinas, entre o citoesqueleto celular e a MEC gera a produção de força mecânica sobre a membrana plasmática. Isto permite às células gerar tração durante sua migração, e tensão durante o remodelamento da MEC (Choquet et al., 1997). A cauda citoplasmática das integrinas é geralmente curta e não apresenta características enzimáticas. Ainda assim, as integrinas são capazes de transduzir sinais, sobretudo devido à presença de proteínas acessórias adaptadoras que as conectam ao citoesqueleto, às quinases citoplasmáticas e aos receptores transmembrana de fatores de crescimento (Liu et al., 2000).

Várias proteínas com diferentes funções já foram identificadas como ligantes do domínio citoplasmático das subunidades α e β das integrinas, sendo que as principais já identificadas estão sumarizadas na tabela 1.2. Estas moléculas acessórias podem ser ativadas sob a ação de estímulos específicos, os quais podem variar de

acordo com o tipo celular e com o próprio estímulo recebido pela célula (Coppolino e Dedhar, 2000; Liu et al., 2000).

Quando as integrinas se ligam às proteínas da MEC, as mesmas se agrupam na base da membrana celular (*clustering* de integrinas) (Fig.1.3) e se associam a um complexo sinalizador que promove a organização dos filamentos de actina em fibras maiores. Esta organização por sua vez promove um maior agrupamento de integrinas, reforçando assim sua ligação à MEC, em um sistema de *feedback* positivo. Como resultado, as proteínas da MEC, as integrinas e as proteínas do citoesqueleto se organizam em agregados em cada lado da membrana, que são denominados adesões focais (Burrige e Chrzanowska-Wodnicka, 1996).

Os locais de adesão focal são aqueles onde as moléculas da matriz extracelular, tais como a laminina ou a fibronectina, interagem com os receptores de matriz da superfície celular, denominados integrinas, as quais estão ligadas à actina do citoesqueleto. A ligação das moléculas da MEC nas integrinas leva à ativação local das proteíno-quinases, incluindo a FAK (*Focal adhesion kinase*), que, por sua vez, leva a ativação da via de sinalização intracelular que pode promover a sobrevivência, o crescimento e a divisão celular (Alberts et al., 2002). As adesões focais são, portanto, sítios formados por complexos de várias moléculas extremamente dinâmicas que promovem a ligação entre as integrinas e o citoesqueleto intracelular (Humphries et al., 2003; Howe et al., 1998; Schwartz e Baron, 1999).

As moléculas presentes nas adesões focais podem apresentar tanto funções estruturais quanto funções sinalizadoras. Exemplos de proteínas localizadas nestes sítios são: α -actina, vinculina, talina, tensina, paxilina, proteínas quinase, quinase de adesão focal (FAK) e proteína quinase C (PC - *Protein kinase C*) (Alberts et al., 2002).

Tabela 1.2: Ligantes do Domínio Citoplasmático

LIGANTE PROTÉICO	SUBUNIDADE DA INTEGRINA
Proteínas que se ligam a actina	
Talina	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$
Filamina	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 7$
-actina	$\beta 1, \beta 2$
F-actina	2
Miosina	$\beta 3$
Skelemina	$\beta 1, \beta 2$
Proteínas sinalizadoras	
ILK	$\beta 1, \beta 3$
FAK	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$
Citoesina-1	$\beta 2$
Citoesina-3	$\beta 2$
Outras Proteínas	
Paxilina	$\beta 1, \beta 3, \beta 4$
Grb2	$\beta 3$
Shc	$\beta 3$
$\beta 3 - endoxina$	$\beta 3$
TAP-20	$\beta 6$
CIB	IIb
Calreticulina	
Calveolina	
Rack1	$\beta 1, \beta 2, \beta 6$
WAIT-1	$\beta 7$
JAB1	$\beta 2$
Melusina	$\beta 1$
MIBP	$\beta 1$
ICAP-1	$\beta 1$
CD98	$\beta 1, \beta 3$
DRAL/FHL2	β

ILK=Integrin linked kinase, FAK=Focal adhesion kinase, WAIT=WD Protein associated with integrin tails, JAB=Jun-activation-domain-binding protein, MIBDP=Muscle-specific 1-integrin-binding protein, ICAP=Integrin cytoplasmic associated protein, RACK = Receptor for activated protein kinase-C. Baseada em Liu et al. (2000).

Devido a sua rica composição, as adesões focais são consideradas por alguns autores como organelas de transdução de sinais (Lo e Chen, 1994).

Nos sítios de adesão focal, a conexão entre citoesqueleto e as integrinas promove a ativação destas últimas, que apresentam mudanças em sua conformação e um aumento em sua especificidade de ligação. Esta habilidade das integrinas em controlar sua afinidade por ligantes é crucial para a adesão celular (Hynes, 1992b; Coppolino e Dedhar, 2000). Depois de ativada, as integrinas podem apresentar um vasto repertório de mecanismos de transdução de sinais, tais como ativação de GTPases que levam a mudanças na organização do citoesqueleto, ativação de vias de sinalização da MAPK (*Mitogen activated proteins kinase*) e ativação de uma variedade de proteínas quinase. A ativação das integrinas pode ainda resultar na liberação de lipídeos como mensageiros secundários e alterar os níveis intracelulares de cálcio e os valores de pH (Laflamme e Auer, 1996).

Um evento inicial durante a sinalização via integrina é a fosforilação da FAK (*Focal adhesion kinase*) (Laflamme e Auer, 1996), um processo ainda não completamente elucidado. A FAK, como o próprio nome diz, é uma tirosina quinase localizada exclusivamente nos sítios de adesão focal e é ativada após a adesão mediada por integrinas. A FAK pode ser recrutada para os sítios de adesão focal por que é capaz de interagir diretamente ou através de proteínas do citoesqueleto como talina e paxilina, com a cauda citoplasmática das subunidades β das integrinas (Chen et al., 1995; Lewis e Schwartz, 1995). Após sua ativação, a FAK auto-fosforila um resíduo de tirosina em sua estrutura, criando um novo sítio de ligação para outras proteínas, que por sua vez fosforilam ainda outras proteínas presentes nas adesões focais. A FAK também se combina e muitas vezes ativam a PI-3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*). Todas estas interações ligam a FAK a vias de sinalização que modificam o citoesqueleto e ativam as cascatas da MAPK (Alberts et al., 2002).

A MAPK compõe uma família de proteínas quinase que fosforilam resíduos específicos de serina e treonina nas proteínas alvo (substrato) e assim regulam ativi-

dades de expressão gênica, mitose, migração, proliferação e morte celular. Sua localização em pontos de convergência de múltiplas vias de sinalização permite que estas proteínas participem na regulação de tais processos celulares (Miyamoto et al., 1996; Lin et al., 1997; Johnson e Lapadat, 2002). Os substratos destas enzimas incluem desde outras proteínas quinase até fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. Assim como seus substratos, as MAPKs também são reguladas por fosforilação e, proteínas fosfatases são capazes de reverter tais fosforilações, tanto de sua própria estrutura, quanto da estrutura de seus substratos. Existem três subfamílias da MAPKs caracterizadas em organismos: (1) subfamília das ERKs (*Extracellular regulated kinase*) (ERK1 e 2), (2) subfamília das JNKs (*jun N-terminal kinases*) (JNK1, 2 e 3) e (3) subfamília das p38 quinases (α , β , γ e δ) (Johnson e Lapadat, 2002). Deste modo, a ativação da FAK mediada por integrinas e a consequente ativação das vias da MAPK, produzem sinais fundamentais para a progressão do ciclo celular, proliferação celular, migração ou morte (Byzova et al., 2000).

As integrinas, contudo, não produzem somente sinais individuais, mas também são necessárias para a ativação de receptores de fatores de crescimento, tais como os receptores para insulina, PDGF (*Platelet-derived growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*) e VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Byzova et al., 2000).

A formação do *clustering* de integrina e suas associações com o citoesqueleto celular parecem dar origem a complexos formados por integrinas e receptores de fatores de crescimento (Miyamoto et al., 1996), que se agregam tornando-se parcialmente ativos (Moro et al., 1998). Em contrapartida, fatores de crescimento como o VEGF, são capazes de ativar integrinas aumentando a capacidade de ligação das células e seus ligantes, bem como a migração celular (Byzova et al., 2000).

Torna-se evidente que as integrinas não representam apenas um grupo de moléculas estruturais da superfície celular, mas, são além disso, proteínas capazes de transmitir sinais, em ambas as direções através da membrana celular. Essas

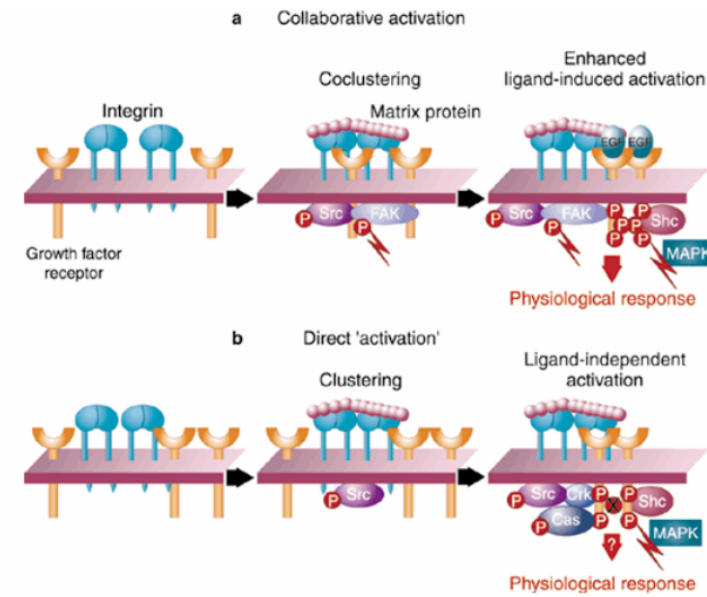
proteínas podem disparar cascatas de sinalização que são vitais para o desenvolvimento normal de processos como morfogênese tecidual, cicatrização de feridas e em processos patológicos como invasão de células tumorais e nas metástases.

Os sinais gerados pelas interações de ligação entre as integrinas e os ligantes são transferidos através da membrana plasmática em uma variedade de vias de sinalização em um processo conhecido como sinalização “*outside-in*” . Por sua vez, reguladores intracelulares via fosforilação reversa das subunidades citoplasmáticas, alteram a afinidade da integrina pelo ligante em um processo chamado sinalização “*inside-out*” . As integrinas exercem um papel adicional, além de serem simples receptores da superfície celular, uma vez que, por intermédio do seu domínio citoplasmático, as mesmas ligam a MEC ao citoesqueleto. A interação da integrina com os componentes da superfície celular proporciona complexos mecanismos moleculares conhecidos como transmissão de sinais bioquímicos, os quais ocorrem num sentido bidirecional, como citado acima. A sinalização *inside-out* e *outside-in* modula a conformação estrutural e a função das integrinas e conseqüentemente, o comportamento biológico celular (Wiesner et al., 2005).

O estudo de proteínas capazes de se ligar e interferir na sinalização via integrina, como as disintegrinas presentes nos venenos de serpente e proteínas conhecidas como ADAM (*A Disintegrin And Metaloprotease*), torna-se cada vez mais importante. Muitas destas proteínas possuem características únicas que as tornam moléculas chave para a compreensão de fenômenos biológicos mediados por integrinas.

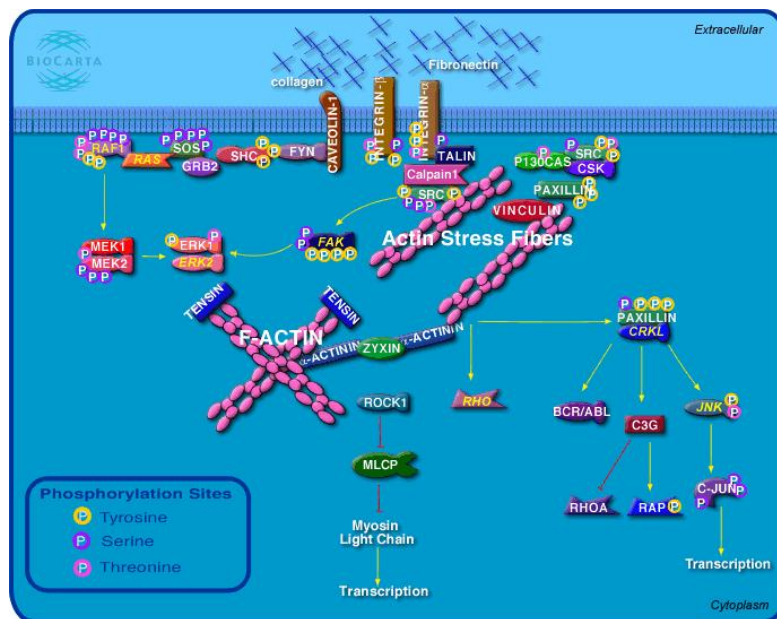
Assim, o isolamento, a caracterização e a determinação da estrutura de várias disintegrinas oferecem valiosas ferramentas para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos para um vasto número de doenças, sendo excelentes candidatos-protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos que interfiram nas funções celulares moduladas por proteínas de adesão.

Figura 1.3: *Clustering* de Integrinas.



Ativação de integrinas. Integrinas induzidas a formação de clustering para sua fosforilação. A ligação das moléculas da matriz nas integrinas leva a ativação da via de sinalização intracelular.

Figura 1.4: Eventos de Sinalização.



Principais eventos de sinalização após a interação de integrinas a seus ligantes na matriz extracelular. Extraído de http://cqap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_pathways.

1.1.4 Sinalização *outside-in*

A ligação do ligante à integrina leva a reunião (*clustering*) desses receptores e a formação de sítios especializados de adesão denominados adesões focais (FAs) (Lo

e Chen, 1994). As FAs asseguram a adesão ao substrato, bem como a localização direcionada do citoesqueleto e dos componentes de sinalização, sendo consideradas organelas de transdução de sinais dependente de adesão (Lo e Chen, 1994; Alberts et al., 2002; Takizawa et al., 2006; Partridge e Marcantonio, 2006).

A FAK (*focal adhesion kinase*) possui papel chave na sinalização mediada por integrinas (Schaller e Parsons, 1994). A ativação da FAK e sua fosforilação dependem da ligação da integrina a seus ligantes (Guan et al., 1991; Kornberg et al., 1992; Schwartz et al., 1995). Quando as integrinas agregam nos locais de contato célula-matriz, a FAK é recrutada das adesões focais por proteínas de ancoramento intracelular, tais como a *talina* e a *paxilina* (Fig. 1.4). A talina se liga a subunidade β da integrina, e a paxilina, se liga a subunidade α da integrina. As moléculas FAK agregadas fazem a fosforilação cruzada umas das outras (reação de catálise) em tirosinas específicas, criando um sítio de interação para os membros da família Src de tirosinas-quinase citoplasmáticas. Estas quinases fosforilam as FAK em tirosinas adicionais, criando sítios de interação para inúmeras proteínas sinalizadoras intracelulares. Elas também fosforilam outras proteínas nas adesões focais. Dessa forma, o sinal é passado adiante na célula (Alberts et al., 2002).

1.1.5 Sinalização *inside-out*

É de vital importância que as integrinas controlem seu estado de ativação de forma que elas se liguem a um ligante de maneira regulada. Para isso, a conversão deve ser controlada nas faces extra e intracelular. Embora a reunião (*clustering*) de receptores de baixa afinidade reforce a avidéz da ligação dos ligantes e a formação de complexos de adesão, muitas evidências sugerem que a aquisição de habilidade para a ligação ao ligante e a ativação da integrina envolvem mudanças conformacionais (Humphries, 2000; Hogg et al., 2002; Humphries et al., 2003).

Os domínios citoplasmáticos das integrinas possuem geralmente menos de 50 aminoácidos, sendo que as seqüências da subunidade β exibem maior homologia entre si do que as subunidades α . Assim, sugere-se que a subunidade β seja o

principal sítio para a ligação de moléculas do citoesqueleto e de sinalização, ao passo que a subunidade α possui um papel regulatório. Tal hipótese sugere que há interação entre os dois domínios citoplasmáticos, o que foi confirmado através de estudos bioquímicos e estruturais (Vinogradova et al., 2002). As regiões próximas à membrana em ambas as subunidades são requeridas para manter as integrinas no estado inativo, já que ocorrem mudanças estruturais principalmente nessas regiões (Hughes et al., 1996).

Sabe-se que a transição das integrinas de um estado de baixa para um de alta afinidade é acompanhada por mudança conformacional na molécula. Análises estruturais mostraram que nas integrinas em estado de baixa afinidade, a região N-terminal de ligação ao ligante do domínio extracelular fica “fechada”, ou seja, voltada para a membrana (Xiong et al., 2001, 2002).

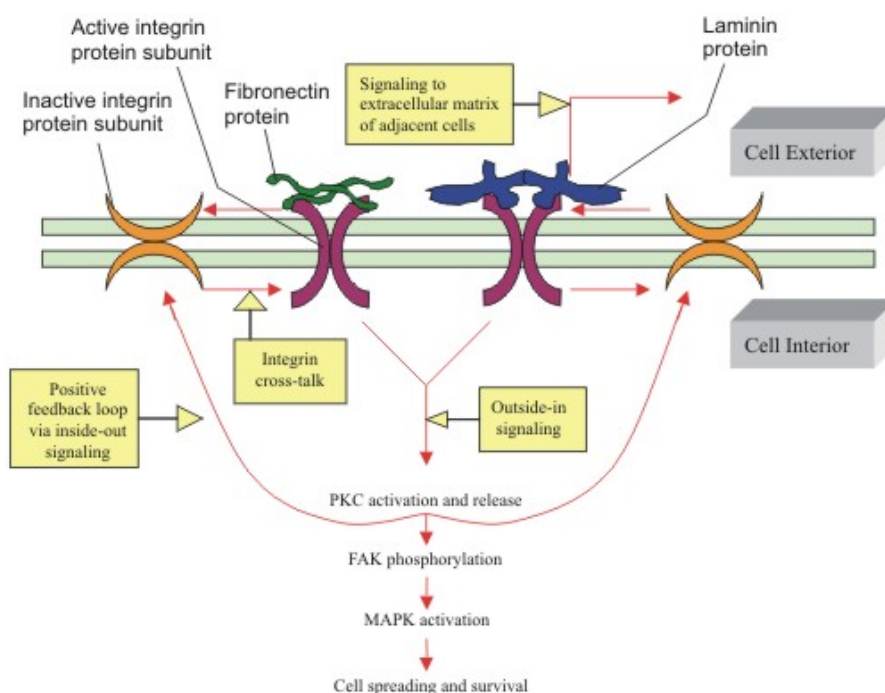
Na ativação da integrina, a região de interação se posiciona de modo a permitir a ligação do ligante (Takagi et al., 2002), desencadeando várias modificações conformacionais sutis na região de ligação da integrina que criam um sítio de alta afinidade ao ligante (Takagi et al., 2002).

1.1.6 Integrina Alfa6Beta1

Integrinas alfa6 podem formar heterodímeros com subunidades de integrinas beta1 e beta4. Ambas funcionam como receptores para família de laminina que são proteínas da matriz extracelular (Chung e Mercurio, 2004). Integrina alfa6beta1 é uma proteína que pode ser expressa em uma ampla variedade de células, incluindo linfócito e célula mesenquimal podendo ser importante em processos inflamatórios. Biologicamente é um importante ligante para fertilin β e meltrin γ , demonstrando que interações com meltrin γ induzem a um estímulo na motilidade de fibroblasto (Nath et al., 2000).

Muitas integrinas contribuem para a progressão de tumores. A integrina alfa6, em particular, têm sido implicada na progressão de câncer de mama (Chung e Mercurio, 2004). O envolvimento dessas integrinas alfa6 nessa patologia foi sug-

Figura 1.5: Sinalização Outside-in e Inside-out



Agrupamento de integrins devido a um estímulo externo com subsequente ativação de PKC e a fosforilação de MAPKs. Esta integrina ativa poderá ativar outras integrinas vizinhas inativas, o que constitui “integrina cross-talk” via sinalização *inside-out*. Esta sinalização *inside-out* promove um feedback positivo, onde mais integrinas são recrutadas para permitir a propagação e crescimento de células, um fenômeno regulado por MAPKs. Nota-se que a fosforilação da FAK é o resultado da ativação da integrina (Extraído de Disatnik e Rando (1999)).

erido pela alta expressão em mulheres com câncer de mama. Além disso, a expressão de integrina alfa6beta1 tem sido associada com a sobrevivência e metástase de carcinomas de mama em humanos (Chung e Mercurio, 2004).

A laminina é um dos muitos potentes promotores do crescimento da neurite (inflamação do SNP) de célula neural em cultura, e a integrina alfa6beta1 está implicada na adesão neural e crescimento da neurite por lamininas (Muramatsu et al., 2004). Foi evidenciado através de estudo *in vitro* que essa integrina é receptor para midkine (MK), fator de crescimento implicado no desenvolvimento de vários tecidos, especialmente tecido neural (Muramatsu et al., 2004).

A integrina alfa6beta1 pode ser facilmente encontrada na superfície dos oócitos de todos os mamíferos, sendo responsável por mediar a adesão entre o espermatozóide e o oócito. Entretanto, como se conhece bem as integrinas são responsáveis pela

tradução de sinais. A união de um ligante espermático na integrina alfa β 1 do oócito pode ser o evento chave que inicia o desenvolvimento embrionário (Hynes, 1992a,b).

O endométrio humano está formado por células de várias linhagens: células do estroma, fibroblastos, células linfóides, endoteliais e musculares lisas dos vasos sanguíneos. O endométrio humano sofre muitas modificações durante o ciclo menstrual como preparação para a implantação do embrião (Tabibzadeh, 1991). De acordo com Klentzeris et al. (1993), muitos estudos confirmam a presença da integrina beta1 no endométrio humano e demonstram que a expressão de integrinas é um processo dinâmico relacionado com o ciclo menstrual. A interação com esses padrões de expressão pode estar associada com certos tipos de infertilidades relacionadas ao sexo feminino.

Segundo Lessey et al. (1994) o padrão de expressão de integrinas na implantação do embrião consiste principalmente em uma modificação da expressão epitelial predominantemente estromal (tecido de sustentação de um órgão). A expressão da integrina beta1 varia durante o ciclo menstrual, sendo máxima na fase secretora. Entretanto, sua expressão no endométrio humano aumenta no momento da implantação. Acredita-se que a expressão de beta1 no endométrio humano seja dependente do hormônio progesterona (Shiokawa et al., 1996).

1.1.7 Disintegrinas

Na década de 80, pesquisadores de Taiwan mostraram que os venenos das serpentes *Trimeresurus gramineus* (Huang et al., 1984; Ouyang e Huang, 1983) e *Agkistrodon rhodostoma* (Huang et al., 1987) contêm peptídeos que são potentes inibidores de agregação plaquetária. Estudos posteriores resultaram na purificação e seqüenciamento da trigramina, de *Trimeresurus gramineus* (Huang et al., 1987) e echistatina, de *Echis carinatus* (Gan et al., 1988). Ambas as proteínas inibiram fortemente a ligação do fibrinogênio a plaquetas ADP-estimuladas por ligação à glicoproteína IIb/IIIa (integrina AphaIIbBeta3) na superfície plaquetária. As dis-

integrinas são proteínas capazes de se ligar as integrinas e interferir de inúmeras maneiras com sua função. O termo disintegrina foi inicialmente proposto em 1989, para descrever um grupo de peptídeos ricos em cisteína e de massa molecular entre 5 e 9KDa, os quais interagem com as integrinas presentes na superfície celular (Gould et al., 1990; Niewiarowski et al., 1994). Estas moléculas foram originalmente descritas em veneno de serpente (SVMP-*Snake Venon Metalloprotease*), como potentes inibidores de agregação plaquetária (Gould et al., 1990; McLane et al., 2004).

As disintegrinas apresentam homologia com proteínas expressas em vários tecidos de mamíferos, as quais possuem funções em muitos processos fisiológicos. Estas proteínas são denominadas ADAMs (*A Disintegrin and Metalloprotease*), para designar a presença, em sua estrutura, dos domínios disintegrina e metaloprotease. As ADAMs são uma família de proteínas da superfície celular as quais combinam características de moléculas de adesão e de protease (Wolfsberg et al., 1995).

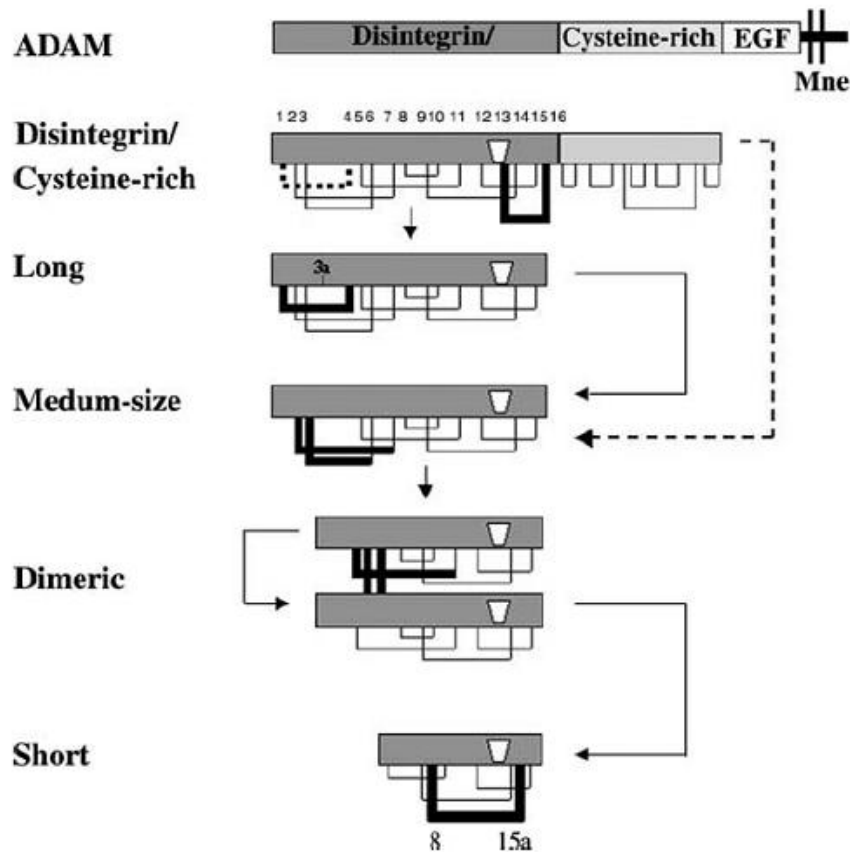
A seqüência de aminoácidos e a organização estrutural das SVMPs (especialmente aquelas contendo um domínio tipo-disintegrina apresentam alta similaridade com as ADAMs citadas anteriormente (Blobel et al., 1992; Weskamp e Blobel, 1994). Uma diferença importante entre estas metaloproteases é que as SVMPs são proteínas secretadas, enquanto que as ADAMs são proteínas transmembranas, apesar de formas solúveis de ADAMs já terem sido descritas (Killar et al., 1999; Loechel et al., 2000). Outra diferença importante entre elas é que as SVMPs são peptidases ativas, enquanto que cerca da metade das ADAMs não apresentam atividade catalítica devido a alteração nas suas seqüências relacionadas com a coordenação ao zinco (Black e White, 1998).

Assim como as SVMPs, as ADAMs são estruturalmente formadas por uma seqüência sinal, um pró-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio disintegrina e uma região rica em cisteína. Além desses domínios, as ADAMs também apresentam domínios *EGF-like*, transmembrana e citoplasmático (Apêndice

A-Fig.A.1)

Com base nas características estruturais das disintegrinas, foram descritas até o momento cinco classes diferentes destas proteínas, de acordo com o tamanho da cadeia polipeptídica e o número de pontes dissulfetos em sua estrutura (Calvete et al., 2005). O primeiro grupo inclui as disintegrinas pequenas formadas por 49-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfetos. Disintegrinas de tamanho médio, com cerca de 70 resíduos de aminoácidos e seis pontes dissulfetos, derivadas das metaloproteases da classe PII correspondem ao segundo grupo. A grande maioria das disintegrinas pertence a esta classe e seus membros possuem a seqüência RGD (disintegrina-RGD). No terceiro grupo estão incluídas as disintegrinas maiores, que são compostas por cerca de 84 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfetos. O quarto grupo das subfamílias das disintegrinas, chamadas tipo-disintegrina, são derivadas da classe PIII das SVMPS. Essas proteínas são formadas por aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e com 16 resíduos de cisteína envolvidos na formação de oito pontes dissulfetos (Calvete et al., 2005). As disintegrinas diméricas (homodímeros ou heterodímeros), diferentemente dos outros grupos monoméricos, apresentam aproximadamente 67 resíduos de aminoácidos cada cadeia, com dez cisteínas envolvidas na formação de quatro pontes dissulfetos intracadeia e duas intercadeias (Calvete et al., 2005)(Fig. 1.6)

Figura 1.6: Organização das Pontes Dissulfeto entre as Disintegrinas.



Esquema da organização das pontes dissulfeto entre as diferentes subfamílias de disintegrinas. A molécula de ADAM apresenta 16 resíduos de cisteína formando 8 pontes dissulfeto (Calvete et al., 2005).

1.1.8 Disintegrina e Metástase

O processo de invasão e metástase é uma complexa cascata de eventos adesivos. As células tumorais apresentam alterações tanto nas adesões célula-célula como nas interações com a MEC. A adesão mediada por integrinas é crucial para a disseminação metastática. Este processo segue as seguintes etapas: (1) angiogênese; (2) disseminação das células tumorais a partir do tumor primário; (3) interação dessas células com plaquetas; (4) adesão das células tumorais ao endotélio vascular e/ou membrana basal sub-endotelial; e (5) proliferação e supressão da apoptose (Zachary e Rozengurt, 1992; Wu et al., 1997).

As células tumorais apresentam modificações na expressão de integrinas e/ou de moléculas relacionadas. A integrina $\alpha 3 \beta 1$ participa ativamente na angiogê-

nese e no crescimento do tumor, e tem sua expressão aumentada em células vasculares como resposta a fatores de crescimento ou a fatores angiogênicos tumorais (Van Waes, 1995). As integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$, também são expressas em maior quantidade sob a ação de fatores de crescimento envolvidos na angiogênese (Senger et al., 1997). Sabe-se que tais integrinas desempenham importante papel na invasão tumoral e na metástase (Zutter et al., 1995).

Durante os processos de invasão e formação de metástase, as células tumorais devem aderir e invadir a membrana basal penetrando no estroma intersticial. Os componentes da superfície das células tumorais desempenham funções importantes fornecendo um conjunto apropriado de receptores adesivos. Um dos eventos adesivos iniciais importantes na formação de metástase é a adesão celular ao endotélio vascular que se retrai e expõe a membrana basal sub-endotelial, a qual possui uma variedade de proteínas adesivas como fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e proteoglicanas (Tarin, 1985; Costa et al., 2004; Duffy et al., 2000). A capacidade de ligação com as integrinas presentes nas células de linhagens tumorais e a consequente inibição da adesão destas células às proteínas presentes na membrana basal faz com que muitas disintegrinas sejam capazes de inibir a formação de metástases (Costa et al., 2005; Chung e Mercurio, 2004).

1.1.9 Tipo-disintegrina

Os domínios tipo-disintegrina podem ser derivados das classes PIII e PIV das SVMPs e nestas proteínas, a seqüência RGD do domínio disintegrina é substituída por outras tais como ECD, KTS, AQD, etc (Calvete et al., 2005). O termo tipo-disintegrina foi introduzido para diferenciar este grupo de proteínas das disintegrinas-RGD. Os domínios tipo-disintegrina possuem dois resíduos cisteína adicionais, quando comparados com as disintegrinas-RGD e, portanto, o arranjo de pontes dissulfetos entre estas proteínas parece ser diferente. Uma hipótese seria a de que uma destas cisteínas estaria envolvida em uma ligação dissulfeto entre a região amino-terminal do domínio tipo-disintegrina e a região carboxi-terminal

do subdomínio Ds. O segundo resíduo cisteína poderia fazer parte de outra ligação dissulfeto com o domínio rico em cisteína. Este arranjo formaria uma estrutura contínua, interconectada por pontes dissulfetos entre a região espaçadora e os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína (*cisteína-rich*). Além disso, a presença do resíduo de cisteína adicional na seqüência ECD tornaria a topologia do domínio tipo-disintegrina nesta área bastante diferente daquela observada nas disintegrinas-RGD (Jia et al., 1997).

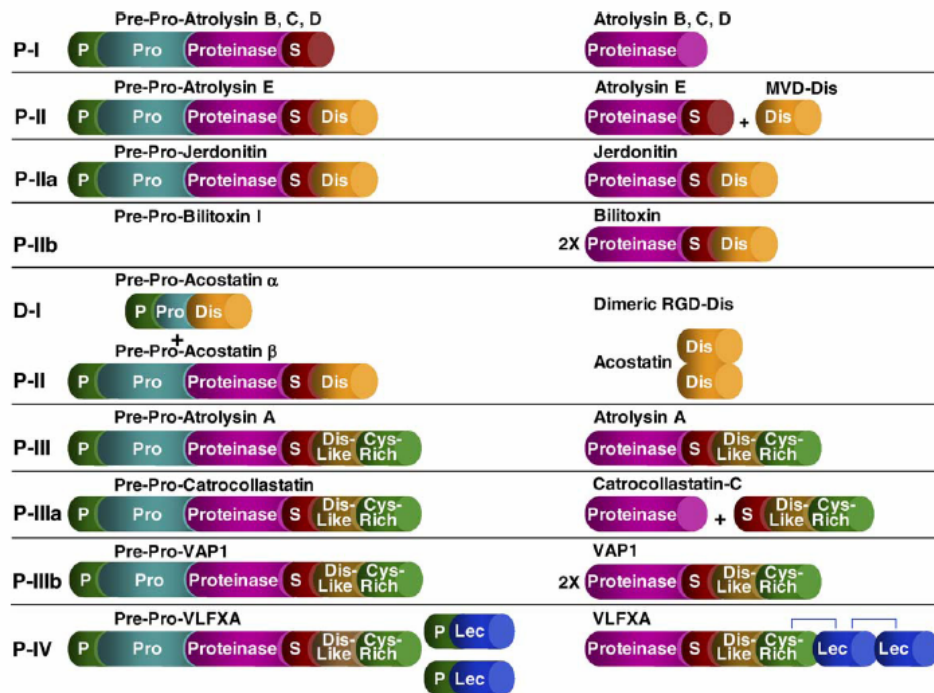
O processamento na região carboxi-terminal do domínio metaloprotease das SVMPs da classe PII gera a liberação de disintegrinas-RGD e o processamento das SVMPs da classe PIII libera os domínios tipo-disintegrinas e rico em cisteína como uma única estrutura. Ambas as disintegrinas formadas desta maneira apresentam atividade inibitória da agregação plaquetária. Além de atuar na inibição de agregação plaquetária, os domínios tipo-disintegrinas também são capazes de se ligar às integrinas presentes na superfície de várias linhagens celulares e desta forma, inibir a adesão a seus ligantes naturais (Moura-Da-Silva et al., 2001; Fox e Serrano, 2005).

Nos venenos, os domínios tipo-disintegrinas são geralmente encontradas na forma não processada, constituindo a classe de maiores toxinas hemorrágicas com massas moleculares entre 50 e 70kDa. Os principais exemplos destas disintegrinas são a atrolisin-A (Hite et al., 1994), a jararagina (Paine et al., 1992), a alternagina (Souza et al., 2000), a catrocolastatina (Zhou et al., 1995) e a bothropasina (Assakura et al., 2003). As formas processadas perdem o domínio catalítico, apresentando somente os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína (Fig.1.7). Exemplos dessas proteínas são a alternagina-C (Souza et al., 2000), a catrocolastatina-C (Shimokawa et al., 1997) e a jararagina-C (Usami et al., 1994)(Fig.1.7).

1.1.10 Proteínas ADAM - A Disintegrin and Metalloprotease

A adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, bem como o remodelamento da matriz pela ação de proteases, são vitais para processos fisiológicos

Figura 1.7: Diagrama das SVMPs.



Esquema das diferentes classes de toxinas de serpente SVMPs (Fox e Serrano, 2005).

como morfogênese tecidual e cicatrização de feridas, e em processos patológicos tais como migração e invasão de células tumorais e metástase. Uma grande variedade de proteínas de adesão e proteases é importante nestes eventos. Uma nova classe de moléculas de adesão tem sido descrita, sendo seus membros conhecidos como disintegrinas celulares - ADAMs (A Disintegrin and Metalloprotease) e as ADAMTS (Jones e Grooms, 1997; Sagane et al., 1998; Schlondorff e Blobel, 1999; Bridges et al., 2005; Yang et al., 2006).

Todas as ADAMs mostram um domínio de organização comum e com quatro funções potenciais: proteólise, adesão, sinalização e fusão (Fig. 1.8). As ADAMs são únicas entre as proteínas de superfície celular, possuindo na mesma molécula domínios estruturais protéicos responsáveis por adesão e proteólise (Black e White, 1998; Sagane et al., 1998; Iba et al., 1999; Smith et al., 2002; Tomczuk et al., 2003). O nome disintegrina deve-se a disruptura da ligação de integrinas, com moléculas da matriz extracelular e de receptores celulares a partir da competição pelo domínio disintegrina presente nas ADAMs (Poindexter et al., 1999).

Todas as ADAMs codificam o domínio metaloprotease que é similar na sequência com as metaloproteases dependentes de zinco, as SVMPs. Todas as SVMPs são ativas proteoliticamente, mas quanto às ADAMs, nem todas possuem atividade proteolítica. O domínio metaloprotease (MP) é uma enzima proteolítica com importante função biológica em seres procariotos e eucariotos, incluindo o homem. Isoladas do veneno de várias serpentes, são importantes objetos de estudo devido à complexidade funcional e estrutural. O domínio metaloprotease das SVMPs contém o sítio ativo consenso com a sequência $\text{HEX}^1\text{HX}^2\text{HX}^3\text{X}^1\text{GX}^1\text{XHD}$ sendo X^1 um resíduo hidrofóbico, X^2 apresenta uma glicina ou um resíduo hidrofóbico e X^3 asparagina (Hite et al., 1994; Kini, 1995; Zhou et al., 1996; Hurskainen et al., 1999; Kini et al., 1997; Jia et al., 2000; Weskamp et al., 2002).

A análise estrutural sugere que as três histidinas presentes ligam-se ao zinco, já a glicina permite uma rotação e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico. O domínio catalítico das ADAMs 1, 8, 9 e 10 contém os resíduos catalíticos das SVMPs e assim são ativas cataliticamente. Já as ADAMs 2, 7, 11, 22 e 23 codificam sequências diferentes neste domínio e apesar de estruturalmente similares, o sítio proteolítico não apresenta atividade (Wolfsberg et al., 1995; Nishiwaki et al., 2000; Takeda et al., 2006).

É interessante enfatizar que o domínio disintegrina e o domínio rico em cisteína da maioria das metaloproteases da classe PIII e PII, é um produto da autoproteólise dessas toxinas. Definidas como peptídeos de baixa massa molecular (8-30 kDa), são estruturas constituídas por uma sequência RGD/ECD que reconhecem integrinas localizadas em todos os tipos de células (Hynes, 1987; Sheu et al., 1994; Tanjoni et al., 2003b,a). A interação e os efeitos biológicos desses domínios envolvem dois mecanismos: 1) direcionamento das metaloproteases a uma célula específica contendo integrinas e 2) bloqueio da ação de ligantes, como por exemplo, colágeno, fibrinogênio e fibronectina (Fox e Serrano, 2005). Todas as SVMPs, mas nem todas as ADAMs possuem no domínio disintegrina um resíduo carregado negativamente (D,E), resíduo este que pode ser crítico para o reconhecimento de

integrina (Wolfsberg et al., 1995; Kratzschmar et al., 1996; Loechel et al., 1998, 1999; Hall e Erickson, 2003).

O domínio de adesão potencial das ADAMs é rico em cisteína, atuando como suposto peptídeo de fusão de membranas celulares (Smith et al., 2002). Estes peptídeos possuem uma superfície hidrofóbica e sua habilidade para esta função deve-se ao seu modelo de α -hélice com faces hidrofóbicas (Wolfsberg et al., 1995). Já a cauda ou domínio citoplasmático é rico em prolina, serina, ácido glutâmico e/ou lisina e pode estar envolvida na oligomerização ou na sinalização (Sagane et al., 1998). Os receptores de um domínio semelhante à EGF, domínio transmembrânico e citoplasmático nas ADAMs sugerem que estas moléculas podem servir como transdutoras de sinal entre o meio extracelular e intracelular via interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Loechel et al., 1998; Roghani et al., 1999; Liu et al., 2000; Jia et al., 2000; Karkkainen et al., 2000; Gaultier et al., 2002).

Figura 1.8: Diagrama da Estrutura Modular da ADAM.

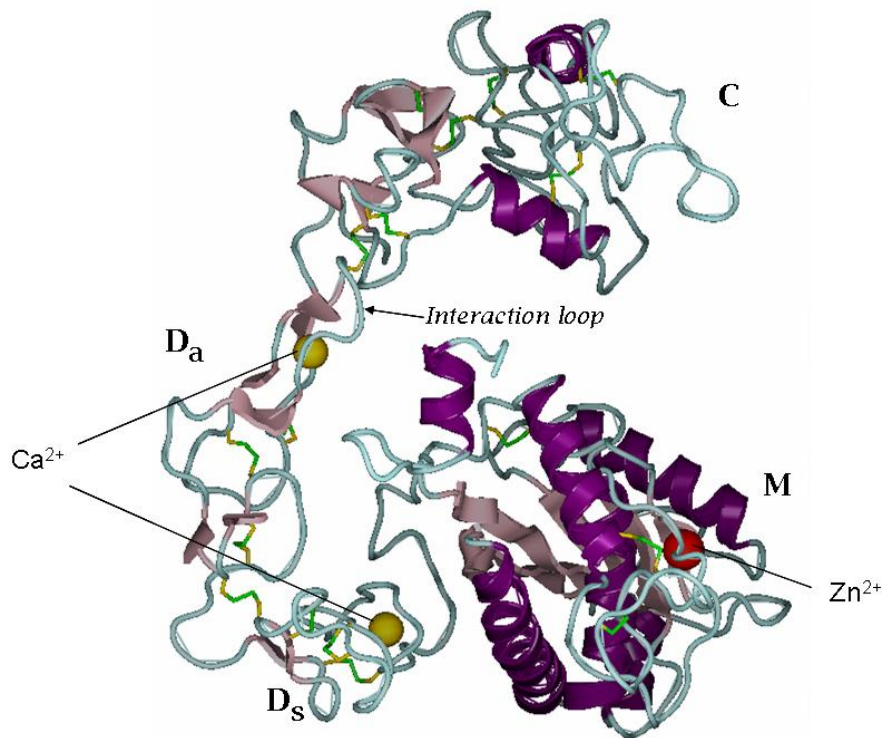


Diagrama da ADAM demonstrando os domínios metaloprotease (M), Tipo-disintegrina (Da - "arm" , Ds - "shoulder"), rico em cisteína (C) e loop reativo. Os íons de cálcio e zinco estão representados pelas cores amarelo e vermelho respectivamente.

A regulação da atividade das ADAMs é um processo complexo. Somente algumas ADAMs são metaloproteases potencialmente ativas, e nem todas apresentam propriedades de adesão. Transcrição de mRNAs de ADAMs são modulados temporal e posicionalmente. Exemplificando este caso, alguns mRNAs de ADAMs são específicos dos testículos, enquanto outros são conhecidos em uma variedade de tecidos (Werb, 1997). As ADAMs 1 e 4 mostram padronização idêntica de distribuição tecidual, evidenciando que estas podem ser complexas em alguns tipos celulares (Wolfsberg et al., 1995; Sagane et al., 1998; Ham et al., 2002; Zhu et al., 2003).

Até o momento 34 ADAMs com o domínio transmembrânico foram clonadas e seqüenciadas. ADAMs TS não estão ancoradas à membrana celular e contêm um motivo trombospondina adicional (Black e White, 1998; Bevitt et al., 2003; Porter et al., 2004). Metaloproteases do tipo ADAMTS estão envolvidas em processos de desenvolvimento ou em processos patológicos envolvendo remodelagem da matriz extracelular.

As primeiras ADAMs foram identificadas em porquinhos da índia conhecidas como *fertilin* α e β , mas estas tem sido caracterizadas em uma variedade de tecidos de mamíferos como também em outros organismos, por exemplo, em *Xenopus*, *C. elegans* e *Drosophila melanogaster* (Wolfsberg et al., 1995; Evans et al., 1997). Isto sugere que esta classe de proteínas é muito importante em células biologicamente normais e que toxinas como, por exemplo, as SVMPs são uma variação adaptativa de um produto celular normal. Já foi demonstrado que o domínio disintegrina das fertilinas esta envolvido na ligação do espermatozóide ao óvulo pela interação com a integrina $\alpha 6 \beta 1$ (Liu et al., 2000; Rybnikova et al., 2002; Seals e Courtneidge, 2003; White, 2003).

ADAM31 é preferencialmente expressa em células de Leydig (secreta o hormônio sexual masculino *testosterona*) nos testículos. Sua função não está relacionada à espermatogênese, mas sugere-se que esteja relacionada como suporte da função testicular. Interessantemente, a ADAM31 é também expressa em 4 tipos de

epitélio especializado: vasos deferentes, células parietais do estômago, região caudal do epidídimo e nos túbulos contorcidos renais. ADAM31 apresenta a seqüência consenso do domínio metaloprotease, indicando que também exerce a atividade proteolítica. Em relação à presença dessas ADAMs nestes epitélios especializados, sua função pode ser associada com a estabilização e manutenção de gradientes iônicos e de nutrientes nestas células epiteliais (Liu e Smith, 2000).

Algumas ADAMs possuem expressão generalizada como a ADAM9, ADAM10, ADAM15 e ADAM17, já muitas outras ADAMs tem mostrado expressão tecidual específica: ADAM1 e ADAM19 no músculo, ADAM22 no cérebro e ADAM23 no cérebro e coração (Gilpin et al., 1998; Zhang et al., 1998; Cerretti et al., 1999; Weskamp et al., 2002). Um grande grupo de ADAMs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29 e 30) são predominantemente expressas em testículos e assim envolvidas na fertilização e espermatogênese (Yuan et al., 1997; Choi et al., 2003).

ADAM10, é expressa no cérebro humano adulto, principalmente no tálamo, cerebelo, medula espinhal e córtex cerebral. ADAM17 foi detectada somente no hipocampo. Isso mostra que algumas ADAMs possuem distribuição ubíqua no SNC enquanto outras possuem um padrão de expressão restrito (Wu et al., 1997; Karkkainen et al., 2000; Weskamp et al., 2002). MADAM (*Mammalian ADAM10*) pode também degradar proteína básica mielínica (Groome et al., 1988; Howard et al., 1996; Gill et al., 2003; Hu e Shelver, 2003).

Em vertebrados ADAM12 (*meltrin α*), 13 e 19 (*meltrin β*) são ADAMs bem caracterizadas, expressas no desenvolvimento primordial, inicialmente pelo mesênquima. ADAM13 é expressa no neuroectoderma e algumas células da crista neural em embriões de *Xenopus*, parecendo agir na remodelação da matriz extracelular durante migração de células da crista neural (Cai et al., 1998). ADAM19 de camundongo é expressa em gânglios derivados das células da crista neural e cornos ventrais da medula espinhal durante neurogênese (Zhou et al., 2004). Foi demonstrado que essa proteína possui uma variante conhecida como mini meltrin β , caracterizada também pela presença do domínio disintegrina e metaloprotease.

Estudo *in vitro* sugere que esta nova isoforma de meltrin β tem papel no processo de diferenciação neuronal especialmente na neuritogênese (Kurisaki et al., 2002).

ADAM 8 tem sido descrita como uma glicoproteína expressa no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, predominantemente em neurônios e oligodendrócitos, e tendo portanto funções essenciais nas interações neurônio-glia (Schlommann et al., 2000).

Em adição, a cauda citoplasmática de muitas ADAMs contém 3 seqüências homólogas de sítios de ligação, sugerindo que podem interagir com moléculas de sinalização intracelular e com o citoesqueleto (Howard et al., 1996; Zhou et al., 1996).

A cauda citoplasmática da família das ADAMs é altamente variável, tanto em comprimento como em seqüência. Este domínio contém motivos especializados, que têm sido postulados como sendo envolvidos na regulação *inside-out* na ativação da metaloprotease, e regulação *outside-in* da sinalização celular, e/ou o controle da maturação e localização subcelular. Os motivos mais comuns são sítios de ligação PXXP para proteínas que contém domínio SH3. Várias ADAMs possuem potenciais sítios de fosforilação para serino-treonina e/ou tirosina kinase (Seals e Courtneidge, 2003).

Estudos referentes a esta família caracterizaram um novo membro denominado de ADAM23/MDC3. Esta disintegrina exibe a típica estrutura dos membros da família, sendo predominantemente expressa tanto em cérebro adulto quanto fetal, sugerindo que a mesma possa funcionar como ligante de integrina em células de origem neural. Foi demonstrado, que este processo é mediado pela interação específica entre a integrina $\alpha v\beta 3$ e uma pequena seqüência de aminoácidos na alça da disintegrina ADAM23 (Cal et al., 2000). Interessantemente tal interação é independente do domínio RGD, sugerindo que outra seqüência da ADAM seja responsável pela ligação integrina $\alpha v\beta 3$ -ADAM23. Adesão máxima foi detectada na presença de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Mn^{+2} em concentrações fisiológicas, mas não na presença de Ca^{+2} . Células aderentes a substratos recobertos

por ADAM23 recombinante exibem diferenças na morfologia quando comparadas com outras proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina. Estas diferenças incluem a presença de numerosas e pequenas protusões microscópicas nas células em crescimento, bem como uma distinta organização de filamentos de actina (Cal et al., 2000; Sun et al., 2004).

ADAM23 possui um pequeno domínio transmembrânico hidrofóbico e 8 sítios potencialmente glicosilados (N-ligados). A comparação de MDC3/ADAM23 com outras disintegrinas celulares revelam uma seqüência similar de 52,2% com ADAM11, 33% com ADAM12, 30,9% com MDC9, 30,1% com MDC15 e 30% com outras ADAMs (Sagane et al., 1998).

Membros da família das proteínas ADAMs podem ser visualizados na tabela 1.3 com os tecidos onde são expressas.

1.1.11 ADAM2

A proteína ADAM2, também conhecida como fertilin β , é uma molécula de adesão celular presente na superfície do espermatozoides de mamíferos que participa da adesão célula-gameta durante a fertilização, sendo uma das proteínas da família ADAM mais bem caracterizada. Em sua seqüência esta contido um domínio tipo-disintegrina que apresenta um motivo consenso XX(D/E) ECD altamente conservado no loop de interação, sendo um importante ligante para integrinas $\alpha\beta$ 1. Este loop de interação está igualmente presente nas ADAM9 e ADAM23, sendo uma seqüência mínima de reconhecimento. Baseado nas informações sobre diferentes subfamílias de integrinas e seus ligantes encontradas na literatura, um resíduo carregado negativamente (Asp/Glu) demonstra ser de extrema importância para o reconhecimento da integrina (Eto et al., 2002; Zhu e Evans, 2002).

Poucas integrinas presentes na superfície dos óvulos têm sido propostas para servir como receptor para fertilin β (Zhu e Evans, 2002). Pela razão da ADAM2 ser proteoliticamente inativa, e ambos os domínios prodomínio e metaloprotease são clivados anteriormente para a regulação da fertilização (Seals e Courtneidge, 2003)

Tabela 1.3: Membros da Família ADAM

ADAMs	CARACTERÍSTICAS
ADAM 1 Fertilin -	Espermatogenesis e fertilização
ADAM 2 Fertilin - β	Fertilização; ligante de integrina 6 β 1
ADAM 3 - 7	Fertilização
ADAM 8	Formação de osteoclastos
ADAM 9, MDC 9 ou Meltrin - γ	Miogenesis
ADAM 10	Neurogenesis
ADAM 11	Supressor tumoral em câncer de mama
ADAM 12 ou Meltrin -	Fusão de mioblastos; osteogenesis
ADAM 13	Migração da crista neural
ADAM 14	Expressado em esperma (<i>C.elegans</i>)
ADAM 15	Ligante de integrina α v β 3, α 5 β 1, α 9 β 1
ADAM 16	Fertilização; Espermatogenesis
ADAM17 ou TACE	Shedding de TNF-alfa
ADAM 18	Expressa em esperma
ADAM 19 ou Meltrin- β	Biogenesis; diferenciação osteoblástica
ADAM 20 - 21	Espermatogenesis
ADAM 22 - 23	Expressa no cérebro
ADAM 24 - 26	Expressa em testículos
ADAM 28	Expressa em linfócitos
ADAM 29	Específica de testículos
ADAM 30	Específica de testículos
ADAM 33	Gera suscetibilidade a asma
ADAM 34	Específica de testículos

Características e tecidos onde são expressas várias proteínas ADAMs.

o papel para atividade de protease na fertilização pode ter a regulação excluída. Alternativamente, a adesão do espermatozoide e do óvulo requer o domínio disintegrina da ADAM2. Este tem sido claramente demonstrado para o uso de inibidores peptídicos sintéticos específicos para este domínio. ADAM2 apresenta uma seqüência ECD no loop disintegrina. Mutação do ECD para ECA demonstra ser um bom inibidor de ligação ao óvulo (Seals e Courtneidge, 2003). Primeiramente foi sugerido que integrina $\alpha 6 \beta 1$ é um receptor para ADAM2 (Almeida et al., 1995), devido ao fato de que o domínio tipo-disintegrina bloquear a habilidade de ligação de anticorpos $\alpha 6$ (Seals e Courtneidge, 2003).

ADAM2 é uma glicoproteína essencial para o processo de fertilização de murino. Vários estudos têm mostrado que peptídeos análogos ao loops disintegrina de ADAM2 de cobaias, ratos e humanos, inibem a ligação e fusão espermatozoide-óvulo *in vitro* (Bigler et al., 2000). A seqüência do *loop* disintegrina de ADAM2 murino é (CRLAQDECDVTEYC); na seqüência os resíduos sublinhados são absolutamente conservados entre todas as ADAM2 ortólogas conhecidas, e o sexto resíduo do loop é geralmente (em cinco de sete seqüências) um resíduo carregado negativamente (**D** ou **E**). Dado o conhecimento sobre os resíduos críticos em disintegrina da classe PII das SVMPs, foi predito que os resíduos do meio do *loop* disintegrina (QDECD), sejam extremamente importantes (Bigler et al., 2000).

Gupta et al. (1996) observaram que um bom inibidor de ligação óvulo-espermatozoide requer no mínimo um dos resíduos ácidos adjacentes conservados (D ou E) juntamente com a cisteína conservada em um estado reduzido na seqüência de ligação (D/E)ECD para *fertilin* β . É demonstrado que um cátion divalente poderia ser coordenado simultaneamente com o motivo de ligação ECD e o sítio ativo da integrina com o resíduo ácido procedente de um grupo de coordenação do cátion. Este requisito expõe a observação que um resíduo ácido é decisivo para ligação de integrinas durante a fertilização (Bigler et al., 2000).

1.1.12 ADAM9

A proteína ADAM9 também é conhecida como MDC9/Meltrin γ . De acordo com métodos experimentais sugere-se que meltrin γ interage com integrinas renais (Mahimkar et al., 2005). Estudos histoquímicos indicam que esta proteína está presente em todos os componentes do néfron, células do epitélio tubular renal. Meltrin γ apresenta interação com integrinas da classe $\beta 1$, incluindo $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ e αv . A interação entre o domínio tipo-disintegrina de meltrin γ -integrina $\beta 1$ esta relaciona com a disruptura da interação com colágeno I e IV ($\alpha 1\beta 1$), laminina ($\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$) e vitronectina ($\alpha v\beta 1$). Por outro lado observou-se ligação do domínio tipo-disintegrina de meltrin γ com fibronectina ($\alpha 5\beta 1$) (Mahimkar et al., 2005). Um outro estudo demonstra a importância desta proteína na interação com fibroblastos via integrina $\alpha 6\beta 1$ (Karadag et al., 2006).

Mieloma múltiplo é uma doença caracterizada pelo crescimento de células malignas no plasma dentro da medula óssea. O crescimento e sobrevivência dessas células são regulados pela interação entre células tumorais e células do ambiente, particularmente medula óssea e osteoblasto. Meltrin γ esta envolvida na regulação célula-célula entre células mielóides e células da medula óssea via integrina $\alpha v\beta 5$. Solução recombinante de meltrin γ pode promover o aumento da produção de interleucina-6 (IL-6) de osteoblastos humanos (hOBs), mas em contrário o domínio tipo-disintegrina dessa proteína demonstra ser ineficiente para promover o aumento de IL-6 de células do mieloma humano (Karadag et al., 2006)(KARADAG et al., 2006).

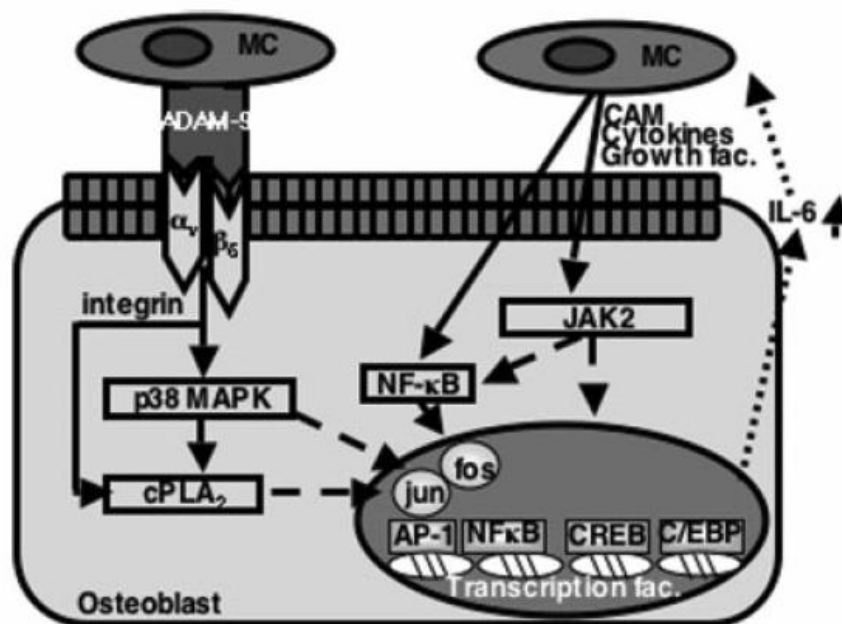
Células do mieloma e a proteína ADAM9 interagem com integrina alfaVbeta5 de hOBs podendo promover a produção de IL-6, demonstrando que a interação entre ADAM9 e alfaVbeta5 são importantes na regulação da produção de IL-6 em osteoblasto via p38 MAPK (*Mitogen activated proteins kinase*)(Fig. 1.9).

Seqüências dos aminoácidos de meltrin γ são altamente conservadas entre humanos e camundongos, demonstrando 82% de identidade. A interação dessa proteína com integrina $\alpha 6\beta 1$ estimula a indução da motilidade de fibroblastos

e está envolvida no pós-processamento (*shedding*) de HB-EGF (*heparin binding-epidermal growth factor*) de células epiteliais.

Meltrin γ apresenta uma extensa cauda citoplasmática com motivos de ligação SH3 (*Src homolog 3*) (Nath et al., 2000). O domínio SH3 é amplamente distribuído entre kinase e outras proteínas de sinalização intracelular e reconhece a seqüência PXXP (Donaldson et al., 2002). SH3 é um pequeno domínio de interação proteína-proteína que liga seqüências ricas em prolina e medeia uma larga escala de sinalização celular e outros processos biológicos importantes. O domínio SH3 foi considerado alvo atrativo para o desenvolvimento de produtos terapêuticos (Nath et al., 2000; Donaldson et al., 2002).

Figura 1.9: Mecanismo de Produção de IL-6.



Mecanismo de produção de IL-6 de osteoblasto em mieloma múltiplo mediado por ADAM9. MC- células do mieloma expressa ADAM9, com interações diretas com integrina alfaVbeta5 para indução da produção de IL-6 via p38 MAPK e cPLA2.

1.2 ASPECTOS COMPUTACIONAIS

Um dos mais importantes exercícios da ciência computacional é a modelagem, ou seja, gerar uma representação mais simplificada de um sistema complexo. Um

modelo ajuda a visualizar melhor certas características de um sistema. As ferramentas da bioinformática ajudam os pesquisadores a extrair informações relevantes de um sistema biológico.

Os pesquisadores encontram propriedades importantes e úteis desde os padrões de seqüência até a separação de átomos em estruturas moleculares, e têm aplicado essas descobertas para produzir ferramentas como localizadores de genes, ferramentas de predição de estrutura secundária e ferramentas de modelagem por homologia, entre outras.

1.2.1 Modelagem de Proteínas por Homologia e Dinâmica Molecular de Proteínas

A computação vem atingindo um importante papel em diversas áreas de pesquisa e ciência, a ponto de poder se acrescentar à área de pesquisa o termo experimentação “*in silico*”.

Uma das grandes esperanças no campo das ciências biomédicas nas próximas décadas está, sem dúvida, centrada nos Projetos “Genoma”. Um dos grandes desafios será a elucidação da estrutura molecular de novos alvos, principalmente proteínas, enzimas e receptores de membrana. Novas drogas serão desenvolvidas a partir dos dados provenientes do genoma humano e de outros genomas. Estas estruturas são a base da revolução na área estrutural biológica, para a compreensão de fenômenos como catálise, sinalização celular, fosforilação, etc.

A partir desse contexto, novos esforços têm sido realizados em todo o mundo, por instituições governamentais e privadas, no sentido de determinar o maior número possível de estruturas tridimensionais (terciária e quaternária) de novas proteínas. As técnicas para elucidação de estrutura protéica são hoje consideráveis [cristalografia de raio-X, difração de nêutrons e ressonância magnética nuclear (RMN)].

Obtenção de amostras em quantidade suficiente para ensaios necessários é difícil e os cristais obtidos nem sempre têm a qualidade necessária para o trabalho

experimental. Além disso, a determinação estrutural em proteínas de membrana celular é um desafio. Estas proteínas raramente cristalizam e dificilmente podem ser tratadas de modo satisfatório por RMN.

O rápido aumento no número de estruturas 3D disponíveis em banco de dados como o PDB (*Protein Data Bank*) (Berman et al., 2000), levou à criação de uma sub-disciplina da bioinformática: a bioinformática estrutural. O principal foco desta sub-disciplina é a representação, armazenamento, recuperação, análise e visualização da informação estrutural em níveis atômicos. Assim, a predição de estruturas de proteínas permanece uma área de grande interesse, sendo que a principal categoria de predições tem sido a modelagem por homologia, também conhecida por modelagem comparativa (*“comparative protein modeling”*). Essa metodologia é baseada na homologia de uma seqüência protéica pela seqüência de uma proteína com estrutura conhecida experimentalmente (Sanchez e Sali, 1997).

1.2.1.1 Modelagem Molecular por Homologia

A modelagem molecular por homologia é uma técnica de desenvolvimento de modelos tridimensionais que parte de uma seqüência conhecida de uma proteína cuja estrutura tridimensional é indeterminada e utiliza como molde uma ou mais seqüências de proteínas cujas estruturas tridimensionais já foram resolvidas, e que possuem alta similaridade com a molécula de interesse (Sanchez e Sali, 1998).

O método de modelagem por homologia baseia-se em alguns padrões gerais:

1 - Identidade/similaridade entre seqüências de aminoácidos, podendo refletir em semelhança estrutural e funcional;

2 - Proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas;

3 - Diferenças estruturais entre proteínas homólogas tendem a ocorrer nas regiões constituídas pelas alças (*loops*), que ligam os elementos de estrutura secundária.

O processo de modelagem pode ser dividido em 4 etapas (Apêndice A Fig.A.2

A - Busca por *molde* - A primeira etapa do método é a identificação de pelo

menos uma proteína de estrutura tridimensional conhecida, que servirá de molde para a determinação da estrutura da proteína-problema. Esta busca é realizada em bancos de dados de estrutura tridimensional de proteínas, sendo o principal deles o PDB (*Protein Data Bank*) (Berman et al., 2000). O principal parâmetro para determinar os moldes é a porcentagem de identidade entre a seqüência do *molde* e a seqüência da proteína que será modelada.

B - Alinhamento das seqüências - Definido o molde, passa-se então para a etapa de alinhamento da seqüência-problema com a seqüência-molde. O objetivo desse processo consiste em alinhar resíduos estruturalmente equivalentes levando em conta características fisicoquímicas comuns, e outros elementos tais como estrutura secundária, resíduos catalíticos e resíduos de cisteína. Nesse processo ocorrem espaços chamados *gaps*, representados no alinhamento por linhas tracejadas, que geralmente correspondem às regiões ausentes em uma das seqüências. Através do alinhamento é possível identificar regiões estruturalmente conservadas (regiões de máxima similaridade) e regiões variáveis (principalmente *loops*) (Fig.2.1).

C - Modelagem - após realizada a busca e seleção do *molde*, e concluída a etapa de alinhamento, será realizada então a etapa de modelagem propriamente dita. Nesse procedimento o programa escolhido para essa etapa irá receber como entrada o arquivo contendo as seqüências alinhadas e o arquivo contendo as coordenadas tridimensionais do *molde*. Dessa forma será construída a estrutura tridimensional da proteína-problema baseado nas coordenadas tridimensionais do molde.

D - Analisando o modelo - depois de concluída a modelagem o próximo passo será fazer a análise da estrutura gerada. Esta análise consiste em estudar as posições atômicas dos modelos de modo que se possa determinar a qualidade estereoquímica do modelo da proteína modelada. Para que se possa avaliar a qualidade estereoquímica de uma estrutura podem-se analisar os ângulos ψ (psi) e ϕ (phi) da cadeia principal. Estes ângulos são importantes para se definir a qualidade estereoquímica de uma estrutura de proteína, de modo que os ângulos *phi* e *psi* sejam respeitados, ou seja, em regiões permitidas e não permitidas (Fig.2.2).

Figura 1.10: Alinhamento entre seqüências *Molde* e *Alvo*.

```

Q99965_ADAM 1 M-----WRVLFLLSGLG-----GIRMD-----SN
075077_ADA 1 MKPPGSSSRQ PPLAGCSLAGASCGPORGPA GSVPA SAPARTPPCRLLLVLLLPPLAASSRPPRANGAAAPSA PHWNETAEKNLGVLADEDNTLQQSSSN
consensus 1 *.....** ** *.....* . *.....**

Q99965_ADAM 20 F---DSIPVQITVPEKRSIIRKEGIES-----QASVKTIVIEGKPTVWVLLQKMLPHNFRVYSYSGTGIMKLDQDFQNFCHY
075077_ADA 101 ISYNAIQKEITLPSRIIYYINQDSSESPYHVLDTKARHQQHKMAVHLAQA SFOEAFCSKLIIDLLNQLLS SDYVEIHYENG--KQYSGGEGHCYV
consensus 101 ... . **.* .. * **.....***. * * . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Q99965_ADAM 95 QCYIEGYPKSVVMVSTCTGLRGV LQFNVSVGLEP L-----ESVWGFEHVIYQV---KHKKADVSDIYNEADIESRDLSEKIQ-----SWEVQ QDF--
075077_ADA 199 HCSRIRGVKSRKVALSTCMGLHGFEDDTFVYMIETLELVHDEKSTGRPHITIKTLAGQYSKQMKVITMERGDQWPLLS-ELQWLKRRRRAVMPSSRGITFE
consensus 201 * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Q99965_ADAM 177 AKYIEHIVVEQLVWVHGS DTTVVAIKVFQDGLITNAITV-SFVITLILSSEELIIDENKIATITGEANEILHITLDRMKTSLVLRPHDVAFLIYREKS
075077_ADA 298 IKYIEHLVWDEKTYKQHRGSHAHTNIFAKSVWVLDVSHIKRQLMTRVWLVAVETVTEKDDIITVNPVQLLEPSKYRQR---LRQHADAVHLISR---
consensus 301 **.* . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Q99965_ADAM 276 NYVCAITQGRMCDAMVAGGVVLEPRITISIE-----SLAVVILAQLLSLSNGITVYDDIN--KQCC--SGAVYIMNPEATHPSGWHIFSNVCSFEDFAHFLS
075077_ADA 392 ---VTHYERSSLSYFGGVCSITRSGVWVYGLPLAVAQVLSLSLAQMLGLIQMPPSSRKPQDCITESWGGCINHEETGVSHS--RKSFKCSILEVRDQLQ
consensus 401 .... ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Q99965_ADAM 365 QKSOCTIHWQPRIDPFRKQAVCGNAKIEAGEECDCGTEQDICALHGETCCDIATRFKACSNCAAGPCCEN--CLVMSIERMCRPSFECDPEYCMGS
075077_ADA 486 GGGACILFRP--TKLEPTE-CGNVYIEAGEECDCGFHVQYGH---CG--KRCSLSNCAHSGGPPCCNNTSCLIQPQCYEGRDAVMECDITEYCTGDS
consensus 501 . ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Q99965_ADAM 463 SCPEMHHYVITGHPGLNWNICLDVWVCGKQCTDTRCKEVEFGPSECYSLNPKTDVSGNCCI SDSGYIQCEADMQCCKLLCKYVGRFLQLIPRATI
075077_ADA 578 QCCPPLHKQDGYAENQMGGRVMEFCRDRDMQCQYIITKAAGSDKFCYELNNEGTEKGNCKDGDRIQLSKHDFCFELCTN---LTRAPRIGQ
consensus 601 . ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

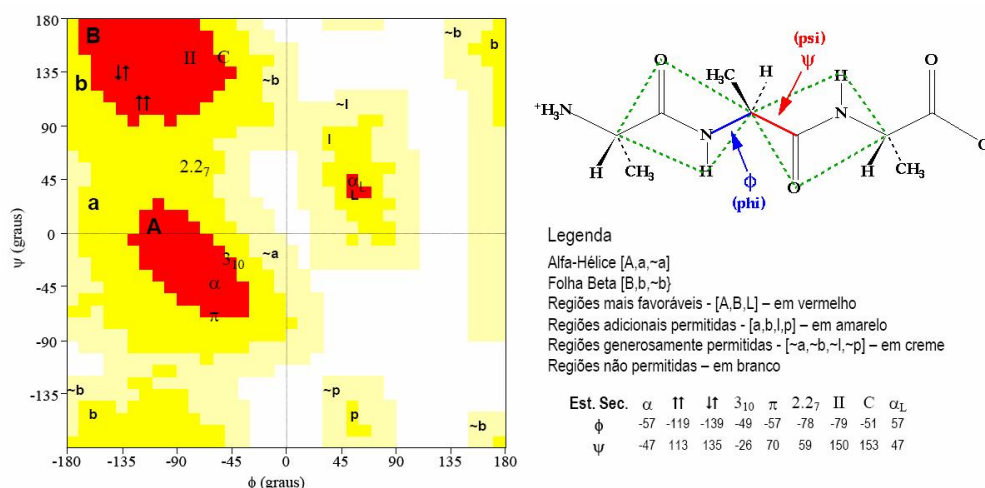
```

Representação de um alinhamento entre a seqüência molde e a seqüência problema. Em preto são representados os resíduos idênticos entre as seqüências, em cinza resíduos que apresentam semelhança físico-química. Linhas tracejadas são as regiões conhecidas como gaps.

O programa conhecido como MODELLER (Sali, 2001), é comumente utilizado para modelagem molecular por homologia. O programa PROCHECK (Laskowski et al., 1996) realiza a etapa de análise do modelo, gerando entre outras análises o mapa de Ramachandran da proteína modelada. Este mapa representa a posição dos resíduos da proteína de acordo com os ângulos ϕ e ψ , em regiões permitidas e não permitidas (Fig. 2.2).

No MODELLER as restrições espaciais baseadas em homologia não são as únicas restrições aplicadas ao modelo. Um campo de força para controlar a estereoquímica apropriada também é aplicado para que a estrutura do modelo não possa violar as regras que satisfazem as restrições espaciais derivadas do *molde*. Todas as restrições químicas e espaciais aplicadas ao modelo são combinadas em uma função (função objetiva) que é minimizada no curso do processo de construção dos modelos. Assim, quanto maior for o número de modelos construídos, maior será a chance de se obter melhores modelos (Sali, 2001).

Figura 1.11: Mapa de Ramachandran.



Mapa de Ramachandran, demonstrando as regiões permitidas (vermelha/amarelo). Dados os ângulos phi e psi de cada resíduo de uma seqüência peptídica é possível identificar regiões de estrutura secundária, bem como violações de resíduos em regiões não permitidas.

1.2.1.2 Dinâmica Molecular

A técnica de Dinâmica Molecular (DM), atualmente aumenta grandemente a possibilidade no avanço da compreensão de processos biológicos em escala atômica e molecular, pois é conhecido que a função biológica de uma molécula é decorrente diretamente de sua conformação tridimensional.

Através da técnica de simulação do movimento de partículas em um sistema, obtêm-se as flutuações das posições relativas dos átomos de uma determinada proteína em função do tempo. A partir desse conhecimento podem-se obter resultados da estrutura tridimensional de uma molécula como também fazer inferências sobre a possível função biológica (Karplus e Petsko, 1990).

A técnica de DM utiliza a física clássica, ou seja, Leis de Newton, potencial de Hooke e eletromagnetismo clássico. Um sistema seria descrito mais exatamente pela resolução quanto-mecânica do problema para cada geometria, mas devido ao elevado número de átomos das macromoléculas biológicas e as limitações computacionais, requerem a sua representação física através de uma função potencial relativa simples, que descreve de forma clássica a interação entre os átomos. Denomina-se Campo de Força à descrição de um sistema de muitas partículas pela

sobreposição de termos simples, que descrevem a interação entre duas, três, quatro ou mais partículas. Para o tratamento de centenas ou milhares de átomos, como por exemplo proteínas, são introduzidas funções potenciais empíricas, calibradas por informações experimentais e cálculos quânticos sobre pequenas moléculas (Gunsteren e Berendsen, 1987). Aceito que equações de dinâmica clássica são adequadas para o estudo de macromoléculas biológicas elas podem, portanto, ser especificadas em termos de posições e momentos dos átomos que constituem o sistema.

Vários conjuntos de parâmetros para campos de forças estão estabelecidos, tais como, CHARMM (Brooks et al., 1983), AMBER (Weiner e Kollman, 1986), GROMOS (Gunsteren e Berendsen, 1987), OPLS/AA (Jorgensen et al., 1996) entre outros.

Na simulação de DM, as forças que atuam sobre cada átomo são obtidas calculando-se o gradiente da função de energia em relação às posições desses átomos. A partir dessas forças resolve-se a equação do movimento para descrever como as posições atômicas variam com o tempo. A cada passo de dinâmica as forças são então reavaliadas. A função para a energia potencial deve ser complexa o suficiente para uma análise precisa e realística da estrutura e da dinâmica do sistema e, ao mesmo tempo, simples o suficiente para que os cálculos sejam efetuados com rapidez e baixo custo computacional.

Enfatizando os termos da equação do campo de força (Fig.2.3), ele pode ser dividido da seguinte forma:

A - quatro termos para átomos ditos ligados (até terceiros vizinhos);

B - dois termos para interações de átomos não diretamente ligados (do terceiro vizinho e além).

1.2.1.3 Energia Potencial de Ligação

A temperatura ambiente, os comprimentos das ligações químicas oscilam próximos ao seu valor de equilíbrio, obedecendo a uma função potencial aproxi-

Figura 1.12: Equação do Campo de Força.

$$E = E_b + E_\theta + E_\phi + E_\omega + E_{vdW} + E_{el}$$

Energia

potencial de ligação: $E_b = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_b} k_{bn} (r_n - r_{on})^2$

potencial de ligação angular: $E_\theta = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\theta} k_{\theta n} (\theta_n - \theta_{on})^2$

potencial torcional imprópria: $E_\omega = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_\omega} k_{\omega n} (\omega_n - \omega_{on})^2$

potencial diedro angular: $E_\phi = \sum_{n=1}^{N_\phi} k_{\phi n} [1 + \cos(m_n \phi_n - \delta_n)]$

potencial de Lennard-Jones: $E_{vdW} = \sum_{i < j}^{N^*} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right)$

potencial electrostática: $E_{el} = \sum_{i < j}^{N^*} q_i q_j / 4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}$

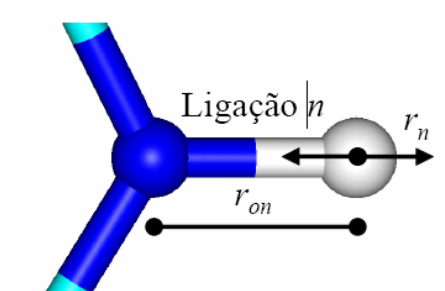
Equação do campo de força, discriminando os diferentes termos de potencial.

mada à de Hooke para um sistema de massas. Por meio de um potencial harmônico envolvendo a interação entre dois átomos ligados covalentemente, ocorreria o movimento vibracional entre pares de átomos.

$$Eb = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_b} K_{bn} (r_n - r_{0n})^2 \quad (1.1)$$

A equação 1.1 N_b descreve o número total de pares de átomos ligados e para cada par são definidos os valores específicos em que K_{bn} é a constante de força específica (constante de Hooke associada a ligação química específica), r_n é a distância, ou seja, o comprimento da ligação química r_n e r_{on} é o parâmetro que define o comprimento de equilíbrio da ligação.

Figura 1.13: Energia Potencial de Ligação.



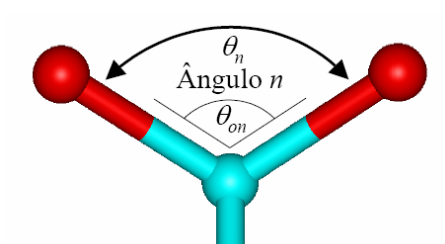
1.2.1.4 Energia Potencial Angular

Por meio de um potencial harmônico, correspondente pela interação angular, onde envolve três átomos e duas ligações químicas.

$$E_{\theta} = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_{\theta}} K_{\theta n} (\theta_n - \theta_{0n})^2 \quad (1.2)$$

Em que N_{θ} é o número total de trios de átomos ligados, $K_{\theta n}$ a constante de Hooke para a restrição do ângulo de equilíbrio, θ_{0n} é o parâmetro que define o ângulo de equilíbrio entre as duas ligações químicas e θ_n é o comprimento da ligação química, variação angular.

Figura 1.14: Energia Potencial Angular.



Energia Potencial Angular para o termo de átomos ligados, cujo ângulo entre eles varia harmonicamente.

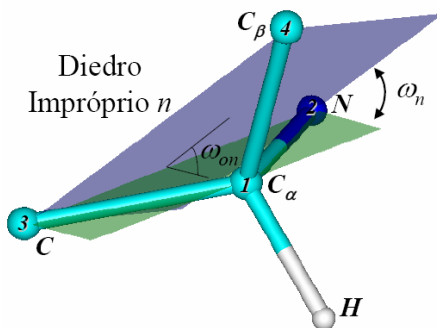
1.2.1.5 Energia Potencial Torcional Impróprio

Chamado também de diedro impróprio, envolve quatro átomos não ligados seqüencialmente, apresentando um carbono central ligado aos outros três. Mantém a estrutura tetraédrica do carbono alfa, a planaridade dos átomos de hidrogênio em relação ao anel benzênico, a planaridade da ligação peptídica, entre outros.

$$E_{\omega} = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_{\omega}} K_{\omega n} (\omega_n - \omega_{0n})^2 \quad (1.3)$$

Em que N_{ω} é o número total do grupo de quatro átomos envolvidos em diedrais impróprios, $K_{\omega n}$ é a constante de Hooke para a restituição do ângulo de equilíbrio, ω_{0n} é o parâmetro que define o ângulo de equilíbrio entre os dois planos e ω_n sua variação angular.

Figura 1.15: Energia Potencial Diedro Impróprio.



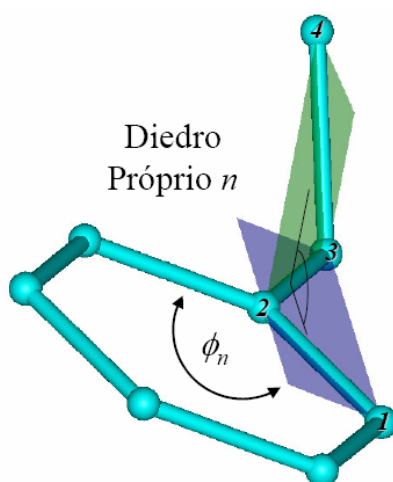
1.2.1.6 Energia Potencial Torcional Próprio

Conhecido também como diedro próprio, o termo torcional representa a energia potencial de rotação em torno de uma ligação química específica. É formado por quatro átomos em seqüência, cujos três primeiros formariam um plano em ângulo diedro com o plano formado pelos últimos três, de tal forma que este ângulo esteja viável a assumir posições preferenciais em função de sua multiplicidade.

$$E_{\phi} = \sum_{n=1}^{N_{\phi}} K[1 + \cos(m_n \cdot \phi_n - \delta_n)] \quad (1.4)$$

onde, m_n número de mínimos para a torção de uma ligação química específica, $K_{\phi n}$ é a constante que define a altura da barreira de rotação, ϕ_n variação diedro angular e δ_n é a defasagem no ângulo diedral, sua diferença de fase que pode ser 0° ou 180° .

Figura 1.16: Energia Potencial Torcional Impróprio.



1.2.1.7 Energia de van der Waals

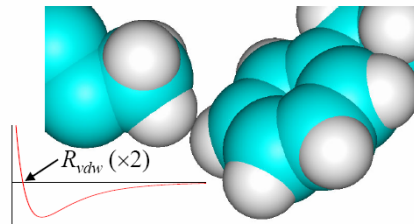
As interações entre átomos não ligados covalentemente podem ser tratadas por potenciais efetivos, compostos por termos de curto e longo alcance que incluem a repulsão das nuvens eletrônicas, a atração de van der Waals e o termo eletrostático de Coulomb. Quando não há reações químicas, duas moléculas separadas interagem entre si obedecendo a potenciais desse tipo. O termo (r^{-6}) do potencial de Lennard-Jones é o modelo mais frequentemente usado em DM para a representação da interação de van der Waals. Como descrito anteriormente é um potencial de curto alcance (unidade de Å) com um termo repulsivo em virtude do princípio de exclusão de Pauli (o qual diz que dois elétrons não podem

compartilhar os mesmos números quânticos), e um atrativo derivado das forças de dispersão, conhecidas também como forças de London, que surgem a partir de pequenos dipolos oscilantes criados pela flutuação da nuvem eletrônica.

$$E(vdW) = \sum_{i \leq k}^{N_{\text{átomos}}} - \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 + \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} \quad (1.5)$$

Para um dado átomo i onde é computada sua energia de interação com os átomos j , em um total de N^* , pois são excluídos seus primeiros e segundos vizinhos ligados que são tratados pelos potenciais anteriores. Para os terceiros vizinhos parâmetros menores no potencial de Lennard-Jones são considerados. Os parâmetros A_{ij} e B_{ij} são dependentes dos tipos de pares de átomos e r_{ij} é a distância entre eles.

Figura 1.17: Raio de van der Waals.



Representação atômica usando-se raio de van der Waals e superfície de van der Waals.

1.2.1.8 Energia Potencial Eletrostática

Quando uma ligação química covalente é formada entre dois átomos diferentes os elétrons que a constituem poderão se deslocar preferencialmente sobre um dos átomos devido às diferentes eletronegatividades. Como consequência a maioria das ligações covalentes são pequenos dipolos elétricos, cuja magnitude dependerá da diferença em eletronegatividade dos átomos que a compõem, por exemplo, os átomos mais abundantes em biomoléculas C, H, O e N. A disposição desses átomos no esqueleto peptídico, contribui para uma distribuição de cargas parciais bastante significativas para a estabilização das estruturas secundárias nas proteínas. Isto se

dá devido à formação de pontes de hidrogênio (C=O—H-N) entre várias partes do esqueleto peptídico na ausência de água. Em superfícies expostas ao solvente aquoso, as pontes de hidrogênio podem ser formadas com a própria água. Portanto na definição dos parâmetros de carga para átomos segundo um campo de forças, valores de cargas parciais são-lhes atribuídos, de forma a se tentar reproduzir a diferença de eletronegatividade que eventualmente existe entre dois átomos ligados covalentemente ou não.

$$E(el) = \sum_{i \leq j}^{N_{\text{átomos}}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (1.6)$$

Na equação acima, q_i e q_j são cargas parciais atômicas, cuja distância entre eles é r_{ij} , ϵ_0 a permissividade do espaço livre, ϵ a constante dielétrica do meio e, para um determinado átomo i , N^* é o número restante de átomos j . Entretanto o mais usual em DM é aplicar-se um raio de corte (Rc), ou seja, dado um átomo i a partir do qual se demarca uma esfera de raio Rc , toma-se para cálculo de interação eletrostática e de van der Waals somente os átomos não ligados contidos nessa esfera.

Conforme descrito acima, os termos para energia potencial combinados compõem a equação do Campo de Forças (Fig.2.3).

1.2.1.9 Otimização Molecular

Calculando-se a energia para diversos valores de coordenadas de um dado sistema molecular dependendo do campo de força a qual está submetido, pode-se explorar a superfície de energia potencial para o mesmo. Dependendo das dimensões e características do sistema, a superfície apresentará um grande número de mínimos locais de energia, que correspondem a pontos no espaço de configurações onde todas as forças sobre os átomos do sistema são balanceadas. Devido ao elevado número de graus de liberdade das macromoléculas biológicas, uma exploração completa da superfície multidimensional de energia é praticamente impossível. Uma

maneira de explorar tal superfície se dá pela minimização da energia potencial molecular.

A otimização da geometria é uma técnica que visa encontrar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema de interesse. O procedimento básico consiste em caminhar sobre a superfície de potencial na direção em que a energia decresce de maneira que o sistema é levado a um mínimo de energia local próximo. Geralmente a configuração final, após esse processo, não difere muito da inicial. A minimização da energia faz uso somente de uma pequena parte do espaço de configurações. Porém pelos ajustes nas posições atômicas, ela relaxa as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de van der Waals.

Os métodos gradientes mais importantes são *Steepest-Descent*, o gradiente conjugado, o de Newton-Raphson e o método de Newton truncado. Faremos um breve relato sobre os métodos *Steepest-Descents* e gradiente conjugado.

Algoritmo “*steepest-descent*” – minimização de energia

O método “*steepest-descent*” (Wiberg, 1965), é um método de primeira derivada, que converge lentamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo de energia. Com este algoritmo é possível construir pequenas moléculas, como aminoácidos, a partir de coordenadas atômicas aleatórias com relativamente poucos passos de otimização e posteriormente conectá-los para formar cadeias peptídicas. De um modo geral, com o algoritmo “*steepest-descent*” é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou construir estruturas a partir de informações de NMR ou por homologia a estruturas conhecidas.

Métodos de Gradientes Conjugados

Um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função de energia, além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo é denominada de “Gradientes Conjugados”. Este método permite, em geral, uma mais rápida convergência que o método

“*steepest-descent*”, que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. O método dos gradientes conjugados utiliza para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior.

1.2.1.10 Parâmetros de Simulação

Durante a simulação, alguns parâmetros macroscópicos podem ser mantidos constantes em conjuntos como NPT e NVT. Onde N é o número de partículas do sistema, P é a pressão, V o volume e T a temperatura. Cada um destes conjuntos de parâmetros caracteriza *ensembles* diferentes e definem uma equação de estado para o sistema, de modo a permitir que diferentes funções termodinâmicas possam ser mais convenientemente calculadas em um ou em outro *ensemble*.

Um *ensemble* é, portanto, um conjunto de replicas de um sistema de interesse que diferem entre si nas atribuições das coordenadas e do momento das partículas. Entre os parâmetros livres a serem escolhidos temos, por exemplo, o campo de força, que podem ser, GROMOS, OPLS, CHARMM, AMBER, etc.

No esquema (Apêndice-A/FigA.1) pode se verificar as etapas para simulação de dinâmica molecular.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares de ativação, seletividade, dinâmica estrutural e reconhecimento de ligantes de integrinas, sendo a integrina alfa6beta responsável pela rejeição de órgãos transplantados, é a proteína alvo do nosso grupo de pesquisa. Dentro deste contexto se insere o objetivo deste estudo, que é o de promover o conhecimento através de um estudo da influência de diferentes interações relacionadas à proteína integrina alfa6beta1, através da técnica de dinâmica molecular. Estudar e compreender através de métodos *in silico* o mecanismo de interação entre a integrina alfa6beta1 com o domínio tipo-disintegrina das proteínas ADAM2 e ADAM9 humanas e o desenho e análise de peptídeos específicos para inibição da integrina em estudo.

2.2 Objetivos Específicos:

1 - Modelagem molecular por homologia dos domínios β -propeller da cadeia alfa6 e domínio β -A-*Hybrid* da cadeia beta1 da integrina alfa6beta1.

2 - Modelagem por homologia das proteínas ADAM2 e ADAM9.

3 - Modelagem do complexo integrina alfa6beta1/ADAM2 e integrina alfa6beta1-ADAM9(dsld-tipo-disintegrina).

4 - Simulação de dinâmica molecular para compreensão dos processos moleculares de reconhecimento no complexo.

5 - Determinação de quais resíduos de aminoácidos participam do processo de interação entre as cadeias do complexo em estudo.

6 - Estudo de peptídeos específicos para inibição da integrina alfa6beta1.

7 - Comparação dos resultados de interação obtidos “*in silico*” com resultados “*in vitro*” para os peptídeos desenhados.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Métodos Computacionais

3.1 Modelagem Molecular por Homologia

A estrutura primária de uma proteína determina sua estrutura tridimensional. Contudo o algoritmo que permita, com precisão absoluta, determinar a estrutura tridimensional de uma proteína partindo da sua seqüência primária ainda está por ser determinado. A modelagem molecular comparativa tem como objetivo gerar modelos confiáveis. A condição necessária é que a semelhança entre a seqüência designada e as estruturas do modelo seja detectável e que o alinhamento entre elas possa ser construído (Lesk et al., 2001). Todas as aproximações baseadas nas restrições de distância para modelagem molecular comparativa de proteínas (também chamada modelagem por homologia), extraem as distâncias conservadas e as regiões dos ângulos diedros permitidos a partir do alinhamento da seqüência alvo com as seqüências das estruturas relacionadas, adicionam restrições estereoquímicas e calculam o modelo pela minimização das violações de todas as restrições. Desta forma, as diferenças entre as várias aproximações estão na derivação e satisfação das restrições espaciais (Sali et al., 1995). A precisão do método está em assumir que se há semelhança entre duas seqüências lineares, a semelhança estrutural pode ser assumida e a função potencial guiará o modelo no caminho dos *moldes* em direção à estrutura correta (Sanchez e Sali, 1997) (Apêndice A Fig.A.2).

3.2 Avaliação dos Modelos

A qualidade do modelo predito determina a informação que pode ser extraída dele. Assim, estimar a precisão do modelo 3D da proteína é essencial para interpretá-lo. O modelo pode ser avaliado como um todo, bem como em regiões individuais, com base na similaridade entre as seqüências do *molde* e do *alvo*, observando resíduos importantes em regiões da proteína como o sítio ativo e sua conservação (Sanchez e Sali, 1998).

3.3 Dinâmica Molecular

Através da técnica de simulação do movimento de partículas em um sistema, obtêm-se as flutuações das posições relativas dos átomos de uma determinada proteína em função do tempo. A partir desse conhecimento podem-se obter resultados da estrutura tridimensional de uma molécula e também fazer inferências sobre a possível função biológica (Karplus e Petsko, 1990)(Apêndice A Fig.A.3).

3.4 Modelagem e Dinâmica Molecular

3.4.1 Construção do Modelo da Integrina Alfa6beta1

Devido ao grande avanço na biologia, surge a necessidade de descrever e entender a função de muitas proteínas em detalhe. Apesar de funções de proteínas serem determinadas experimentalmente, podem também ser determinadas pela comparação da sua seqüência com proteínas de funções conhecidas (Oliver et al., 1996). Esta possibilidade é viável pelo fato de proteínas de seqüências similares apresentarem as mesmas funções, embora exceções também ocorram (Orengo et al., 1994).

Conforme descrito no item 1.6, a integrina alfa6beta1 é de vital importância para fisiologia humana. Este fato nos levou a criar o seu modelo de interação para melhor compreender os mecanismos moleculares de ação dessa proteína e a dinâmica do processo de inibição da mesma. Usando técnicas de modelagem

por homologia, e dinâmica molecular foi gerado o primeiro modelo da integrina alfa6beta1, ADAM2 e ADAM9 humanas.

3.4.1.1 Busca por *Moldes*

A fase inicial do processo usando modelagem comparativa, está primeiramente em realizar a busca por seqüências de proteínas determinadas experimentalmente que estejam relacionadas a seqüência alvo.

Nesta etapa, foram adquiridas as seqüências primárias da proteína *alvo*, através da ferramenta *BlastP*. Esta ferramenta realiza a comparação de proteínas contra banco de dados específicos (Altschul et al., 1997), e as seqüências que apresentaram média e alta identidade foram selecionadas.

As seqüências correspondentes aos domínios beta-propeller da cadeia alfa6 (SwissProt - P23229 resíduos 1 - 439) e beta-A da cadeia beta1 (SwissProt P05556 resíduos 111 - 334) da integrina humana foram selecionadas para a criação do modelo da “cabeça” da integrina alfa6beta1. Posteriormente foi remodelada a cadeia beta1 acrescentando a região *Hybrid* (resíduos 85 - 444). A estrutura da “cabeça” da integrina alfavbeta3 (PDB - 1L5G, (Xiong et al., 2002)) foi selecionada como *molde* para a construção do modelo.

3.4.1.2 Alinhamento

De posse das seqüências alvo e das seqüências estruturais do *molde*, inicia-se o processo de alinhamento. O programa utilizado para realizar a etapa de alinhamento foi o ClustalW através da ferramenta on-line Search-Launcher (Krissinel e Henrick, 2004) e Boxshade < http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html > para o alinhamento múltiplo entre as seqüências do *molde* (PDB-1L5G/alfavbeta3 e PDB-1TXV/alfaIbbeta3)(Xiong et al., 2002; Xiao et al., 2004) e a integrina alfa6beta1 (P23229 - P05556) respectivamente.

Para o alinhamento da região β -A da “cabeça” da integrina, foi realizado o alinhamento entre as seqüências beta1 (P05556) e beta3 (P05106), alvo e molde

respectivamente, e para a região β -*propeller* o alinhamento foi entre as seqüências alfa6 (P23229), alfav (P06756) e alfaIb (P08514), tendo em vista averiguar possíveis divergências entre o *molde* e o *alvo*.

3.4.1.3 Modelagem

Uma vez realizado o alinhamento, e determinada a estrutura que será utilizada como *molde*, segue-se a etapa de modelagem da estrutura tridimensional propriamente dita. O modelo construído por modelagem comparativa, foi realizado através da ferramenta MODELLER 8v2. A metodologia da ferramenta calcula as restrições espaciais da estrutura molde e as justapõe a seqüência alvo (item 1.2.1.1).

Nesta etapa foi realizado o alinhamento da estrutura *molde* (1L5G) com o *alvo*, através do *script* do MODELLER *malign.py* (Apêndice-B), gerando um arquivo com o alinhamento (arquivo.ali/.pap), que foi utilizado pelo programa como arquivo de entrada para a construção do modelo. Após este alinhamento realizado pelo MODELLER, passa-se então para a construção automática do modelo, através do *script* *model.py*.(Apêndice-A)

O MODELLER sobrepõe às regiões alinhadas, gerando um conjunto de restrições espaciais a partir do *molde*. O programa evita colisões estéricas, respeitando os conjuntos estereoquímicos do modelo através do campo de força CHARMM (Sanchez e Sali, 1997).

Após descritas as restrições espaciais e o primeiro modelo gerado, deve-se otimizar o modelo estatisticamente (pdf). A otimização da estrutura é realizada através do *script* *optimize.py* (Apêndice-B), este último realiza uma melhor minimização de energia através de *Conjugate gradiente* para satisfazer as primeiras restrições locais e posteriormente utiliza *Simulated annealing* para otimizar o modelo. A idéia principal desse método é que “aquecendo-se” a molécula, os átomos adquirirão altas velocidades e energias e quando atingirem a temperatura ambiente, a estrutura alcança o seu mínimo energético.

3.4.2 Construção do Modelo da ADAM2 e ADAM9

No intuito de estudar a interação das proteínas ADAM2 e ADAM9 com a integrina alfa β 1 passamos então para a etapa de modelagem por homologia para as seqüências propostas. Através de metodologias *in silico* foi gerado o primeiro modelo da estrutura tridimensional para ADAM2 e ADAM9 humanas.

3.4.2.1 Busca por *Moldes*

O início da modelagem comparativa, foi a busca por seqüências de proteínas com estrutura determinada experimentalmente e que estejam relacionadas à seqüência *alvo*. Nesta etapa, foram selecionadas através da ferramenta *BlastP*, as seqüências que apresentam similaridade com as proteínas em estudo.

A seqüência da VAP1 (PDB-2ERP - SwissProt-Q9DGB9 resíduos 185 - 610) foi selecionada como *molde* para a construção do modelo, e as seqüências ADAM2 (Q99965 resíduos 156 - 617) e ADAM9 (Q13443 resíduos 190 - 645) foram os *alvos*.

3.4.2.2 Alinhamento

O programa utilizado para realizar as etapas de alinhamento foi o ClustalW através da ferramenta on-line Search-Launcher (Krissinel e Henrick, 2004) e Boxshade (< [http : //www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) >). Para o alinhamento múltiplo entre as seqüências do *molde* (PDB-2ERP - VAP1) e as metaloproteases ADAM2 (Q99965) e ADAM9 (Q13443) humanas.

3.4.2.3 Modelagem

A construção do primeiro modelo da ADAM2 e ADAM9 humanas através da técnica de modelagem por homologia, foi realizada através da ferramenta MODELLER 8v2 (item 1.2.1.1).

Nesta etapa foi realizado o alinhamento da estrutura *molde* (PDB-2ERP) com o *alvo*, através do *script malign.py* (Apêndice-B), gerando um arquivo com o alinhamento (arquivo.ali/.pap), que foi utilizado pelo programa como arquivo

de entrada para a construção do modelo. Após este alinhamento realizado pelo MODELLER, passa-se então para a construção automática do modelo, através do *script model.py* (Apêndice-B). O MODELLER sobrepõe às regiões alinhadas, gerando um conjunto de restrições espaciais a partir do *molde*.

Após o primeiro modelo gerado, deve-se realizar a otimização da estrutura que é obtida através do *script optimize.py* (Apêndice-A). Este último realiza uma melhor minimização de energia através de *Conjugate gradiente* para satisfazer as primeiras restrições locais e posteriormente utiliza *Simulated annealing* para otimizar o modelo até atingir o seu mínimo energético.

3.4.3 Validação dos Modelos

Depois de gerados os modelos, a avaliação da qualidade estereoquímica foi realizada pelo servidor on-line PROCHECK (Laskowski et al., 1996), programa que analisa comprimento de ligação, ângulo de ligação, ligações peptídicas e planaridade dos anéis das cadeias laterais, torção dos ângulos ϕ e ψ da cadeia principal, entre outros parâmetros.

3.4.4 Solvatação e Equilíbrio do Sistema

De posse dos arquivos com as coordenadas dos modelos gerados da integrina alfa6beta1, ADAM2 e ADAM9, iniciou-se o processo de solvatação e equilíbrio dos sistemas para otimização de cada estrutura. As estruturas foram otimizadas utilizando-se o pacote GROMACS 3.2/3.3.1 (*Gröningen Machine for Chemical Simulations*) (Spoel et al., 2005) em precisão simples, em *clusters* de processadores *Itanium2* de 1.5 Ghz e rodando em sistema operacional Linux. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas com os modelos solvatados e centralizados em uma caixa de água octaédrica ou dodecaédrica, com modelo de água SPC (Hermans et al., 1984). Foi aplicado o campo de força GROMOS96 43a1/53a6 (Oostenbrink et al., 2004).

Cada modelo foi submetido a 500ps de simulação com o intuito de relaxar a

estrutura. Posteriormente foram submetidos a mais tempo de simulação, gerando um total de $2ns$ para cada uma das estruturas por separado. Logo após este processo foram gerados os complexos de interação entre as proteínas. As proteínas isoladas foram submetidas a mais tempo de simulação, para estudo de flutuação nas suas estruturas, finalizando com $10ns$ para integrina alfa6beta1 e alfa6beta1-Hybrid e $9ns$ para ADAM2 e ADAM9.

3.5 Modelagem da Interação Alfa6beta1-ADAM

3.5.1 Construção do Complexo Formado pela Integrina Alfa6beta1 e ADAM2*dsl*d e ADAM9*dsl*d

A partir do modelo da “cabeça” da integrina alfa6beta1, ADAM2 e ADAM9, todos otimizados por DM, foram construídos os complexos formados pela “cabeça” da integrina alfa6beta1 e o domínio tipo-disintegrina e porção N-terminal do domínio rico em cisteína (*dsl*d) da ADAM2 e ADAM9. O programa MODELLER foi utilizado para a construção do complexo, utilizando novamente como *molde* a integrina alfavbeta3 em complexo com o peptídeo RGDF (PDB-1L5G).

A partir do posicionamento inicial da Ser(303) (motivo KTSECD) para ADAM9 e o posicionamento do Glu(305) (motivo SFEECD) para ADAM2 em contato com o *MIDAS*, o domínio *dsl*d foi disposto em contato com a integrina.

Cada modelo foi submetido a $500ps$ de DM para relaxamento da estrutura, à temperatura de 312K e pressão de 1atm. A dinâmica de produção de dados foi de $23ns$ de simulação com precisão simples e em seguida, mais $2ns$ de simulação com precisão dupla para manutenção do equilíbrio alcançado com os mesmos critérios estabelecidos no item 3.4.4 (Solvatação e Equilíbrio do Sistema).

3.5.2 Desenho de Ligantes Peptídicos

Após $10ns$ de DM, foi realizada uma análise prévia da interação do complexo integrina alfa6beta1-ADAM2*dsl*d e alfa6beta1-ADAM9*dsl*d para desenhar um ligante peptídico pequeno que mantivesse a capacidade de inibição da integ-

rina. Foram analisadas as áreas de contato no modelo de interação, e a conservação evolutiva dos resíduos destas áreas. Depois destas análises foram desenhados os peptídeos a partir do loop de interação com ADAM9*dsld*. Foram desenhados 4 peptídeos a partir da sequência (CRGKTSECDVPEYCN), dos quais um é o *Wt*(CRGKTSEADVPEYCN) e um o *scramble* A9s (CDERTVGKESPYACN)(gerado aleatoriamente), A9b (CRSKTDEFDVPEYCN) e A9e (CRGKTEEWDVPEYCN). As cisteínas destacadas em amarelo foram mantidas para que ocorresse a ligação dissulfídica, formando um peptídeo cíclico. Estes peptídeos sofreram alterações em pontos importantes para interação com o sítio *MIDAS*. Destacados em verde foram os resíduos que substituíram os originais, sendo em alguns casos resíduos neutros substituídos por resíduos carregados negativamente ou por resíduos apolares. No caso do peptídeo A9wt, a cisteína foi substituída por uma alanina para que não ocorresse uma ligação dissulfídica em região indesejada.

3.5.3 Construção do Complexo Formado pela Integrina Alfa6beta1-*Hybrid* com ADAM9*dsld* e Peptídeos Inibidores.

Em posse destas análises foi gerado também um complexo com o modelo da integrina alfa6beta1-*Hybrid* e ADAM9*dsld*, para verificar a movimentação angular do subdomínio *Hybrid*. Os complexos gerados com os peptídeos foram construídos com a “cabeça” da integrina alfa6beta1-*Hybrid* para a validação da efetividade dos ligantes peptídicos *in silico*. A metodologia para o GROMACS foi a mesma descrita no item 3.4.4.

O sistema formado pelo complexo com a ADAM9*dsld* foi submetido a 10ns de DM. Já os sistemas formados com o complexo alfa6beta1-peptídeos foram submetidos a 5ns de DM. A partir da estrutura média do *cluster* mais representativo, foram realizadas as análises dos complexos em estudo.

3.6 Descrição do Ensaio de migração “*in vitro*”

3.6.1 Células

Neste estudo foi utilizada a linhagem CEM de linfócitos T CD4⁺ obtida a partir de paciente portador de leucemia T (Foley et al., 1965). Tal linhagem foi mantida em meio de cultura RPMI 1640, contendo L-glutamina, penicilina, bicarbonato de sódio 24mM e HEPES 25mM (todos produtos Sigma, St Louis, USA), 10% de soro bovino fetal (SFB - Cultilab, Campinas, Brasil) e 2-mercaptoetanol (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha). Experimentos anteriores realizados no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (Fiocruz, Rio de Janeiro) mostram a expressão do receptor de laminina do tipo integrina (alfa6beta1 - CD49f/CD29), assim como a capacidade funcional destas células em aderir à laminina, e migrar sobre esta molécula (Suse Silva-Barbosa Wilson Savino, dados não publicados). No momento de sua utilização para os ensaios de migração, tais células foram lavadas e ressuspensas em meio sem soro.

3.6.2 Tratamento das Células

Nos experimentos em que foi testado o papel do peptídeo bloqueador (A9a) e seu controle negativo (A9s) sobre a migração frente à laminina, foram utilizadas células CEM tratadas com cada um dos peptídeos na concentração de 50µg/106 células. Tal concentração de células foi ressuspensa em volume final de 1ml de RPMI, e incubada à 37°C em incubadora de CO₂ durante 30 minutos. As células não submetidas a esse tratamento foram mantidas sob as mesmas condições. Decorrido esse período as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100µl de RPMI sem soro.

3.6.3 Ensaio de Migração *in vitro*

A capacidade migratória de células CEM *in vitro* foi avaliada utilizando-se câmaras de “*transwell*” (Corning Costar, Cambridge, USA). Essa câmara é composta de uma placa de 24 poços contendo insertos de 6,5mm de diâmetro com filtro

(membrana) com poro de $8\mu\text{m}$ (Apêndice A).

As membranas foram inicialmente recobertas com solução contendo $10\mu\text{g/ml}$ de laminina humana (Sigma, Co.) ou albumina sérica bovina (BSA, adquirida da Sigma Co.), durante 1 hora a 37°C . Decorrido esse período, o excesso de material foi retirado dos insertos que foram então submetidos a bloqueio utilizando solução de PBS/BSA a 0.5%, durante 45 minutos a 37°C . Depois disso o excesso de solução foi novamente retirado, e os insertos depositados na placa contendo $600\mu\text{l}$ de RPMI 1640/BSA 1% por poço. Sobre cada um desses insertos foram adicionadas 106 células diluídas em $100\mu\text{l}$ de solução de RPMI/BSA 1%. As placas foram incubadas durante 4 horas a 37°C em estufa de CO_2 . As células que migraram foram recolhidas na parte inferior do *transwell*, centrifugadas, o volume aferido e, em seguida, o material foi contado utilizando câmera de Neubauer, pelo método de exclusão de células mortas em azul de Trypan.

3.6.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi feita utilizando-se análise de variância (ANOVA) através do programa computacional GraphPad Software, seguido do teste de Tukey. Valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Capítulo 4

RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Construção do Modelo da Integrina Alfa6beta1

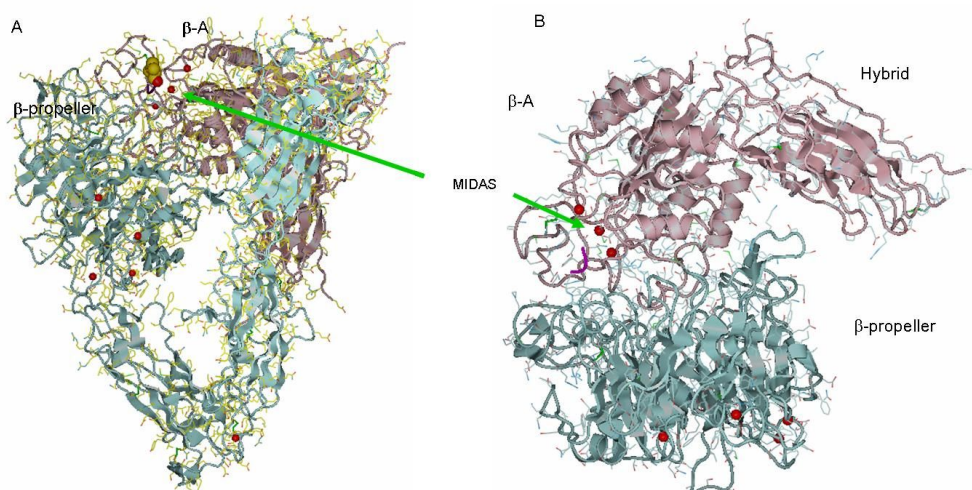
4.1.1 Identificação e Seleção da Proteína Molde

A primeira etapa do método foi a identificação e seleção de pelo menos uma proteína de estrutura conhecida, que serviu como molde para a determinação da estrutura da proteína alvo integrina alfa6beta1. Num primeiro ensaio buscou-se por similaridade seqüência versus seqüência utilizando *BlastP* (Altschul et al., 1997) para comparação dos resíduos de alfa6 (SwissProt P23229) e de beta1 (SwissProt P05556) humanas com as estruturas resolvidas experimentalmente por raio X e depositadas no PDB (*Protein Data Bank*: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Este ensaio foi positivo indicando a estrutura da integrina alfavbeta3 resolvida por difração de raio X, com resolução de 3.2Å (PDB 1L5G), (Xiong et al., 2002), apresentando 33% de identidade para a cadeia alfa6 e 54% de identidade para a cadeia beta1.

Os domínios *β-propeller* e *β-A* das integrinas são responsáveis pela formação de uma estrutura globular (“cabeça”). No domínio *β-propeller* pode-se observar a presença de 7 subdomínios nomeados de D1 a D7, sendo formados cada um por 4 folhas beta antiparalelas. O domínio *β-A* é formado por 6 folhas betas paralelas, circundada por 8 alfa hélices e o domínio “*hybrid*” formado por 7 folhas beta antiparalelas (Fig.4.1-B) (Xiong et al., 2002).

O íon *MIDAS*, sítio de adesão ao ligante, está localizado no domínio *β-A*

Figura 4.1: Diagrama da Estrutura Extracelular da Integrina AlfaBeta3.



Estrutura terciária da 1L5G integrina alfaVbeta3. A- Estrutura da alfavbeta3 completa. B - Estrutura da cabeça da integrina alfavbeta3 com o subdomínio *Hybrid*.

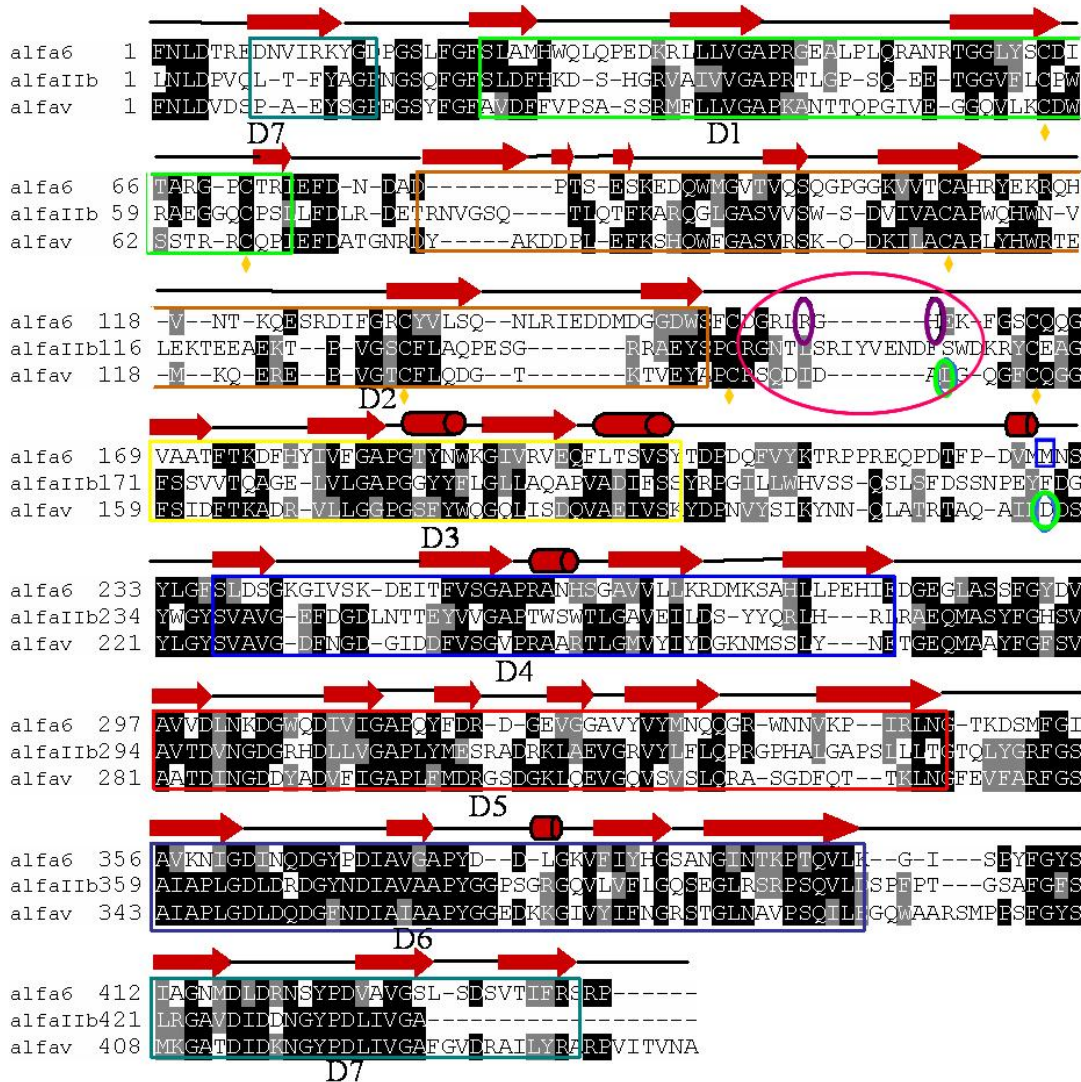
da “cabeça” da integrina (Fig. 4.1 A-B), sendo este íon que coordena diretamente a cadeia lateral de um dos resíduos ácidos dos ligantes para integrina alfavbeta3. Ocorre a presença de outros dois sítios de ligação metal dependente, *ADMIDAS* e *LIMBS* que são requeridos para dar estabilidade à adesão de ligantes, ou seja, podem atuar como efetores promovendo a adesão, como antagonistas inibindo a adesão e como seletores dando especificidade de adesão a ligantes (Plow et al., 2000).

4.1.1.1 Alinhamento das Seqüências dos Domínios *β-propeller* e *β-A* das Integrinas

Uma vez identificado o *molde*, a seqüência *alvo* deve ser alinhada com a seqüência *molde*. O objetivo do alinhamento é justapor resíduos estruturalmente equivalentes levando em consideração características estruturais comuns como, por exemplo, a estrutura secundária (Fig.4.2). O alinhamento foi realizado a partir do servidor on-line Search Launcher (Krissinel e Henrick, 2004) e BoxShade (ClustalW 1.8) entre as seqüências alfaV (P06756), alfaIIb (P08514) e beta3 (P05106) do modelo e a seqüência alvo alfa6 (P23229) e beta1 (P05556) respectivamente (Fig.4.2 e

4.3). Informações estruturais de alfavbeta3 e alfaIbbeta3 encontram-se disponíveis no site do PDB (1L5G) e (1TXV) respectivamente. Para a cadeia beta a conservação dos 6 resíduos de cisteína na seqüência *molde* e *alvo* demonstram a conservação estrutural, o que favorece a utilização deste modelo para a técnica de modelagem por homologia (Fig.4.3).

Figura 4.2: Alinhamento das Seqüências de AlfaV, AlfaIb e Alfa6.

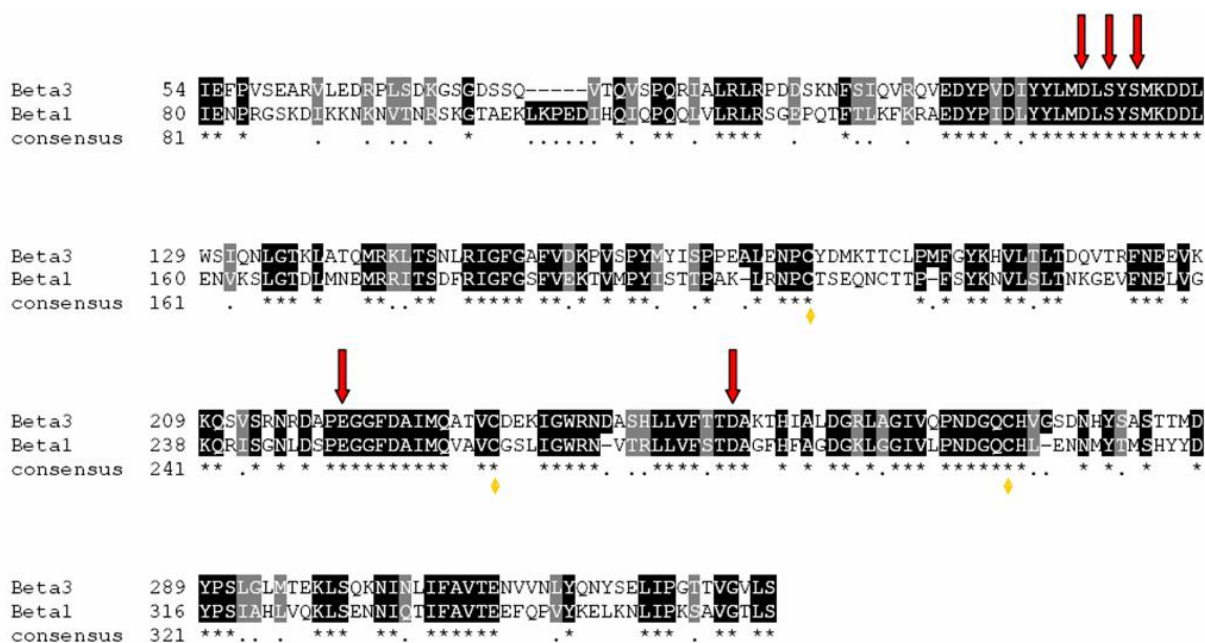


Alinhamento das seqüência de alfaV, alfaIb e alfa6. Os subdomínios estão numerados de D1 a D7, as setas representam as fitas beta, os cilindros representam as alfa hélices e os círculos magenta e verde indicam os resíduos responsáveis pelo sítio de ligação em alfa6 e alfaV (domínio β -propeller) respectivamente. Resíduos responsáveis pelo loop de discriminação de ligantes no β -propeller estão demonstrados no círculo rosa. No alinhamento se observam regiões em preto e cinza, designando resíduos idênticos ou que apresentam a mesma propriedade físico-química respectivamente.

De acordo com as características eletrostáticas entre as duas cadeias, obser-

vamos claramente que no loop entre os domínios D2-D3, (responsável pela discriminação de ligante), ocorrem resíduos com propriedades eletrostáticas diferenciadas. Em alfaV é nítida a presença de resíduos carregados negativamente (SQDIDADG), enquanto que em alfa6 ocorre a presença de resíduos carregados positivamente (GRLRGHEK) (Fig.4.2 e Fig.4.4), observa-se também a substituição do resíduo Asp da cadeia alfaV pelo resíduo Met (Fig.4.2) entre D3 e D4, favorecendo a contatos hidrofóbicos e não eletrostáticos como no caso da alfaV.

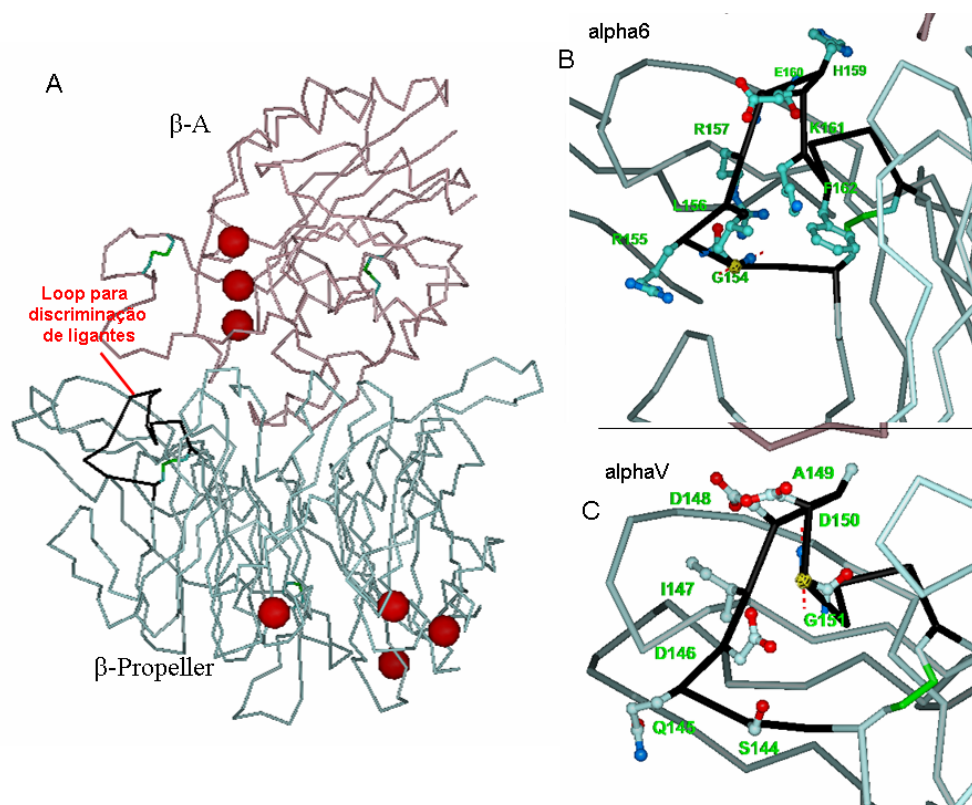
Figura 4.3: Alinhamento das Sequência de Beta3 e Beta1.



Alinhamento das seqüências de beta3 e beta1 (domínio β -A). As setas em vermelho indicam os resíduos responsáveis pela coordenação do íon *MIDAS*. As regiões destacadas em amarelo correspondem aos resíduos conservados de cisteína. Regiões em preto e cinza, designando resíduos idênticos ou que apresentem a mesma propriedade físico-química respectivamente.

O alinhamento correspondente ao domínio β -A das cadeias beta3 e beta1 revela uma alta conservação (54% de identidade) principalmente nos resíduos que são responsáveis pela coordenação do íon de magnésio do sítio *MIDAS* para ambas as seqüências (setas vermelhas fig.4.3), as cisteínas estão conservadas, permitindo com isso a extrapolação das coordenadas do *molde* para a estrutura *alvo* (Fig.4.3).

Figura 4.4: Representação dos Domínios β -A e β -propeller da Integrina.



A-Representação dos domínios β -propeller e β -A da integrina com a região responsável por discriminação de ligantes destacado em preto; B - C- Cadeia lateral dos resíduos responsáveis por essa discriminação para alfa6 e alfaV respectivamente.

4.1.1.2 Construção do Modelo por Homologia

Neste estudo foi gerado um modelo para uma integrina alfa6beta1 humana com base na homologia com a integrina alfaVbeta3 cuja estrutura foi determinada experimentalmente por cristalografia de Raio-X (Xiong et al., 2002) . As coordenadas da estrutura para a proteína alvo foram geradas através do programa MODELLER das regiões correspondentes aos domínios β -propeller e β -A responsáveis pelo sítio de ligação. O resultado deve ser observado com cuidado, havendo, de qualquer forma, a necessidade de se solvatar e equilibrar o modelo gerado com ferramentas de dinâmica molecular.

Os métodos de construção do modelo concentram-se na construção razoável do arcabouço estrutural da proteína, porque a homologia fornece essa informação com razoável segurança. Na modelagem por homologia automatizada os átomos da

cadeia lateral podem não estar corretamente localizados no modelo resultante. A homologia não fornece informações sobre a orientação da cadeia lateral, portanto, a principal tarefa do desenvolvedor do modelo é evitar conflitos de posicionamento e conformações pouco favoráveis, e procurar otimizar as orientações das cadeias laterais dos aminoácidos do modelo.

Foram gerados dois modelos para alfa6beta1. Um dos modelos corresponde somente aos domínios β -A e β -propeller (Fig.4.5), mas no segundo modelo foi acrescentado o domínio *Hybrid*, para verificar sua movimentação angular com a presença e ausência de ligantes (Fig.4.6).

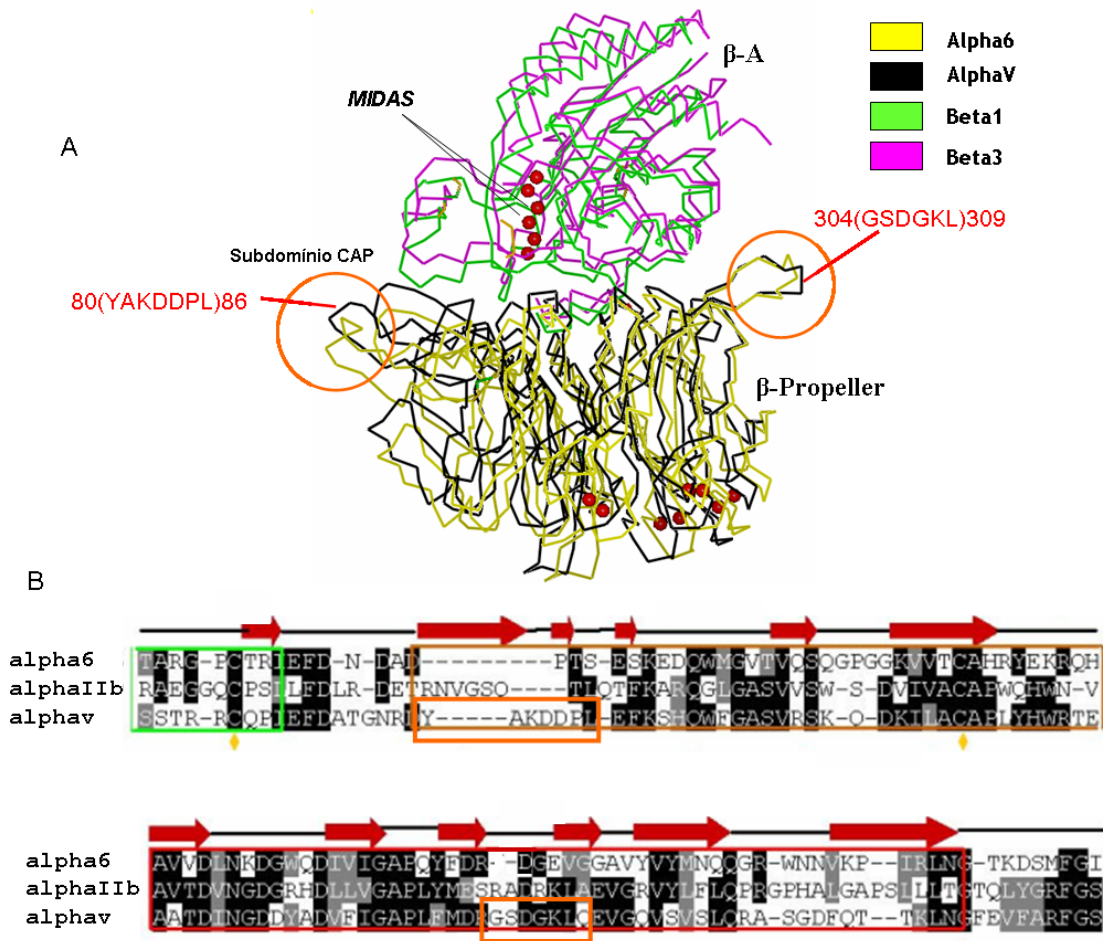
4.1.2 Validação do Modelo

Para que se possa dar continuidade nos experimentos após modelagem da estrutura da proteína, é necessário avaliar a construção do modelo, procedimento esse que irá determinar se o modelo é ou não viável para estudo.

A região de interface entre as cadeias alfa e beta da integrina alfa6beta1 foram calculadas utilizando o servidor PISA < [http : //www.ebi.ac.uk/msd – srv/prot_int/cgi – bin/piserver](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_nt/cgi-bin/piserver) >. Os resultados demonstram uma área de contato de 21.2% entre o domínio β -A e o domínio β -propeller da integrina alfa6beta1 em relação a 16.8% entre os domínios da integrina alfaVbeta3 (Fig.4.7).

Na sobreposição estrutural dos modelos representado pelas figuras 4.5 e 4.6, observamos a principal variação apresentada no subdomínio D2, especificamente no *loop* do subdomínio CAP entre os resíduos 80 e 86 do *molde*, e uma variação no alinhamento entre os resíduos 304 e 309 do *molde* no domínio D5 (Fig.4.5-B).

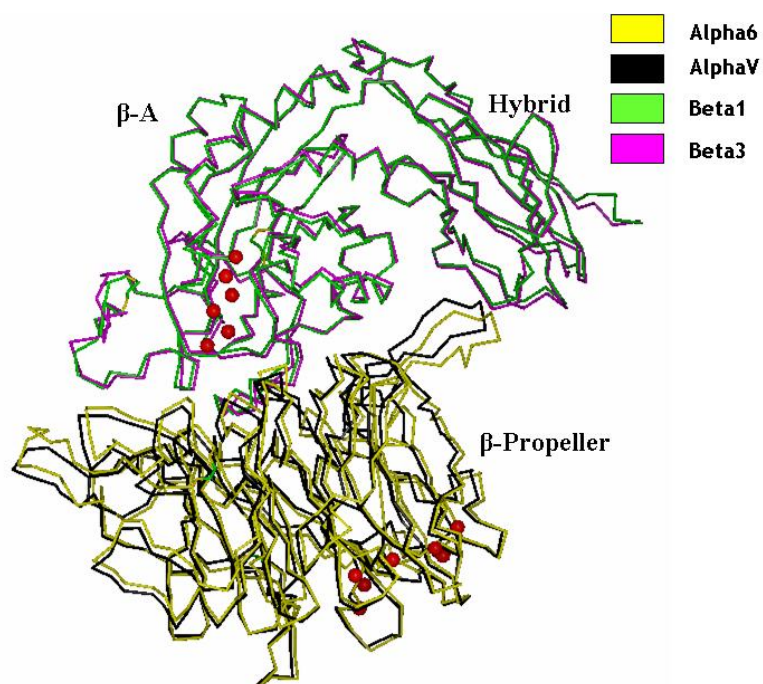
Figura 4.5: Sobreposição da Integrina Alfa6beta1 com AlfaVbeta3.



Sobreposição da integrina alfa6beta1 com alfaVbeta3 demonstrando o domínio β -propeller em amarelo e preto, cadeias alfa6 e alfaV respectivamente e domínio β -A cadeias beta1 e beta3 em verde e rosa respectivamente. A principal variação observada entre as alfa6 e alfaV encontra-se nos *loops* do subdomínio CAP, *loop* esse importante para reconhecimento do ligante. As seqüências divergentes no β -propeller estão destacadas no círculo alaranjado para alfaV (A) e retângulo alaranjado no alinhamento (B).

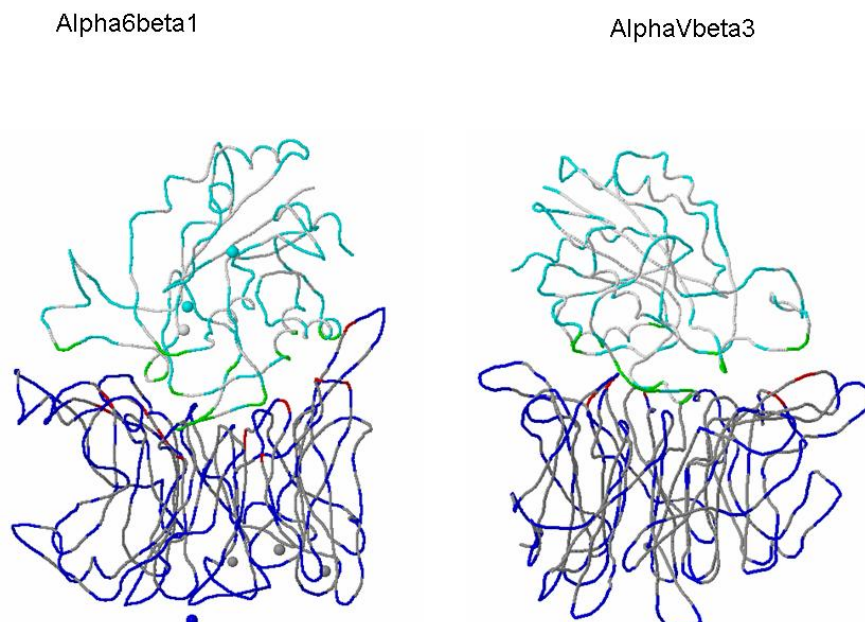
A validação estereoquímica do modelo para a “cabeça” da integrina com o domínio β -A/*Hybrid*, foi detalhada no gráfico de Ramachandran indicando qualidade aceitável para o modelo proposto, uma vez que mais de 78% dos resíduos de aminoácidos modelados (regiões mais favoráveis) e mais que 17% (regiões permitidas) apresentam ângulos espacialmente possíveis. Quanto as cadeias lateral e principal da proteína, estas encontram-se bem posicionadas quando comparadas ao modelo experimental com a mesma resolução (3.2Å). A figura 4.8 mostra o gráfico de Ramachandran e os gráficos para os parâmetros da cadeia principal e lateral

Figura 4.6: Alinhamento Estrutural da Integrina Alfa6beta1-Hybrid com AlfaVbeta3-Hybrid.



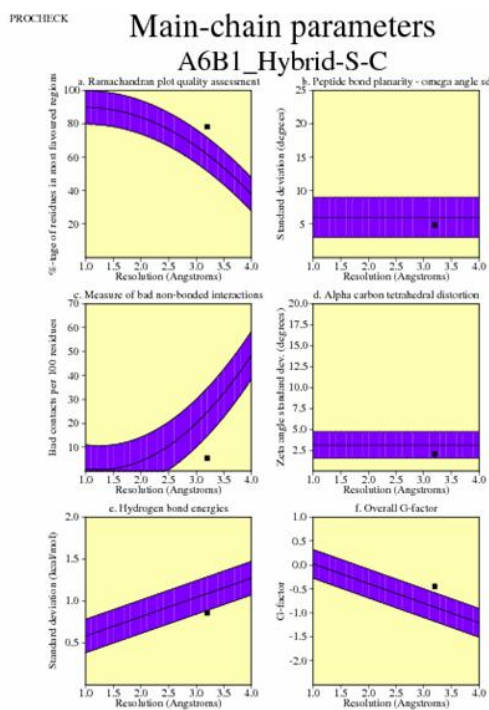
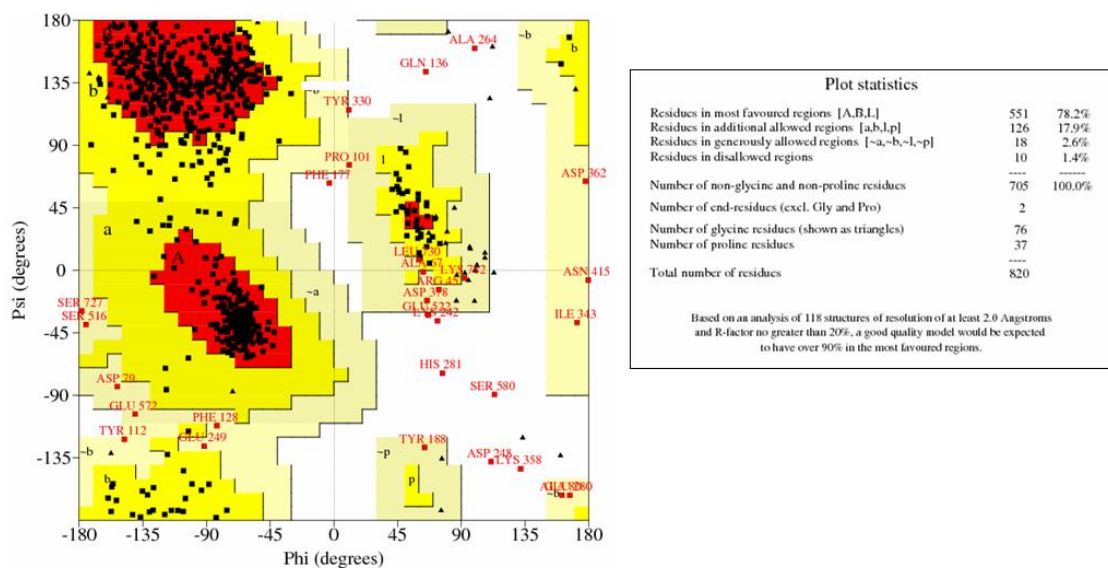
Alinhamento estrutural da integrina alfa6beta1 com alfaVbeta3 demonstrando o domínio β -propeller em amarelo e preto, cadeias alfa6 e alfaV respectivamente e β -A/Hybrid cadeias beta1 e beta3 em verde e rosa respectivamente. As esferas vermelhas representam os íons de magnésio.

Figura 4.7: Estrutura da Interface entre as Cadeias Alfa e Beta da Integrina Alfa6beta1.

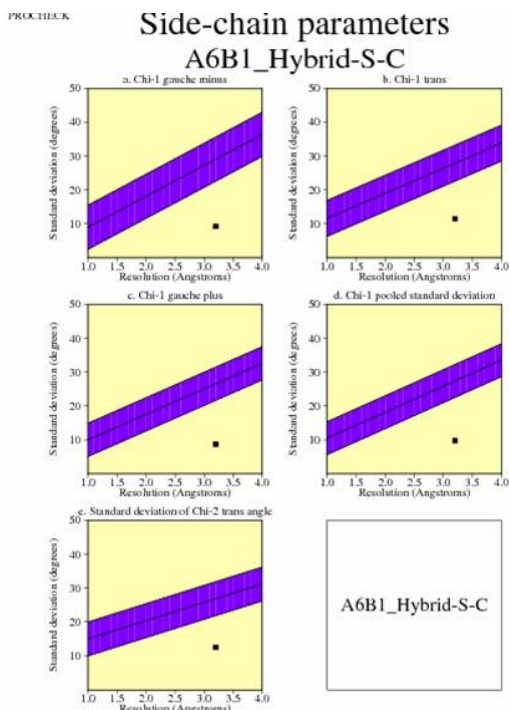


Estrutura da interface entre as cadeias alfa e beta da integrina. Os pontos vermelhos e verdes indicam as regiões de contato entre os dois domínios.

Figura 4.8: Gráfico de Ramachandran Correspondente à Estrutura da “cabeça” da Integrina Alfa6beta1 com o Domínio β -Hybrid.



Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean
			Typical value	Band width	
a. % large residues in A, B, L	705	78.2	61.7	10.0	1.6 BETTER
b. Omega angle st dev	818	4.9	6.0	3.0	-0.4 INSIDE
c. Bad contacts / 100 residues	44	5.4	24.7	10.0	-1.9 BETTER
d. Zeta angle st dev	744	2.1	3.1	1.6	-0.7 INSIDE
e. H-bond energy st dev	447	0.9	1.1	0.2	-1.2 BETTER
f. Overall G-factor	820	-0.5	-0.9	0.3	1.4 BETTER



Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean
			Typical value	Band width	
a. Chi-1 gauche minus st dev	137	9.3	29.1	6.5	-3.0 BETTER
b. Chi-1 trans st dev	208	11.5	27.9	5.3	-3.1 BETTER
c. Chi-1 gauche plus st dev	325	8.7	26.6	4.9	-3.6 BETTER
d. Chi-1 pooled st dev	670	9.7	27.4	4.8	-3.6 BETTER
e. Chi-2 trans st dev	156	12.6	26.9	5.0	-2.9 BETTER

A-Gráfico de Ramachandran correspondente à estrutura da “cabeça” da integrina alfa6beta1 com o domínio β -Hybrid. A maior parte dos resíduos < 95% se encontram em regiões mais favoráveis e regiões permitidas do gráfico de ramachandran. B-Gráfico de parâmetros da cadeia lateral e principal com resolução em torno de 3.2Å.

para o modelo alfa6beta1-*Hybrid*.

4.1.3 Sítios de Reconhecimento de Ligantes

Um grande número de integrinas contém um domínio de cerca de 200 aminoácidos conhecidos como domínio I na subunidade alfa, local este designado como responsável na interação com ligantes (Plow et al., 2000).

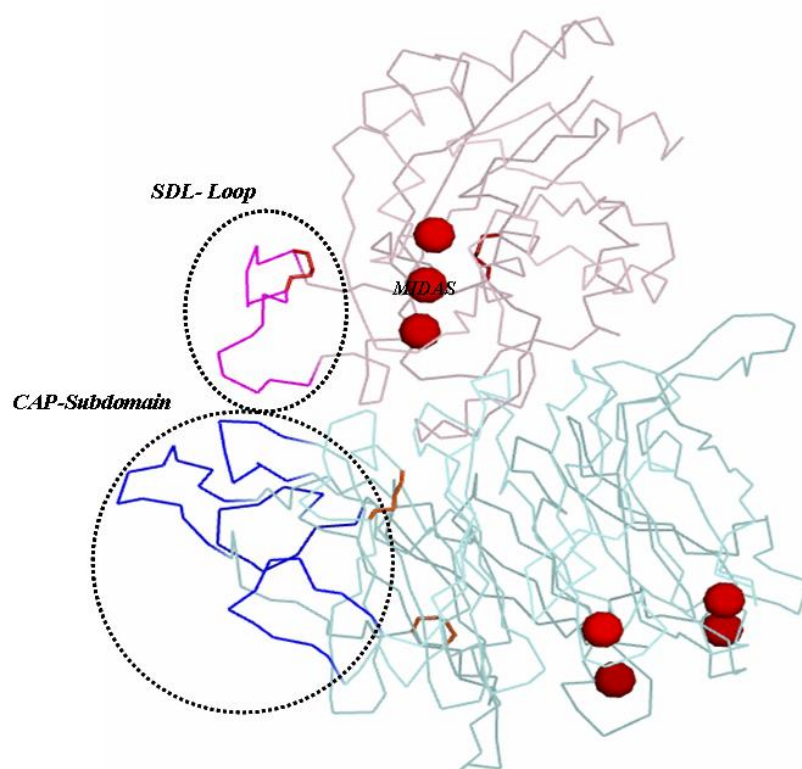
Nas integrinas com ausência do domínio I, ocorre a presença de uma região localizada no topo das integrinas, formada por um *loop* da cadeia beta1 para reconhecimento macromolecular chamado SDL (*Specificity Determining Loop*), e mais quatro loops localizados na cadeia alfa6 que formam o subdomínio CAP. Vários autores afirmam que estes sub-domínios conferem a especificidade das diferentes integrinas a grandes domínios protéicos (Xiong et al., 2002, 2003). Na cadeia alfa6 está presente mais um *loop* entre o D2 e D3, também característico por reconhecer pequenos ligantes (Fig.4.9) (Xiao et al., 2004).

Cátions divalentes possuem um papel importante na formação do sítio de ligação, responsáveis por atrair o ligante ao sítio de ligação através de um resíduo negativamente carregado. Como mencionado acima para a integrina alfaVbeta3 a coordenação ao metal divalente no sítio *MIDAS* é feita pelos resíduos Asp119, Ser121, Ser123, Glu220 e Asp251 (Xiong et al., 2002). Regiões da superfície protéica onde se encontram os cátions divalentes, apresentam características eletronegativas (Fig.4.10).

4.1.4 Coordenação dos Íons *MIDAS*, *ADMIDAS* e *LIMBS*

As coordenadas dos íons Mn^{2+} presentes na estrutura molde foram conservadas também no modelo, entretanto os íons de Mn^{2+} foram trocados por íons de Mg^{2+} . Os resíduos responsáveis pela coordenação do *MIDAS*, *ADMIDAS* e *LIMBS* são idênticos entre as estruturas *alvo* e *molde*, portanto, foi possível manter a coordenação. O alinhamento das cadeias beta1 e beta3 apresentou uma alta conservação, sendo que, todos os resíduos responsáveis pela coordenação do *MI-*

Figura 4.9: Estrutura da “cabeça” da Integrina Alfa6beta1 .



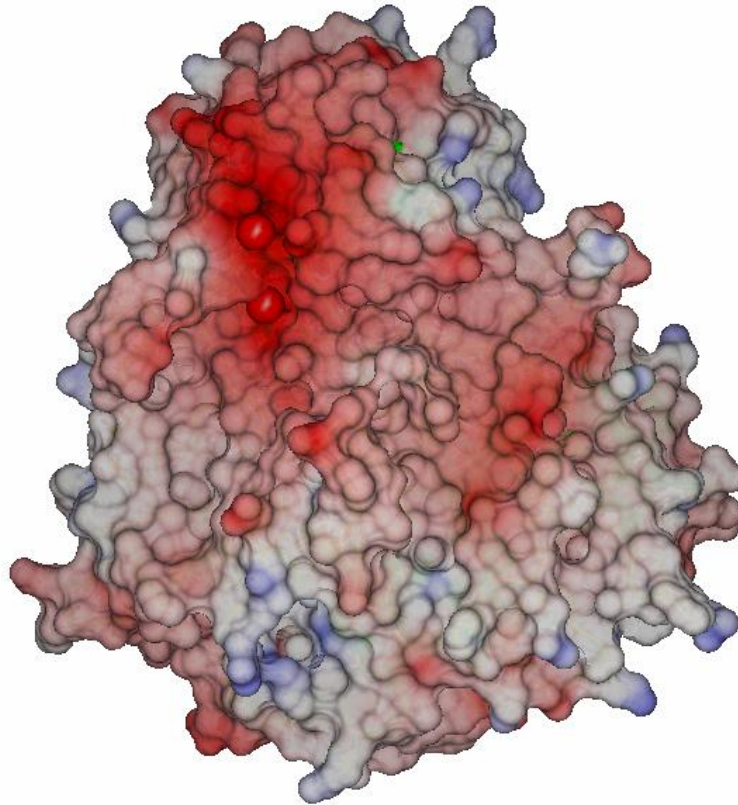
Estrutura da “cabeça” da integrina alfa6beta1 demonstrando os loops de interação importantes para reconhecimento macromolecular. Na cadeia beta1 o *loop* SDL (*Specificity Determining Loop*) destacado em rosa, responsável pelo reconhecimento de grandes ligantes, na cadeia alfa6, 4 loops são responsáveis por formar o subdomínio CAP (reconhecimento de grandes ligantes) e o íon de Mg^{2+} (*MIDAS*) responsável pela atração do ligante.

DAS em beta3 (Xiong et al., 2002), estão alinhados a seus respectivos resíduos no modelo beta1.

Foi analisado o perfil eletrostático dessas regiões que circundam os sítios *MIDAS*, *ADMIDAS* e *LIMBS*, demonstrando a superfície desta região carregada negativamente (Fig.4.10). As regiões onde se encontram os resíduos responsáveis pela coordenação dos íons, são ocupadas em sua grande maioria por resíduos de Asp, Glu e Ser (Fig.4.11).

Segundo os resultados obtidos por alfavbeta3 em experimentos cristalográficos, a coordenação do *MIDAS* seria mantida pelos resíduos de Ser121 e Ser123 (Xiong et al., 2003). Neste caso, ambas as cadeias laterais das serinas estão mantendo a coordenação do cátion *MIDAS*. A carboxila do Glu220 faz parte da coordenação (Fig.4.11). Para o íon *ADMIDAS* (adjacente ao *MIDAS*) a coordenação é

Figura 4.10: Superfície Eletrostática da Integrina Alfa6beta1.

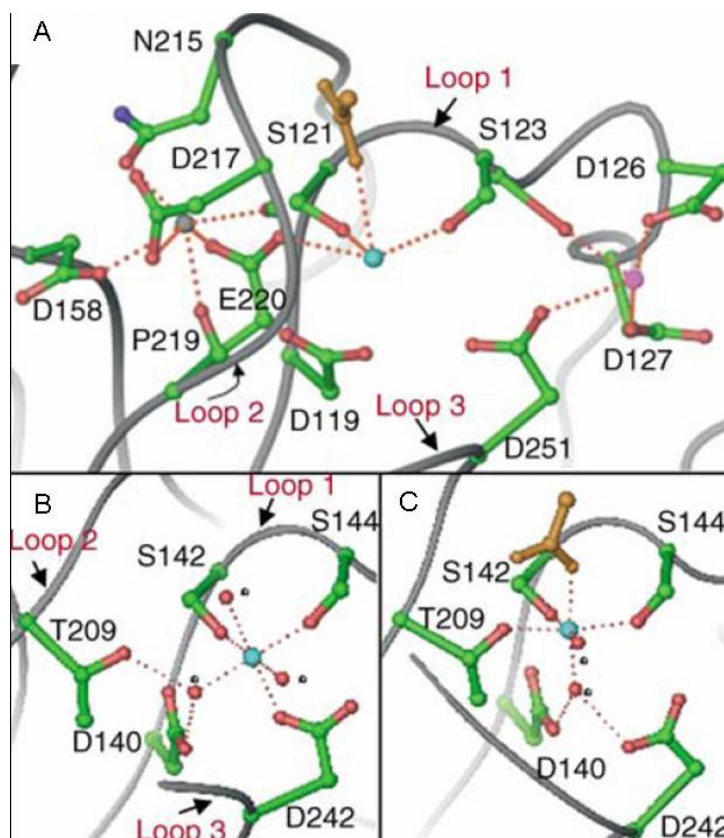


Regiões mais eletronegativas estão representadas pela superfície vermelha.

primariamente mantida pelos resíduos Asp126 e Asp127. Já no caso do íon *LIMBS* a coordenação é mantida pelos resíduos Asp158, Glu220 e Asp217 (Xiong et al., 2003).

Na estrutura “fechada” de *alfavbeta3*, uma molécula de água completa a coordenação do íon metal *MIDAS* (Fig.4.11-B) juntamente com os resíduos de Thr209 (loop2) e Asp242 (loop3). A conformação aberta (Fig.4.11-C), apresenta uma movimentação do íon de 2Å, resultando em uma sutil alteração na coordenação, a Thr209 agora contata diretamente o íon, enquanto que o Asp242, contata via molécula de água (Xiong et al., 2003).

Figura 4.11: Coordenação dos Íons *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS* na Integrina Alfavbeta3.



Demonstração dos resíduos responsáveis pela coordenação nos íons *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS* no cristal da integrina alfavbeta3. A-B-C Demonstração da coordenação dos íons *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS*. A cadeia lateral dos resíduos responsável pela coordenação são mostrados em *ball and stick*, átomos de oxigênio em vermelho e carbono em verde. O aspartato do ligante está destacado em amarelo ouro. Os resíduos Ser121, Ser123 e Glu220 mantêm contato direto com o *MIDAS*. Os resíduos Asp119 e Asp251 estão a 6Å do íon sendo o contato mediado provavelmente por uma molécula de água. O *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS* estão mostrados pelas esferas rosa, azul e cinza respectivamente. Moléculas de água representadas pelas esferas vermelhas (ω). (Extraído de Xiong et al. (2003))

No modelo obtido para a integrina alfa6beta1, a cadeia lateral dos resíduos Asp9, Ser11, Ser13, Ser106 e Glu108 são responsáveis por manter a coordenação do íon *MIDAS* no modelo inicial. O Asp9 e a Ser106 estão com uma distância de 3.95Å e 4.23Å do íon *MIDAS* respectivamente, sendo o contato mediado provavelmente por uma molécula de água. Após solvatação em 5ns de simulação, os resíduos que estão fazendo a coordenação do *MIDAS* são Asp9, Ser11, Ser13 e Glu108, nesta conformação ocorre uma movimentação do resíduo Asp9, agora contactando o íon diretamente, enquanto que a Ser13 faz o contato através de uma molécula

de água. Depois de 11ns de simulação a movimentação das cadeias laterais dos resíduos favorece apenas o contato dos resíduos Asp9, Ser11, Asp17 e Glu108, sendo o Asp17 mediado pela água e a Ser13 perdendo totalmente o contato com o íon (Fig.4.12).

A coordenação do *ADMIDAS* é feita pela cadeia lateral dos resíduos Ser13, Asp16, Asp17 e Asp138 no modelo inicial, perdendo somente a coordenação do resíduo Ser13 após 11ns de DM. Por conseguinte a coordenação do íon *LIMBS* é feita pelos resíduos Asn103, Asp105, Pro107 e Glu108 no modelo inicial, sendo mantida após 11ns de DM pelos resíduos Asp105, Pro107, Glu108 e a movimentação favoreceu a coordenação pelo resíduo Glu48 (Fig.4.12).

4.1.4.1 Análise de 11ns de Dinâmica Molecular da Integrina Alfa6beta1

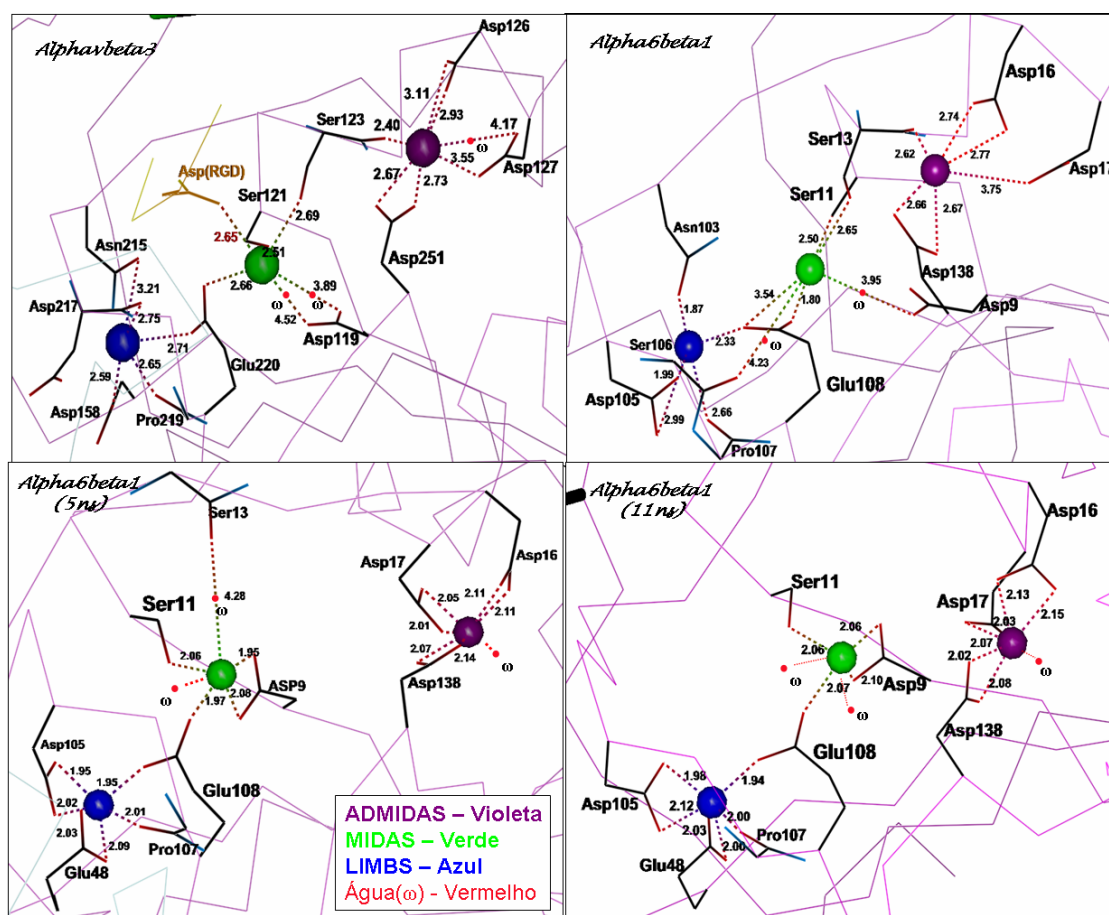
De posse dos modelos para as integrinas Alfa6beta1 e Alfa6beta1-*hybrid* construídos por homologia, foram inicializadas as simulações.

O estudo do complexo foi pensado para abranger a melhor modelagem possível para os sistemas, ou seja, algo o mais próximo possível de suas condições fisiológicas, mas que também pudesse ser executado em tempo computacional viável. O tempo total de computação na ferramenta GROMACS para dinâmica molecular foi de aproximadamente 57 dias.

A solvatação do sistema com moléculas de água, de forma a instituir uma camada de solvente em torno da proteína, numa geometria truncada (para condições periódicas de contorno), foi feita buscando-se o menor número possível de moléculas de solvente. O tamanho dos sistemas oscilaram entre 90 mil e 100 mil átomos aproximadamente. O campo de força utilizado foi o GROMOS96 e os parâmetros de carga escolhidos para os resíduos foram as representações de carga mais prováveis em *pH* fisiológico. Estes sistemas foram neutralizados pela substituição de moléculas de água por íons de cloro (Cl^-) nas posições mais favoráveis eletrostaticamente.

Os sistemas tiveram sua energia otimizada através do método de máximo

Figura 4.12: Coordenação dos Íons *MIDAS*, *ADMIDAS* e *LIMBS* no Modelo da Alfa6beta1.



Demonstração dos resíduos responsáveis pela coordenação nos íons *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS* no modelo da integrina alfavbeta3 e nos modelos alfa6beta1 inicial, após 5ns e 11ns. A cadeia lateral dos resíduos responsáveis pela coordenação é mostrada em *wire*, átomos de oxigênio em vermelho e carbono em preto. O aspartato do ligante RGD para a integrina alfavbeta3 está destacado em amarelo ouro. Moléculas de água representadas pelas esferas vermelhas (ω).

declive, com raios de corte para Coulomb e van Der Waals iguais a 9\AA , empregando-se o modelo de água SPC (*Simple Point Charge*) flexível, com um número máximo de interações limitado a 2000. Todos os cálculos realizados através do pacote GROMACS 3.3.1 foram realizados em precisão simples.

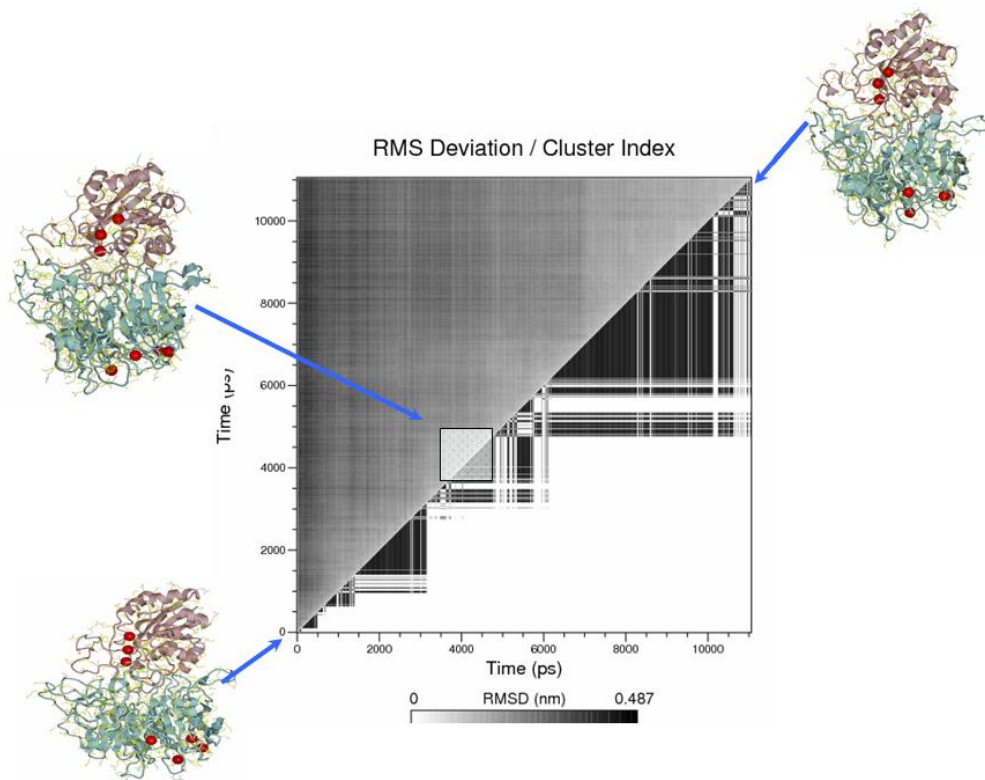
As simulações de DM foram de 11ns para alfa6beta1 e 10ns para alfa6beta1-*hybrid* para com isto alcançar uma estabilidade conformacional. Foram realizados 10 milhões de passos com δt igual a 1fs, a temperatura de 312K, pressão igual a 1atm e modelo de água SPC registrando-se coordenadas espaciais atômicas, energias e velocidades a cada 10 mil passos ($\delta t=10\text{ps}$).

Para o tratamento das interações eletrostáticas de longa distância foi utilizado o método PME (*Particle Mesh Ewald*) (Shan et al., 2005).

De acordo com a matriz de clusterização obtida da trajetória para as estruturas das integrinas alfa6beta1 e alfa6beta1/*hybrid*, não temos como comprovar a estabilidade do sistema após o período de 11ns e 10ns de DM respectivamente, podemos com isso somente averiguar a manutenção de um *cluster* por um determinado período de tempo. Devido à constante mudança estrutural, seria recomendável continuar estas simulações por aproximadamente mais 5ns(Fig.4.13; 4.14).

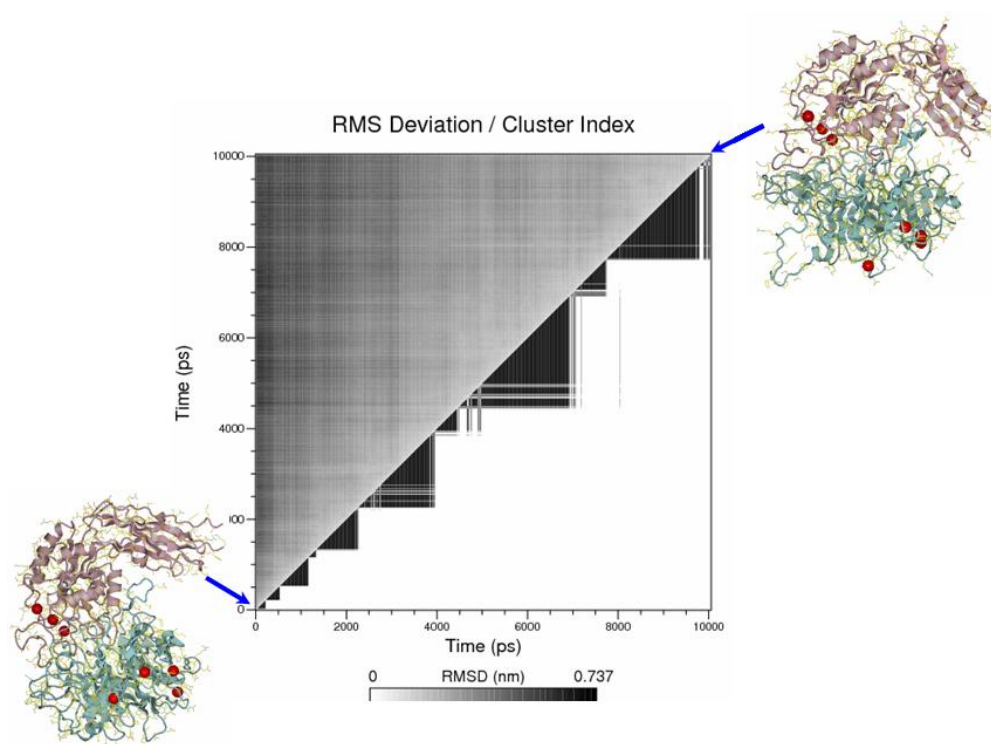
Foi observado para o modelo com o domínio β -*hybrid* que a conformação demonstra ser mais compactada após 10ns de DM, demonstrando que o ângulo de movimentação do domínio híbrido tenha sofrido alteração durante a simulação (Fig.4.14).

Figura 4.13: Matriz de Clusterização da Integrina Alfa6beta1.



Matriz de clusterização para o modelo da integrina alfa6beta1 sem o domínio hybrid.

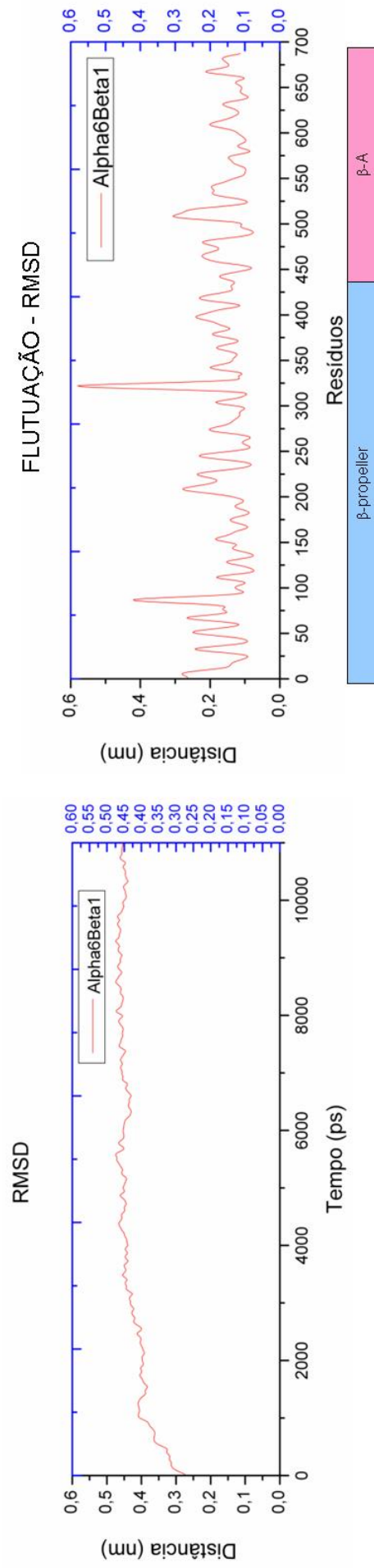
Figura 4.14: Matriz de Clusterização da Integrina Alfa6beta1-*Hybrid*.



Matriz de clusterização para o modelo da integrina alfa6beta1-*hybrid*.

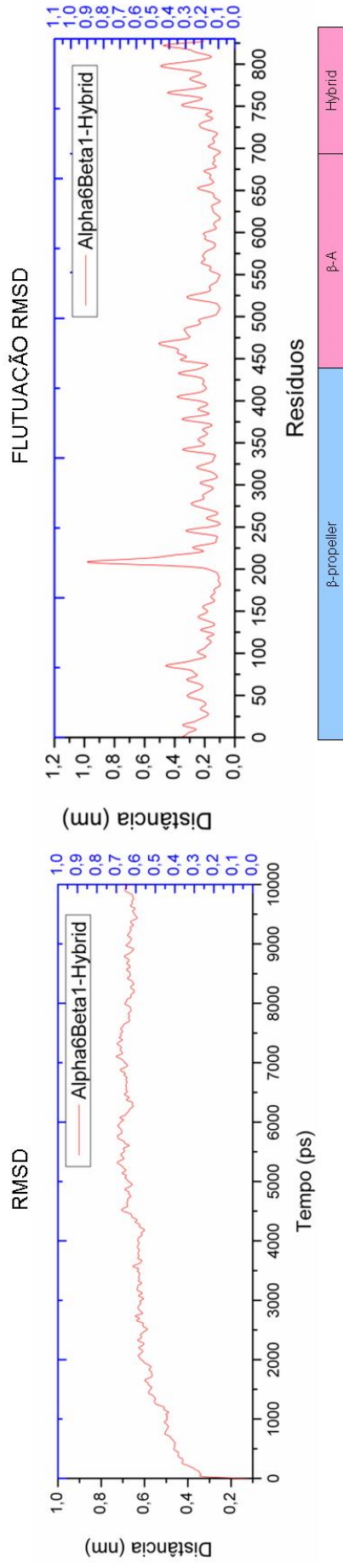
Os resultados que mostram as flutuações conformacionais das estruturas ao longo das simulações podem ser observados pela figura 4.15 (alfa6beta1) e figura 4.16 (alfa6beta1/*hybrid*). Os picos observados demonstram regiões onde ocorreu maior flutuação durante a DM, caracterizando uma maior flexibilidade pontual da estrutura. O gráfico da figura 4.16 para ambas as figuras demonstra o cálculo de RMSD da trajetória em comparação com a estrutura inicial.

Figura 4.15: Gráfico de RMSD e Flutuação de Estrutura para Integrina Alfa6beta1.



A-Gráfico do cálculo de RMSD da trajetória em relação a estrutura inicial. B-Gráfico de flutuação do sistema durante a simulação, representados pelo RMSD dos resíduos. A barra abaixo do gráfico representa os respectivos domínios em relação aos resíduos do gráfico.

Figura 4.16: Gráfico de RMSD e Flutuação da Estrutura para Integrina Alfa6beta1-Hybrid.



A-Gráfico do cálculo de RMSD da trajetória em relação a estrutura inicial . B-Gráfico de flutuação do sistema durante a simulação, representados pelo RMSD de cada resíduo. A barra abaixo do gráfico representa os respectivos domínios em relação aos resíduos do gráfico.

4.2 Construção do Modelo da ADAM2 e ADAM9

4.2.1 Identificação e Seleção da Proteína Molde

A primeira etapa do método da modelagem foi a identificação e seleção de pelo menos uma proteína de estrutura conhecida que serviu como *molde* para a determinação da estrutura das proteínas alvo ADAM2 e ADAM9 humanas. Para identificação da proteína com estrutura conhecida definida, ou seja, estrutura determinada por cristalografia de raio-X ou NMR, foi realizada uma busca através da comparação dos resíduos de aminoácidos de ADAM2 (Swiss-Prot - Q99965) e de ADAM9 (Swiss-Prot - Q13443) humanas na ferramenta *BlastP*. A busca resultou na identificação da estrutura da VAP1 (*Vascular apoptosis-inducing protein-1*) (Q9DGB9) resolvida por difração de raio X, com resolução de 3.0Å, como sendo adequada para uso como molde (PDB 2ERP) (Takeda et al., 2006).

VAP1 é um homodímero da classe PIII das SVMP isolada do veneno de *Crotalus atrox*. A sua estrutura revela que os resíduos importantes para a estabilização da arquitetura MDC (Metaloprotease, Disintegrina, rico em cisteína) dessa proteína são estritamente conservados entre todas as ADAMs (Takeda et al., 2006).

4.2.2 Estrutura da Arquitetura MDC (Metaloprotease, Disintegrina, Rico em cisteína)

A arquitetura MDC da VAP1 é mostrada nas figuras 4.17 A e B. O domínio metaloprotease (M-) do dímero apresenta seu sítio ativo em direções opostas e uma ponte dissulfeto intramolecular é formada entre os resíduos Cys365 de cada monômero (Fig.4.17-A) (Takeda et al., 2006; Igarashi et al., 2007).

O domínio M é seguido pelo domínio disintegrina (D), que esta subdividido em subdomínios Da - “arm” e Ds - “shoulder” (Fig. 4.17-A).

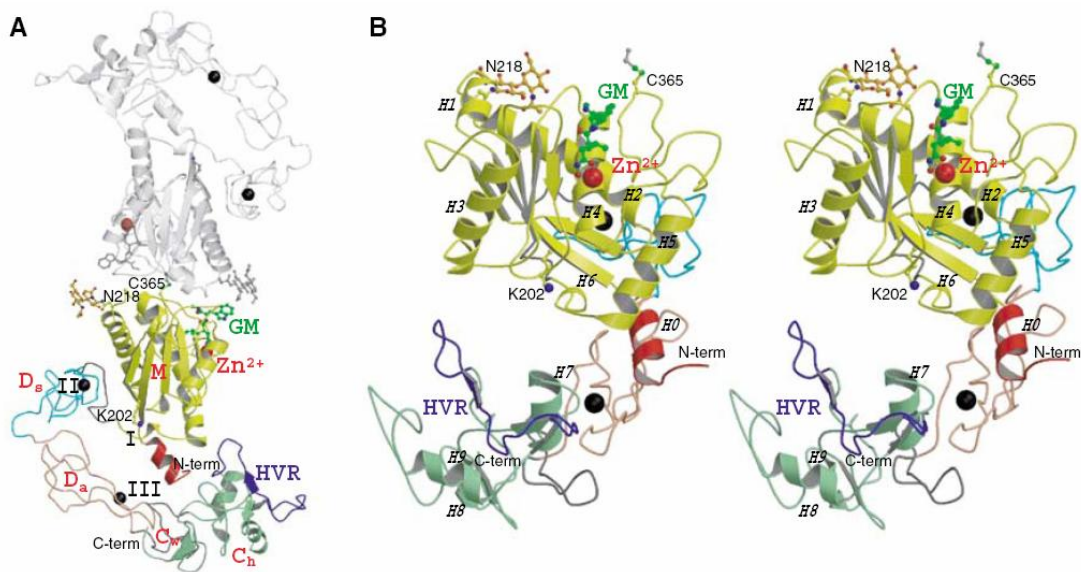
O domínio Ds é projetado a partir do domínio M fechando o sítio de ligação do Ca²⁺ (sítio I), oposto ao sítio catalítico. O domínio D apresenta uma formação como um “braço”, juntamente com o domínio rico em cisteína (C), apresentando uma superfície côncava em direção ao domínio M (Fig.4.17-B) (Takeda et al., 2006;

Igarashi et al., 2007).

O domínio C é uma continuidade do domínio D e está subdividido em subdomínios Cw “wrist” e Ch “hand” (Fig.4.17) (Takeda et al., 2006; Igarashi et al., 2007).

A porção distal do subdomínio Ch é uma região muito divergente, apresentando grande variação na seqüência de aminoácidos entre as proteínas da família das ADAM/reprolisina e adamalisina. Esta região foi designada de HVR (*hyper-variable-region*) e tem sido proposto que representa um sítio de ligação para reconhecimento de alvos (Fig.4.17 e Apêndice A Fig.A.1)(Takeda et al., 2006; Igarashi et al., 2007).

Figura 4.17: Arquitetura de uma proteína MDC.



Arquitetura de uma proteína MDC. A - Dímero da proteína VAP1, demonstrando domínio M, subdomínio Ds, Da, Cw e Ch e região HVR, mostrados somente em um monômero nas cores, vermelho, amarelo, cinza, azul claro, pink, verde e anil respectivamente. Os íons de Zinco e Cálcio são representados por esferas vermelhas e preta respectivamente. B - Representação estéreo do monômero (Extraído de Takeda et al. (2006).

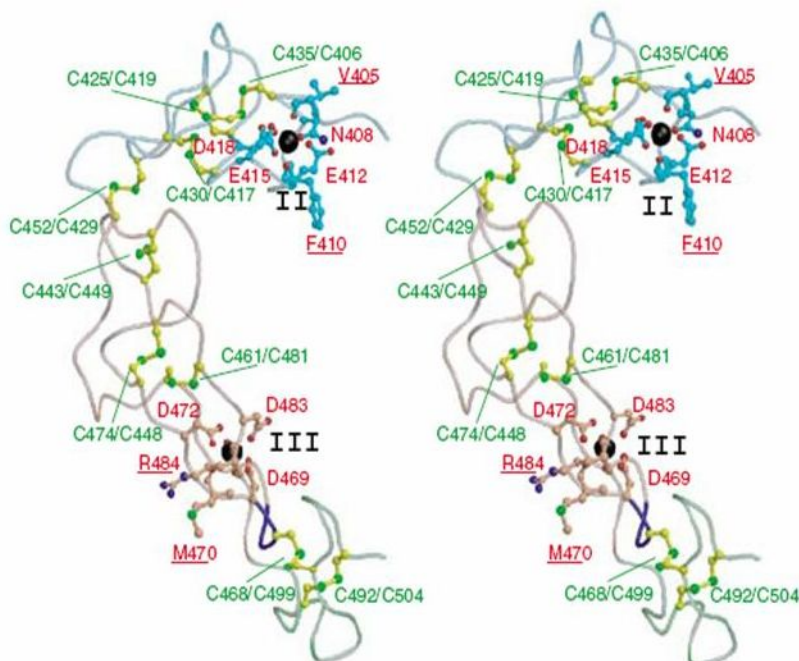
As seqüência RGD e ponte dissulfeto inter-cadeia descritos na estrutura utilizada como molde (VAP1), podem ser observadas no esquema de representação da arquitetura modular das proteínas SVMPs e ADAMs (Apêndice A Fig.A.1).

Ambos os domínios Ds e Da contém um sítio de ligação ao cálcio denominados sítio II e sítio III.

Os resíduos Glu412, Glu415 e Asp418 através de um grupo carboxila, e os átomos do oxigênio carbonil dos resíduos Asn408, Val405 e Phe410 estão envolvidos na coordenação bi-piramidal pentagonal e constituem o sítio II de ligação do Ca^{2+} , representado no subdomínio Ds (Fig.4.17-A e 4.18) (Takeda et al., 2006). Notavelmente esses resíduos são muito conservados entre todas as ADAMs.

Entretanto o grupo carboxila da cadeia lateral do Asp469, Asp472 e Asp483, e o oxigênio carbonil da Met470 e Arg484 formam a coordenação bi-piramidal pentagonal da ligação do cálcio do sítio III e está representado no subdomínio Da (fig.4.18 e 4.19) (Takeda et al., 2006; Igarashi et al., 2007).

Figura 4.18: Domínio tipo-disintegrina de VAP-1.



Domínio tipo-disintegrina de VAP-1. Domínios Ds, Da e Cw são mostrados em azul claro, rosa e verde claro, respectivamente. Os resíduos responsáveis pela coordenação dos íons de cálcio e pelas pontes dissulfetos, são mostrados em vermelho e verde respectivamente. Os resíduos que se apresentam sublinhados estão com os átomos de oxigênio carbonil coordenando o íon de cálcio, este representado pelas esferas pretas (Takeda et al., 2006).

4.2.3 Alinhamento das seqüências ADAM2, ADAM9, ADAM23, VAP1 E VAP2

Para uma melhor análise das estruturas homólogas entre as SVMPs e as ADAMs, foi realizado o alinhamento entre a seqüência da ADAM2 , ADAM9 e ADAM23 humanas e as SVMPs VAP1 e VAP2.

Através da comparação entre seqüências de várias ADAMs, observa-se que existem características de alta similaridade uma em relação a outra, porém pode-se observar variações representativas entre as proteínas alinhadas, sendo possível essas variações interferirem no reconhecimento de seus diferentes ligantes.

Após o alinhamento entre as seqüências correspondentes, foram realizadas as análises das regiões importantes como a identificação do sítio ativo da proteína, responsável pela atividade metaloprotease (HEXHXHXXGXXHD). Um ponto importante ressaltado foi a ausência das três histidinas do sítio catalítico dependentes de zinco para ADAM2 e ADAM23. Estas histidinas coordenam o zinco responsável pela atividade enzimática da proteína. Isto sugere que estas proteínas apresentem somente atividade de adesão, tendo perdido sua atividade protease.

Pode-se observar através do alinhamento regiões importantes onde estão destacados os resíduos que fazem a coordenação dos íons de cálcio responsáveis pela manutenção da estrutura. No sítio II de ligação ao cálcio os resíduos são conservados para todas as seqüências. Já no sítio III os resíduos apresentam maior variação (Fig.4.19).

4.2.4 Validação do Modelo

A qualidade do modelo predito determina a informação que pode ser extraída dele. O modelo pode ser avaliado com um todo, bem como em regiões individuais, com base na similaridade entre as seqüências do modelo e do alvo. Um requerimento básico para um modelo é ter uma boa qualidade estereoquímica.

A qualidade estereoquímica do modelo foi então avaliada com o programa PROCHECK e visualizada através do gráfico de Ramachandran e do gráfico dos parâmetros estereoquímicos para a cadeia lateral e principal. Os gráficos indicam uma boa qualidade para os modelos propostos, sendo que as taxas de ocupação no gráfico para as regiões mais favoráveis e regiões permitidas apresentam mais de 96% (ADAM2) (Fig.4.20) e mais de 97% (ADAM9) (Fig.4.21) dos resíduos de aminoácidos modelados sendo estes ângulos espacialmente possíveis, ou seja, estão dentro das regiões estatisticamente favoráveis do gráfico. A avaliação estrutural das cadeias principal e lateral de acordo com os parâmetros estereoquímicos considerados pelo PROCHECK está satisfatoriamente bem posicionada, quando comparados a estruturas experimentais com a mesma resolução (no caso 3Å) (Fig.4.20 e 4.21). Estes resultados, em conjunto com os resultados observados no gráfico de Ramachandran mostram que o modelo obtido é viável para continuidade do estudo.

A estrutura da ADAM9 após modelagem pode ser observada na figura 4.22, um monômero formado pelos domínios metaloprotease (M) com a presença do íon de zinco, pelo domínio tipo-disintegrina (D), subdividido em Ds e Da com a presença de dois íons de cálcio um em cada subdomínio e o domínio rico em cisteína (C).

Para uma melhor visualização da estrutura modelada em relação ao *molde*, geramos uma figura com a sobreposição das estruturas VAP1 e ADAM (Fig.4.23-A). Observam-se poucas variações no enovelamento da proteína. Estas variações geralmente presentes em regiões de *loops*, são características das zonas hipervariáveis entre as seqüências homólogas. Ambos os subdomínios Da e Ds foram mod-

Figura 4.20: Gráfico de Ramachandran e Gráfico de Parâmetros da Cadeia Lateral e Cadeia Principal da ADAM2.

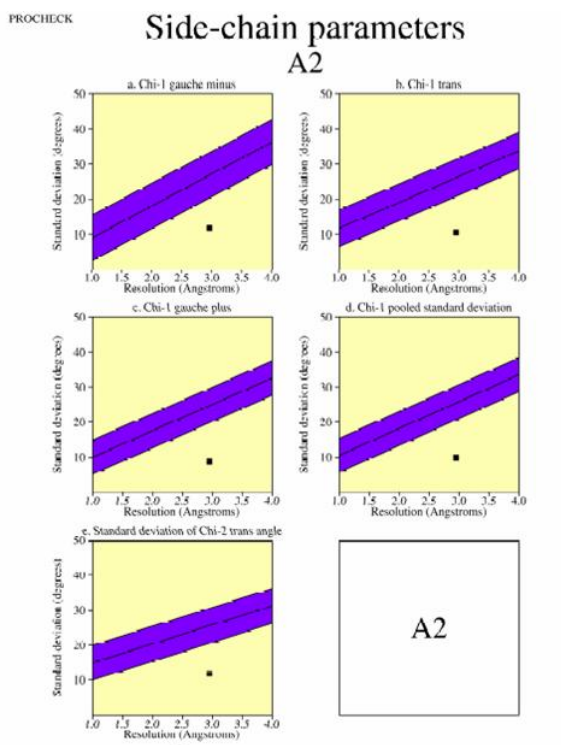
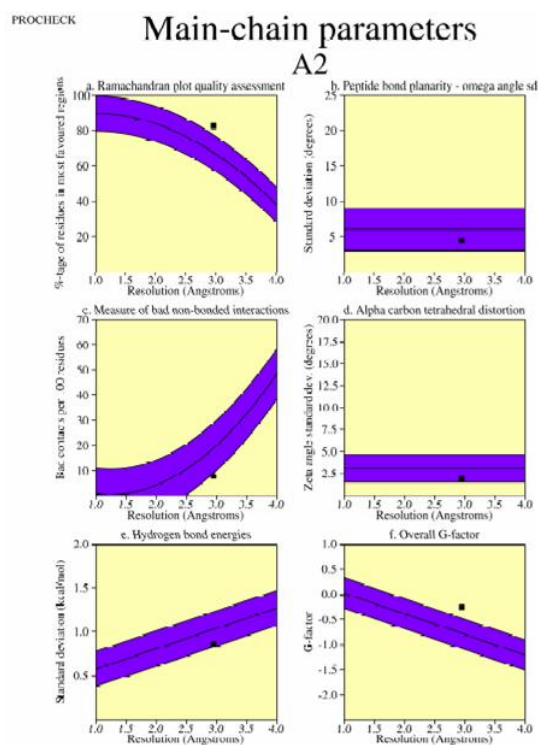
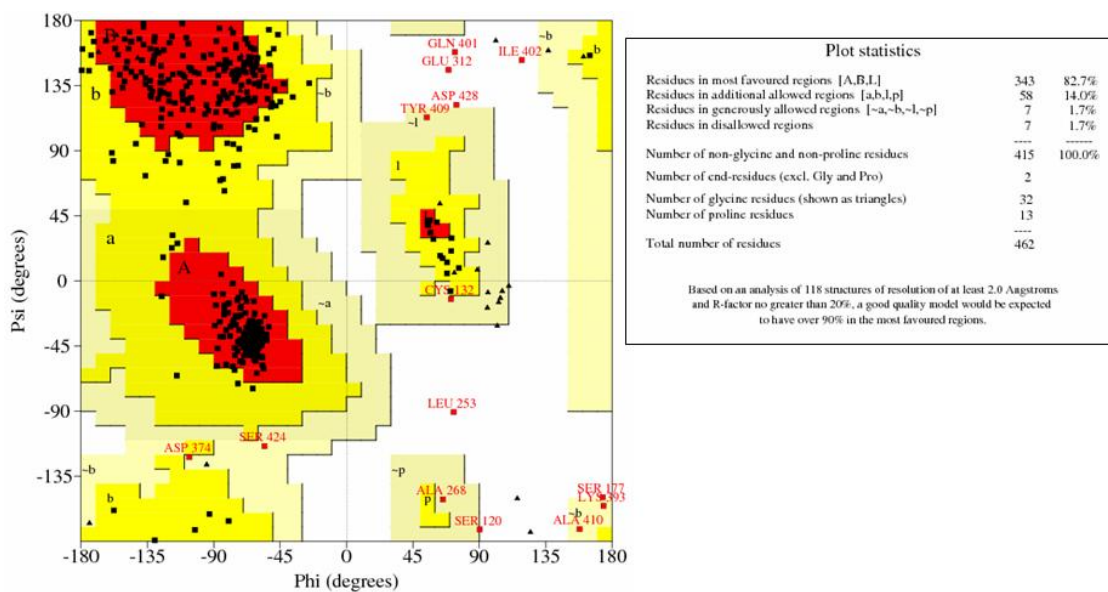
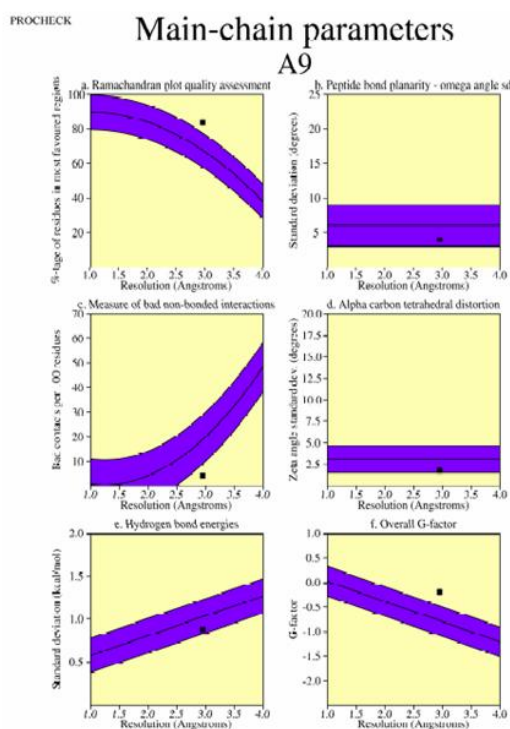
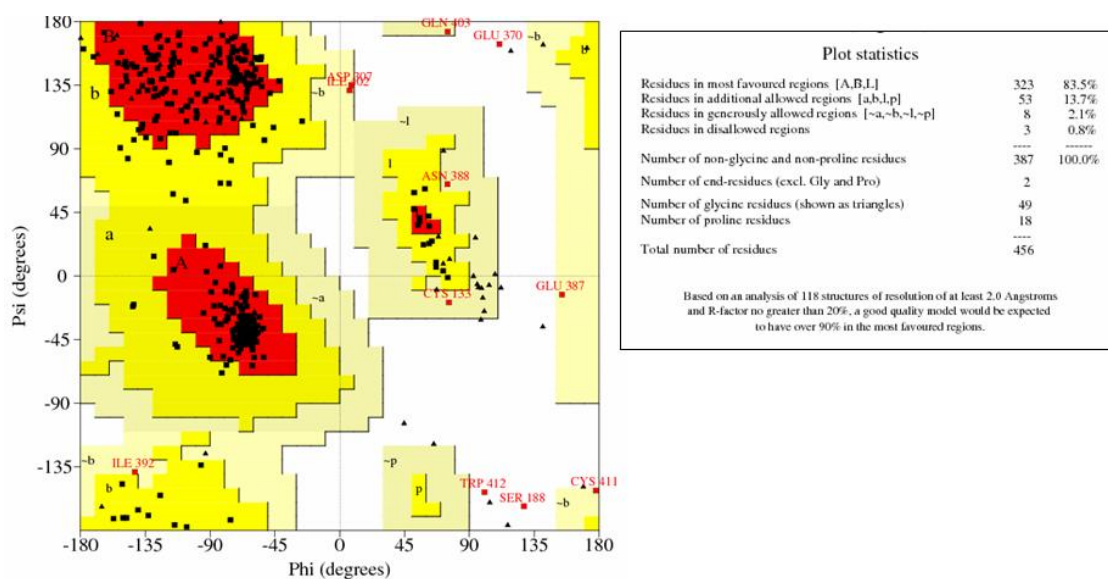
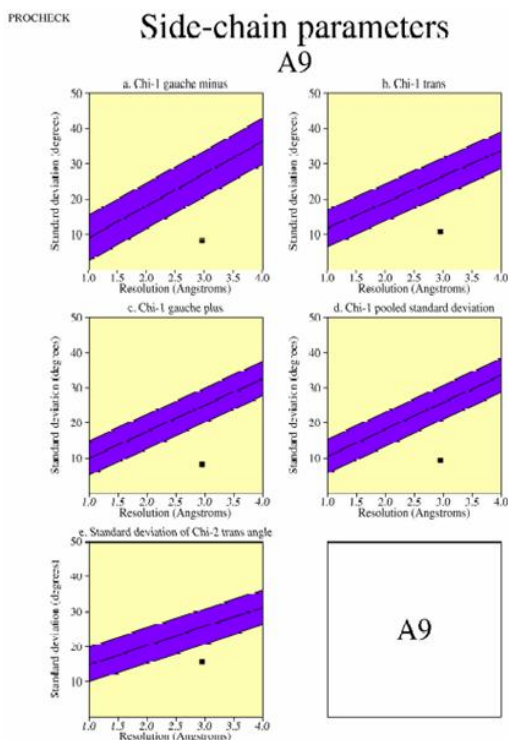


Gráfico de Ramachandran e gráfico de parâmetros da cadeia lateral e cadeia principal correspondente ao modelo da ADAM9. Após a modelagem pode se observar que a maioria dos resíduos da estrutura encontra-se em regiões favoráveis (vermelho) e regiões permitidas (amarelo)

Figura 4.21: Gráfico de Ramachandran e Gráfico de Parâmetros da Cadeia Lateral e Cadeia Principal da ADAM9.



Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values	No. of bond widths from mean	
			Typical value	Bad width	
a. %-tage residues in A, B, L	387	83.5	67.6	10.0	1.6 BETTER
b. Omega angle st dev	455	4.0	6.0	3.0	-0.7 Inside
c. Bad contacts / 100 residues	19	4.2	18.9	10.0	-1.5 BETTER
d. Zeta angle st dev	407	1.8	3.1	1.6	-0.8 Inside
e. H-bond energy st dev	238	0.9	1.0	0.2	-0.7 Inside
f. Overall G-factor	456	-0.2	-0.8	0.3	1.9 BETTER



Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values	No. of bond widths from mean	
			Typical value	Bad width	
a. Chi-1 gauche minus st dev	63	8.2	26.8	6.5	-2.9 BETTER
b. Chi-1 trans st dev	132	10.8	26.0	5.3	-2.9 BETTER
c. Chi-1 gauche plus st dev	166	8.2	24.7	4.9	-3.4 BETTER
d. Chi-1 pooled st dev	361	9.4	25.4	4.8	-3.3 BETTER
e. Chi-2 trans st dev	97	15.8	25.5	5.0	-1.9 BETTER

Gráfico de Ramachandran e gráfico de parâmetros da cadeia lateral e cadeia principal correspondente ao modelo da ADAM9. Após a modelagem pode se observar que a maioria dos resíduos da estrutura encontra-se em regiões favoráveis (vermelho) e regiões permitidas (amarelo).

elados inicialmente com o sítio de ligação ao íon de cálcio.

Figura 4.22: Diagrama Modular da ADAM9.

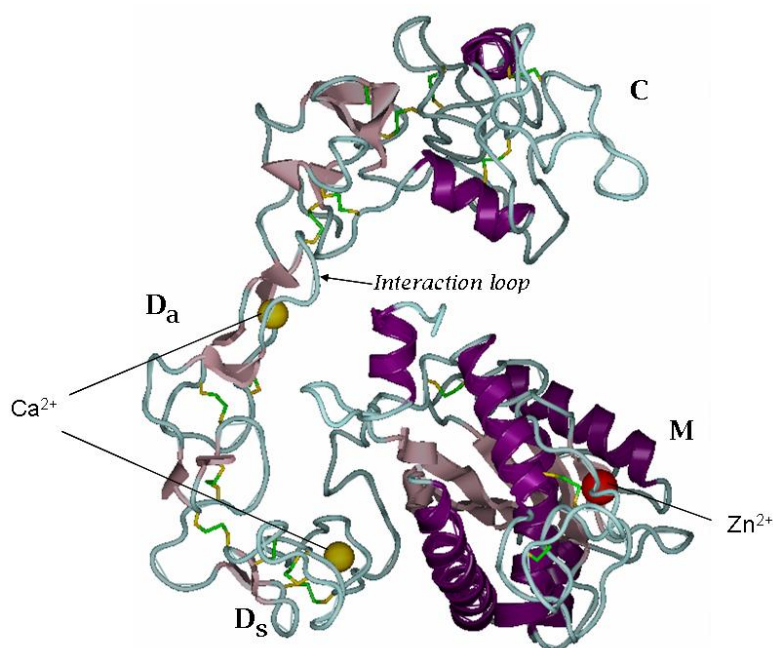


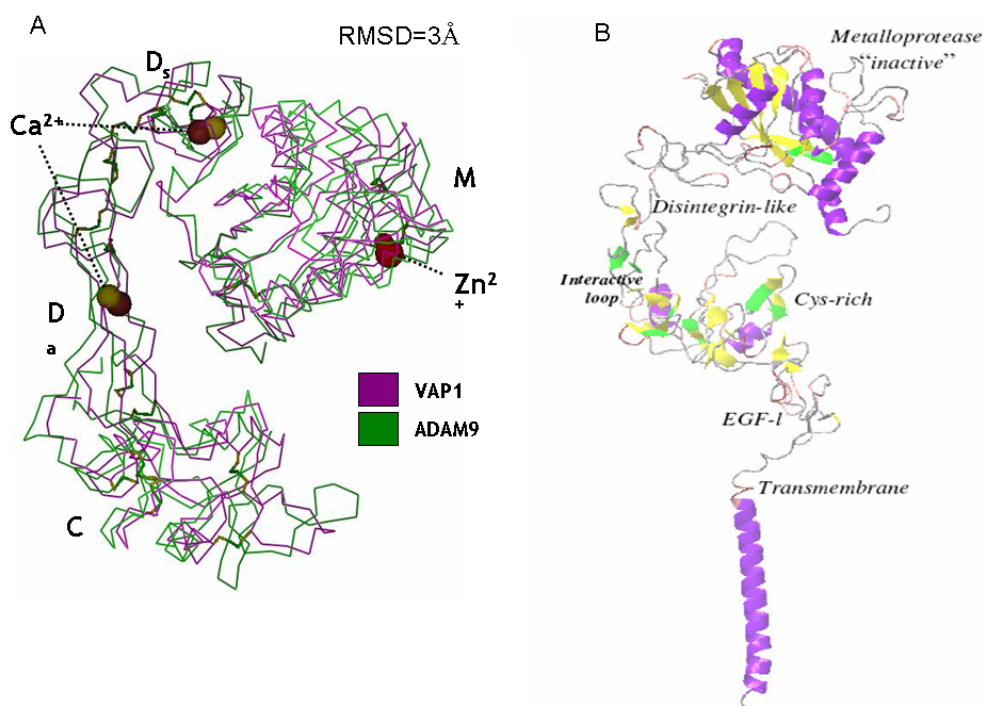
Diagrama da ADAM9 demonstrando os domínios metaloprotease (M), Disintegrina-*like* (Da - "arm", Ds - "shoulder"), rico em cisteína (C) e loop reativo. Os íons de cálcio e zinco estão representados pelas cores amarelo e vermelho respectivamente.

No domínio M está localizado o íon de Zinco que confere à proteína atividade catalítica, como pode ser observado para o modelo da ADAM9. Para o modelo da ADAM2 não é apresentado o íon de zinco do domínio M, sendo esta proteína inativa. (Fig.4.23-A). Muitas ADAMs apresentam adicionalmente domínio EGF-*like*, transmembrana e citoplasmático, sendo associadas à membrana (Fig.4.23-B).

Sabe-se da importância dos íons de cálcio para a manutenção da estrutura do domínio tipo-disintegrina das ADAMs. O subdomínio Da apresenta um sítio de ligação ao cálcio, responsável pela manutenção do loop reativo da proteína VAP1 (Fig.4.24-A-D). A coordenação do íon de cálcio do sítio III na estrutura molde (VAP1) é mantida pela ligação do grupo carboxila da cadeia lateral dos resíduos Asp469, Asp472 e Asp483 e pelo oxigênio carbonil da Met470 e Arg484 (Fig.4.24-B-D), (Takeda et al., 2006). Já na estrutura alvo (ADAM2) a coordenação é mantida pelo grupo carboxila da cadeia lateral dos resíduos Asp298, Glu301 e pelo oxigênio carbonil da Leu299 Asn313 e His314 (Fig.4.24-C-D).

No domínio tipo-disintegrina ocorre a presença de 15 resíduos de cisteína jun-

Figura 4.23: Sobreposição da Estrutura da VAP1 e ADAM-Humana.



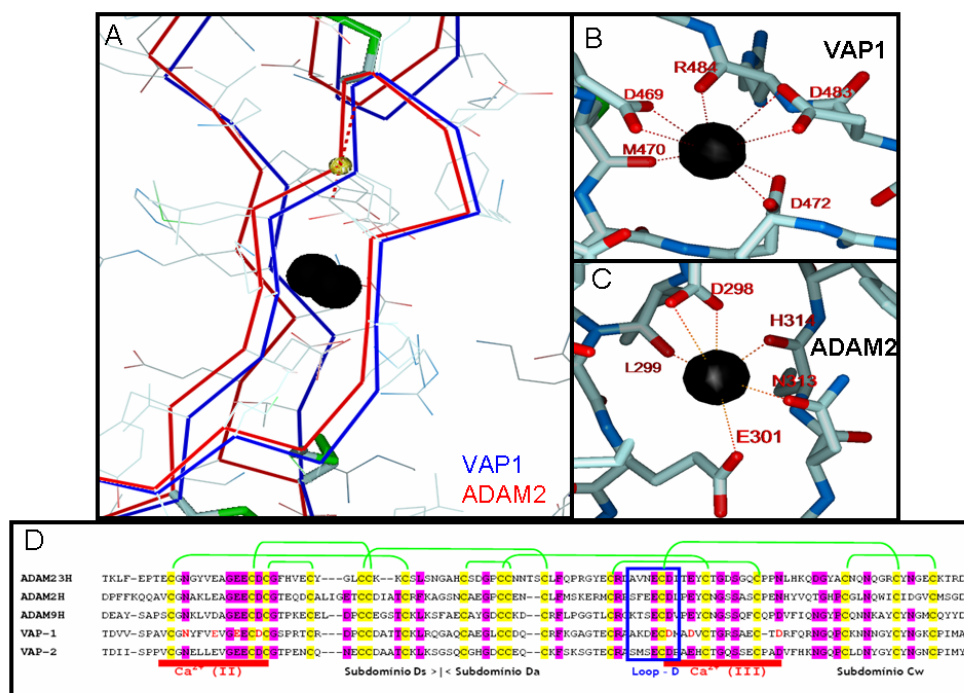
A-Sobreposição da estrutura da VAP1 e ADAM-Humana demonstradas em violeta e verde respectivamente. B-Estrutura completa de uma proteína ADAM demonstrando os domínios metaloprotease inativa, domínio tipo-disintegrina, rico em cisteína, EGF-like, transmembrana e domínio citoplasmático.

tamente com mais três resíduos na porção N-terminal do domínio rico em cisteína (subdomínio Cw) levando à formação de 9 pontes dissulfetos em um rearranjo estrutural do domínio responsável por se ligar à proteína alvo, mantendo como dito anteriormente a estrutura do loop reativo (Fig.4.24-D).

A cisteína do triplete ECD (Cys466) é responsável pela formação de uma ligação dissulfídica com outro resíduo adicional de cisteína (Cys498) presente no subdomínio Cw (Igarashi et al., 2007).

Os domínios tipo-disintegrina possuem dois resíduos cisteína adicionais, quando comparados com as disintegrinas-RGD e, portanto, o arranjo de pontes dissulfetos entre estas proteínas parece ser diferente. Uma hipótese seria a de que uma destas cisteínas estaria envolvida em uma ligação dissulfeto entre a região amino-terminal do domínio tipo-disintegrina e o domínio proteolítico. O segundo resíduo cisteína faz parte de outra ligação dissulfeto com o domínio rico em cisteína. Este arranjo

Figura 4.24: Comparação do Domínio Tipo-disintegrina (subdomínio Da e Ds) das Proteínas ADAM2, ADAM9 e ADAM23 Humanas e SVMPs VAP1 e VAP2 da Classe PIII.



Comparação do domínio tipo-disintegrina (subdomínio Da e Ds) das proteínas ADAM2, ADAM9 e ADAM23 humanas e SVMPs VAP1 e VAP2 da classe PIII. A- alinhamento estrutural do loop reativo do subdomínio Da da VAP1 e ADAM2h representado em azul e vermelho respectivamente, com o sítio-III de ligação ao cálcio; B- representação das coordenadas do íon de cálcio (esfera preta) da estrutura modelo (VAP1-SVMP); C- coordenação do íon de cálcio (esfera preta) da estrutura da ADAM2h; D- alinhamento entre as proteínas ADAM2, ADAM9 e ADAM23 humanas e VAP1 e VAP2 das SVMP. Os sítios de ligação ao Ca²⁺ são representados por uma barra vermelha com os resíduos responsáveis pela coordenação destacados em vermelho. Somente no caso da estrutura modelo (VAP1), os resíduos responsáveis pelo triplete do *loop* reativo estão destacados por um retângulo azul, e os resíduos de cisteína que são responsáveis pelas ligações dissulfídicas estão destacados em amarelo.

forma uma estrutura contínua, interconectada por pontes dissulfetos entre a região espaçadora e os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína (*cisteína-rich*). Além disso, a presença do resíduo cisteína adicional na seqüência ECD tornaria a topologia do domínio tipo-disintegrina nesta área bastante diferente daquela observada nas disintegrinas-RGD (Jia et al., 1997), levando com isso a uma conformação diferenciada do loop reativo (Fig.4.24-D).

4.2.5 Análise da Arquitetura Estrutural Proposta para as Proteínas ADAM2 e ADAM9 após Dinâmica de 2ns

De posse dos modelos para as proteínas ADAM2 e ADAM9 construídos por homologia como descrito acima no ítem 4.2, foram inicializadas as simulações.

O estudo do complexo foi pensado para envolver a melhor modelagem possível para os sistemas ADAM2 e ADAM9, isto é, algo o mais próximo de suas condições fisiológicas, mas que atendesse ao objetivo deste estudo. O tempo total de computação na ferramenta GROMACS (Spoel et al., 2005) para dinâmica molecular foi de aproximadamente 8 dias.

A solvatação com moléculas de água, de forma a instituir uma camada de solvente em torno da proteína, numa geometria truncada (para condições periódicas de contorno), seria feita buscando-se o menor número de moléculas de água possível. O tamanho dos sistemas ficaram oscilando entre 60 mil e 65 mil átomos aproximadamente para ADAM9 e ADAM2 respectivamente.

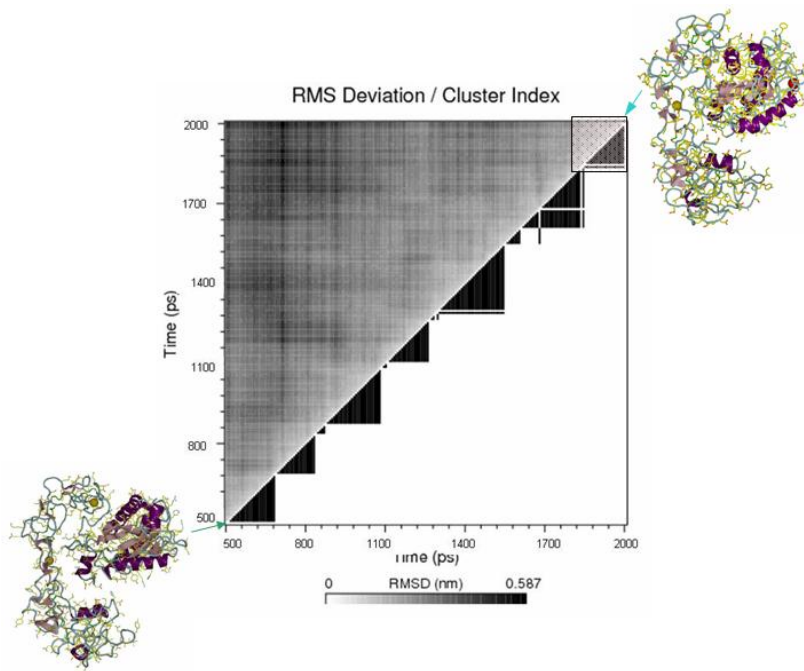
O campo de força utilizado foi o GROMOS96 (Oostenbrink et al., 2004) e os parâmetros de carga escolhidos para os resíduos foram padrões, isto é, representações de carga mais prováveis quando dos resíduos em *pH* fisiológico. Estes sistemas foram neutralizados pela substituição de moléculas de água por íons de cloro (Cl^-) ou sódio (Na^+) nas posições mais favoráveis eletrostaticamente.

Os sistemas foram otimizados através do método de máximo declive, com raios de corte para Coulomb e van Der Waals iguais a 9\AA , empregando-se o modelo de água SPC sem restrições com um número máximo de interações limitado a 2000. Todos os cálculos realizados através do pacote GROMACS 3.2.1/3.3.1 foram realizados em precisão simples.

As simulações de DM para cada uma das proteínas foram de 500ps com restrição para todas as interações (*all-bonds*) para acomodação da estrutura e posteriormente foram acrescentados mais 1.5ns de DM para com isto alcançar uma estabilidade conformacional. Condições: 2 milhões de passos com δt igual a 1fs , a temperatura de 312K e pressão igual a 1atm , modelo de água SPC, registrando-se

coordenadas espaciais atômicas, energias e velocidades a cada 5 mil passos. Para o tratamento das interações eletrostáticas de longa distância foi utilizado o método PME (*Particle Mesh Ewald*) (Shan et al., 2005).

Figura 4.25: Matriz de Clusterização da ADAM2.

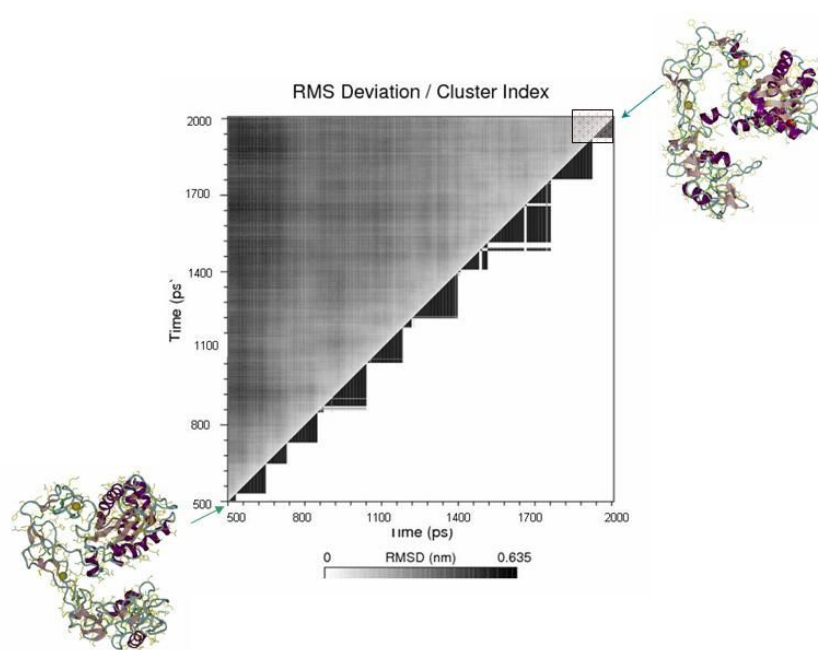


Matriz da clusterização para a proteína ADAM2 durante o período de 2ns de DM, com especificação da estrutura inicial e final.

De acordo com as matrizes de clusterização observamos que ocorreu a formação de um novo cluster por volta de 1.8ns para ADAM2 (Fig.4.25) e 1.9ns para ADAM9 (Fig.4.26). Não temos como comprovar a estabilidade do sistema, somente verificar a manutenção de um cluster por um determinado período de simulação, mas pela constante mudança estrutural é recomendável continuar estas simulações por pelo menos mais 5ns. Foi notada ainda a abertura gradativa da arquitetura MDC, sugerindo que a estrutura real das ADAMs é menos compacta que o representado pelas estruturas resolvidas por raios-X de VAP1 e VAP2 (Takeda et al., 2006; Igarashi et al., 2007).

Os resultados que mostram as flutuações conformacionais das estruturas ao longo de suas respectivas dinâmicas podem ser observados pela figura 4.27 (ADAM2) e figura 4.28 (ADAM9). Os picos vistos em cada gráfico indicam os

Figura 4.26: Matriz de Clusterização da ADAM9.



Matriz da clusterização para a proteína ADAM9 durante o período de 2ns de DM, com especificação da estrutura inicial e final.

pontos onde houve maior flutuação durante a dinâmica, caracterizando uma maior flexibilidade da estrutura no local. Como os picos nunca ultrapassam a 5\AA , ficando a grande maioria num valor inferior a 3\AA , somente o domínio rico em cisteína apresenta maior flexibilidade durante a simulação.

A partir desses dados pode se concluir que os modelos ainda não apresentam estabilidade, pois a arquitetura MDC esta se abrindo e ocorrendo a formação de novos *clusters* para ambas as proteínas.

4.2.6 Escolha do Domínio ADAM $dsld$ para Modelagem da Interação de ADAM2 e ADAM9 com a Integrina Alfa6beta1

Disintegrinas são proteínas (40 a 90 aa) isoladas tipicamente de veneno de serpente. Apresentam uma seqüência de reconhecimento Arg-Gly-Asp (RGD) responsável pela inibição da agregação plaquetária através da ligação com a integrina alfaIIbeta3 (Apêndice A Fig.A.1) (Calvete, 2005; Xiong et al., 2002). ADAMs são as únicas proteínas de superfície celular que apresentam domínio disintegrina

Figura 4.27: Gráfico da Flutuação da Estrutura de ADAM2.

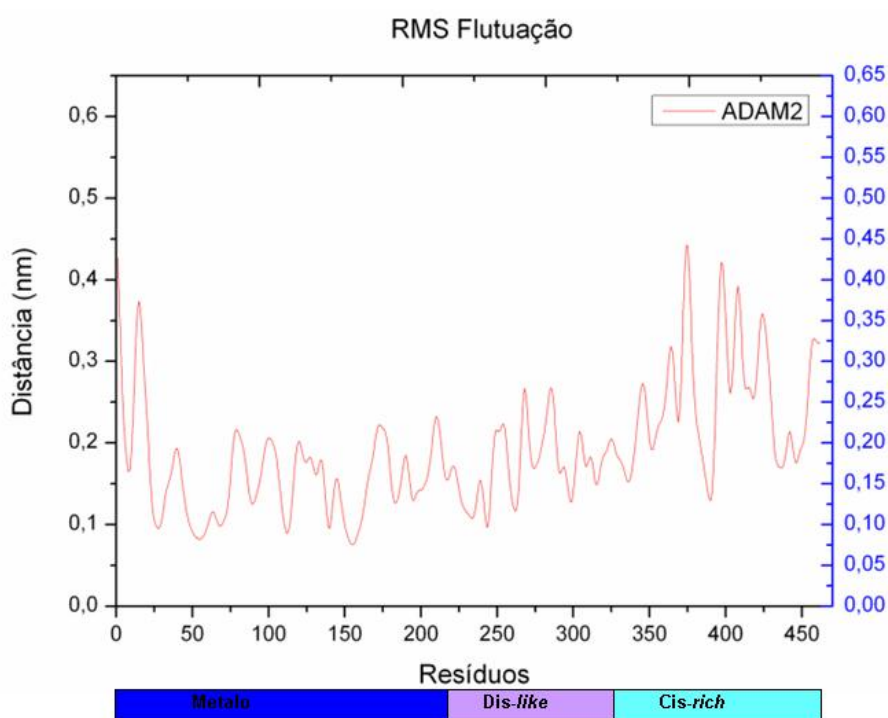


Gráfico da flutuação do sistema durante a simulação, representada pelo RMSD. A barra abaixo representa os respectivos domínios em relação aos resíduos do gráfico.

(Takeda et al., 2006). Entretanto, a sequência RGD das disintegrinas é usualmente substituída por XXCD nas ADAMs e seu potencial de adesão a diferentes integrinas tem sido controverso (Takeda et al., 2006). Ambos os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína das ADAMs estão envolvidos nas interações proteína-proteína (Gaultier et al., 2002), entretanto, os detalhes de interação são indefinidos, pois nenhuma informação estrutural se encontra disponível para o domínio C das ADAMs (Takeda et al., 2006).

Depois de realizada modelagem e posteriormente dinâmica das proteínas ADAM2 e ADAM9, realizamos a separação do domínio tipo-disintegrina de ADAM2 (resíduos Gln229 - Gly320) e ADAM9 (resíduos Ala225 - Gly314) e região N-terminal do domínio rico em cisteína de ADAM2 (resíduos His321 - Ser336) e ADAM9 (resíduos Tyr315 - Tyr330). A região N-terminal do rico em cisteína foi preservada para manutenção da ligação da cisteína do motivo ECD, o qual forma uma ponte dissulfeto com outra cisteína presente no domínio rico em cisteína. Esta

Figura 4.28: Gráfico da Flutuação da Estrutura de ADAM9.

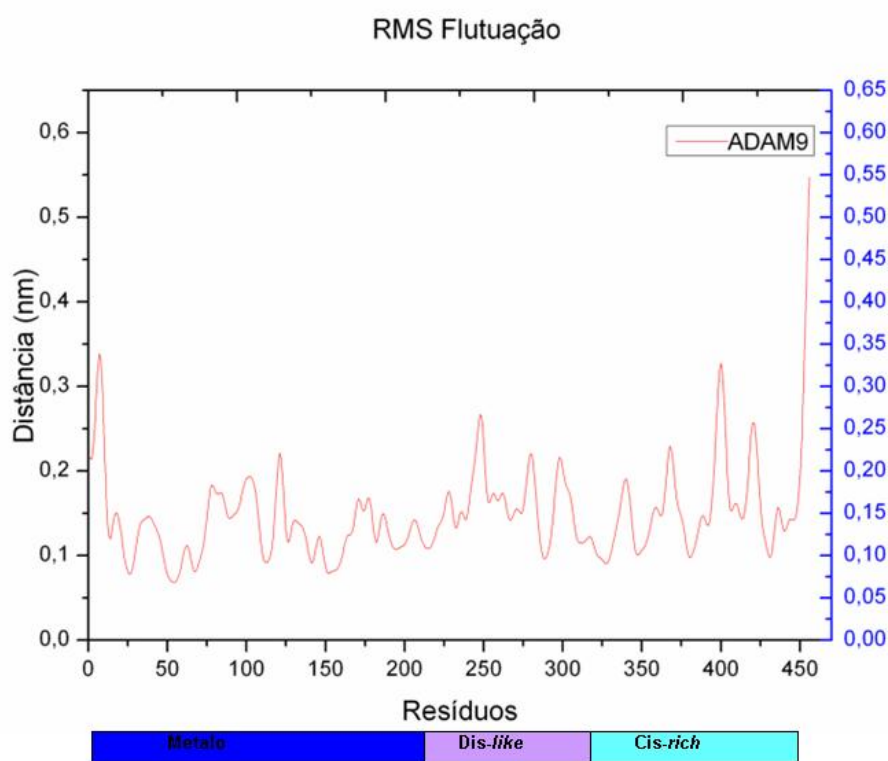


Gráfico da flutuação do sistema durante a simulação, representada pelo RMSD. A barra abaixo representa os respectivos domínios em relação aos resíduos do gráfico.

ligação está envolvida na conformação do *loop* reativo da proteína.

As disintegrinas são proteínas capazes de se ligar às integrinas e interferir de inúmeras maneiras com sua função. O termo disintegrina foi inicialmente proposto em 1989, para descrever um grupo de peptídeos ricos em cisteína e de massa molecular entre 5 e 9 KDa, os quais interagem com as integrinas presentes na superfície celular (Gould et al., 1990; Niewiarowski et al., 1994). Estas moléculas foram originalmente descritas em veneno de serpente (SVMP), como potentes inibidores de agregação plaquetária (Gould et al., 1990; Niewiarowski et al., 1994). De acordo com experimentos realizados com venenos de serpente (*Trimeresurus gramineus*, *Agkistrodon rhodostoma*) (Ouyang e Huang, 1983; Huang et al., 1984; Ouyang e Huang, 1984; Huang et al., 1987) pesquisadores comprovaram a inibição da ligação do fibrinogênio a plaquetas ADP-estimuladas por ligação à glicoproteína IIb/IIIa (integrina AphaIIbBeta3) na superfície plaquetária.

A partir deste conhecimento através da literatura de um inibidor para integrina, nossa estrutura de estudo foi especialmente desenhada para a modelagem do complexo integrina alfa6beta1-ADAM*dsld*, por ser conhecido que o domínio disintegrina das ADAMs apresenta homologia com as SVMPs. O intuito foi apresentar esta estrutura como um potente inibidor/competidor do sítio de ligação das integrinas.

Na figura 4.29-A podem ser observados os resíduos responsáveis pela formação das ligações dissulfídicas. Os resíduos de cisteína são bem conservados entre as estruturas alinhadas, favorecendo a manutenção estrutural do domínio. A sobreposição do domínio tipo-disintegrina da VAP1(*molde*) e ADAM2/ADAM9 foi realizada com o intuito de se observar possíveis diferenças no *loop* de interação com o cálcio do sítio III (Fig.4.29-B). Através do alinhamento (Fig.4.29-C) é vista uma substituição de um dos Asp do sítio III de ligação ao cálcio, sendo este substituído por uma Asn para ADAM2.

4.3 Modelagem dos Complexos Integrina Alfa6beta1-ADAM2/ADAM9

4.3.1 Construção do Modelo de Interação da Integrina Alfa6beta1-ADAM2*dsld* e ADAM9*dsld*

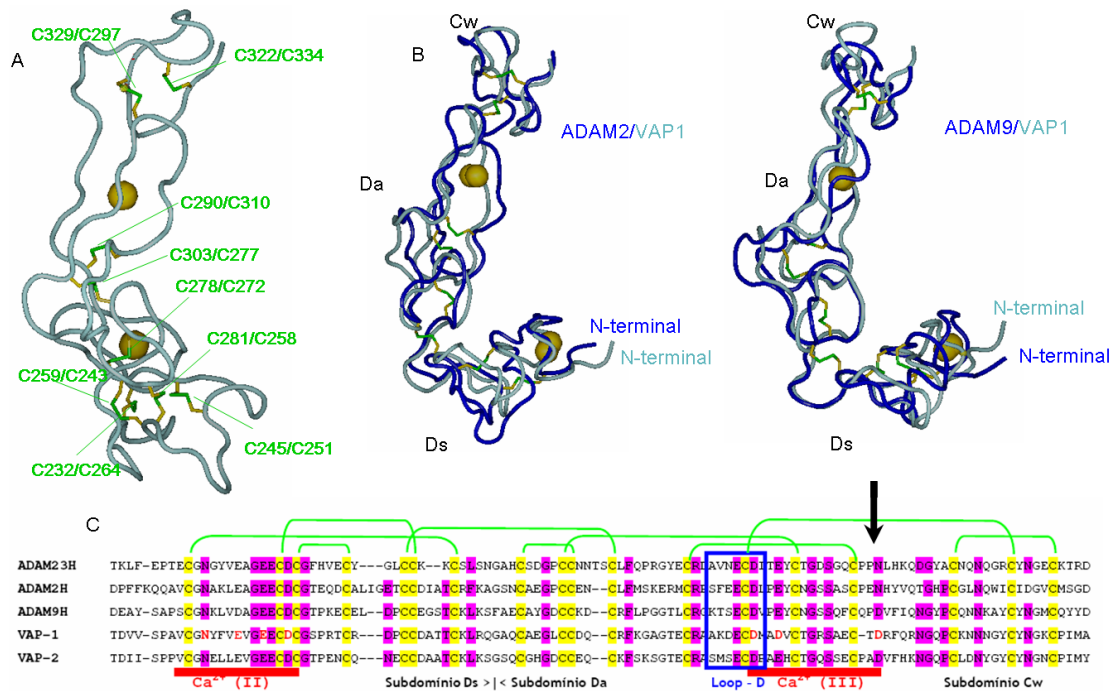
Após solvatação e equilíbrio do sistema da integrina alfa6beta1 e do modelo da ADAM2 e ADAM9 ambas humanas, foi então construído o modelo do complexo para o estudo do mecanismo de adesão integrina alfa6beta1-ADAM2, alfa6beta1-ADAM9 e suas interações.

O modelo do complexo foi construído somente com a cabeça da integrina alfa6beta1 e o domínio tipo-disintegrina e a porção N-terminal do domínio rico em cisteína (*dsld*) da ADAM2 e ADAM9. A escolha da região do domínio rico em cisteína das ADAMs foi determinada pela formação de uma ligação dissulfídica entre os dois domínios D e C (Fig.4.29-C). Definimos trabalhar especificamente com esta região da integrina e ADAM pela interação existente entre o domínio tipo-disintegrina e a integrina. Esta interação está fortemente relacionada com

a ruptura da ligação de integrinas com a matriz extracelular e a competição pelo sítio de ligação destas. As interações e os efeitos biológicos do domínio tipo-disintegrina envolvem o bloqueio da ação de ligantes, como por exemplo a laminina, que é um ligante específico para alfa6beta1.

Bigler et al. (2000) demonstraram que um cátion divalente (sítio *MIDAS*) poderia ser coordenado pelo motivo de ligação ECD. Esta condição auxilia a observação de que um resíduo ácido é importante para a ligação de integrinas. De acordo com a literatura, um bom inibidor requer no mínimo um dos resíduos ácidos (D ou E) adjacentes à cisteína conservados (Gupta et al., 1996).

Figura 4.29: Domínio Tipo-disintegrina de ADAM2 e ADAM9.



A-Domínio tipo-disintegrina de ADAM2 e ADAM9. Os resíduos responsáveis pelas pontes dissulfetos, são mostrados em verde. B-Sobreposição de ADAM2 e ADAM9 com VAP1. C- Alinhamento do domínio tipo-disintegrina e região N-terminal do domínio rico em cisteína. Os sítios de ligação ao Ca²⁺ são representados por uma barra vermelha com os resíduos responsáveis pela coordenação destacados em vermelho. Somente no caso da estrutura modelo (VAP1), os resíduos responsáveis pelo triplete do *loop* relativo estão destacados por um retângulo azul. Resíduos de cisteína que são responsáveis pelas ligações dissulfídicas estão destacados em amarelo.

Um dos pontos importantes que tentamos manter para a seleção da estrutura do domínio inibidor foram os 15 resíduos de cisteína presentes nos subdomínios Da - “arm” e Ds “shoulder” (domínio D), juntamente com mais três resíduos de

cisteína na porção N-terminal do subdomínio Cw, sendo esta uma continuidade do domínio D. (Fig.4.29-A). A manutenção desta região é importante para um rearranjo estrutural do domínio responsável pela adesão à proteína *alvo*.

Sabe-se da importância do cálcio para a manutenção do domínio tipo-disintegrina das ADAMs, sendo também esses íons mantidos durante a seleção da região representada como ligante para alfa6beta1. Os subdomínios Ds e Da apresentam um sítio de ligação ao cálcio, sítio II e sítio III respectivamente (Fig.4.29-A-B).

Os resíduos que mantêm a coordenação do cálcio no sítio III diferem em um aminoácido entre a ADAM2 e ADAM9, sendo o aspartato (D) substituído por uma asparagina (N) (Fig.4.29-C), podendo ou não levar a uma conformação estrutural diferenciada entre as ADAMs. Os cátions divalentes na integrina possuem um papel fundamental na formação do sítio de ligação, responsável pela atração de resíduos do ligante carregados negativamente ao sítio de ligação.

O modelo do complexo alfa6beta1-ADAM2*dsld*, foi construído a partir do posicionamento do Glu305 (motivo SFE) em contato com o sítio MIDAS (distância 2.65Å), sendo o domínio *dsld* disposto em contato com a integrina alfa6beta1. Para o complexo alfa6beta1-ADAM9*dsld*, o modelo foi gerado a partir do posicionamento da Ser303 (motivo KTS) em contato com o MIDAS (distância 3.05Å). O modelo criado provê um melhor entendimento sobre a conformação espacial e possivelmente um melhor esclarecimento sobre as interações entre ligantes naturais e moléculas antagonistas.

4.3.2 Coordenação dos Íons *MIDAS*, *ADMIDAS* e *LIMBS* para o Complexo Alfa6beta1-ADAM2*dsld*

Como descrito para o modelo da integrina alfa6beta1, os resíduos que participam da coordenação dos íons Mg²⁺ presentes na estrutura molde (alfavbeta3) foram conservados também no modelo, entretanto o resíduo glutamato (motivo SFE) do ligante(*dsld*) foi posicionado em contato com o sítio *MIDAS*.

No modelo de interação obtido para a integrina alfa6beta1 em contato com o

domínio ADAM2*dsl*d, a cadeia lateral (grupo carboxila) dos resíduos Asp9, Glu108, o grupo hidroxila da Ser11 e Ser13, e o grupo carboxila do Glu308 do ligante (motivo SFEECD) que se encontram a distâncias de 2.63Å e 2.65Å do MIDAS, são responsáveis pela manutenção da coordenação no modelo inicial (Fig.4.30). A coordenação do resíduo Asp9 (3.81Å) provavelmente é mediada por uma molécula de água. A coordenação para o íon ADMIDAS (adjacente ao MIDAS) é mantida pelos oxigênios carboxílicos dos resíduos Asp9, Asp16 e Glu309 (motivo ECD) do loop reativo da ADAM2*dsl*d, sendo também o oxigênio carbonila da Ser13 o responsável pela manutenção da coordenação.

As carboxilas dos aminoácidos Glu48, Glu108 e Asp105 são responsáveis pela coordenação do cátion *LIMBS* juntamente com o carbonil do resíduo Asn103, Asp105 e Pro107 (Fig.4.30).

Após 12ns de simulação os resíduos que são responsáveis pela coordenação do MIDAS sofreram algumas alterações, sendo este coordenado pelo grupo hidroxila do resíduo Ser13, onde anteriormente era mantida pela carbonila. A Asn103 passa a coordenar após 12ns o íon *MIDAS*, em relação à estrutura inicial. O Glu108 e o Glu308 (motivo SFEECD) do ligante ADAM2*dsl*d (distância de 1.92Å e 2.01Å) continuam em contato com o *MIDAS*, caracterizando um melhor posicionamento em relação ao modelo inicial.

Mais tempo de simulação foi executado para este complexo e o monitoramento durante a DM mostra uma nova alteração na manutenção da coordenação do íon *MIDAS* (Fig.4.30). Este íon, continua a ser coordenado pelos mesmos resíduos e também pela Ser11 que volta a fazer parte da coordenação do cátion divalente.

Após um total de 25ns simulação os íons *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS* apresentam uma coordenação mais “estável” quando comparados ao modelo inicial. Observa-se para o *ADMIDAS* que ele perde contato com o resíduo Glu309(ECD) do ligante, sendo coordenado pelos resíduos Asp16, Asp17 e Asp138 e o *LIMBS* sendo mantido pelos resíduos Glu48, Asn103, Asp105 e Glu108 (Fig.4.30).

Podemos inferir através do gráfico de flutuação dos íons (Fig.4.30), que estes se estabilizaram em torno de $11ns$, havendo pouca flutuação durante a trajetória a partir deste tempo. O íon *ADMIDAS* apresenta maior flutuação, porém, não perde o contato com os resíduos responsáveis pela sua coordenação se comparado com os resultados para a estrutura cristalografica alfavbeta3 (1L5G) (Xiong et al., 2002).

4.3.3 Coordenação dos Íons MIDAS, ADMIDAS e LIMBS para o Complexo Alfa6beta1-ADAM9dsl

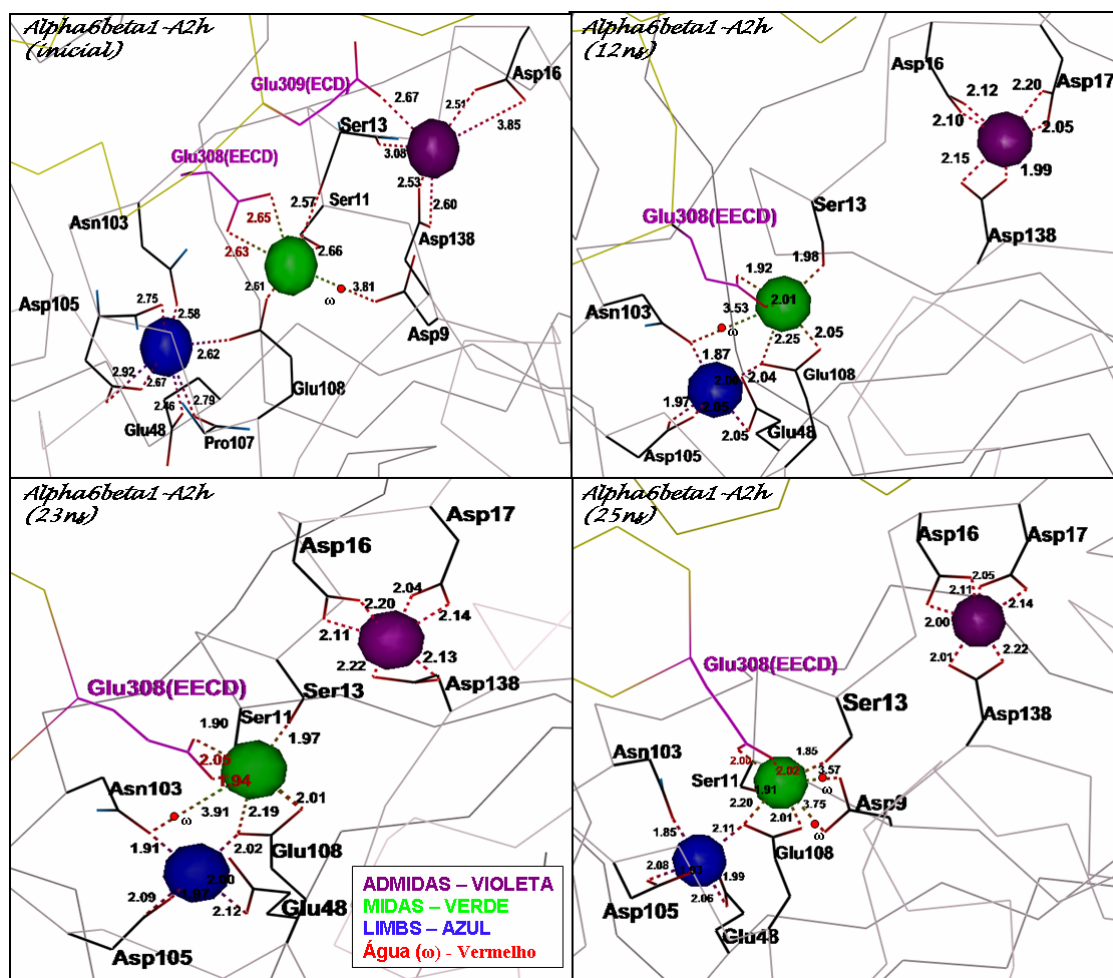
A conservação da coordenação dos íons para o complexo alfa6beta1-ADAM9dsl foi mantida de acordo com o molde da alfavbeta3 em complexo com RGD (Xiong et al., 2002). Como descrito anteriormente, sendo o resíduo Ser (motivo KTSECD) do ligante posicionado em contato com o *MIDAS*.

No modelo obtido para a integrina alfa6beta1 em contato com o domínio ADAM9dsl, a cadeia lateral (grupo carboxila) do resíduo Glu108, o grupo hidroxila dos resíduos Ser11, Ser13 e da Ser303 do ligante (motivo KTSECD) que se encontra a uma distância de 3.05\AA do *MIDAS*, são responsáveis pela manutenção da coordenação no modelo inicial (Fig.4.31). A coordenação do cátion divalente *ADMIDAS* é mantida pelos oxigênios carboxílicos dos resíduos Asp16, Asp17, Asp138 da porção N-terminal do domínio rico em cisteína. Já a Ser13, Cys342 e Gln343 do ligante fazem a coordenação pelos oxigênios carbonila. A carboxila do Glu48 e Glu108, mantêm a coordenação do cátion *LIMBS* juntamente com o carbonil dos resíduos Asn103, Ser106 e Pro107 (Fig.4.31).

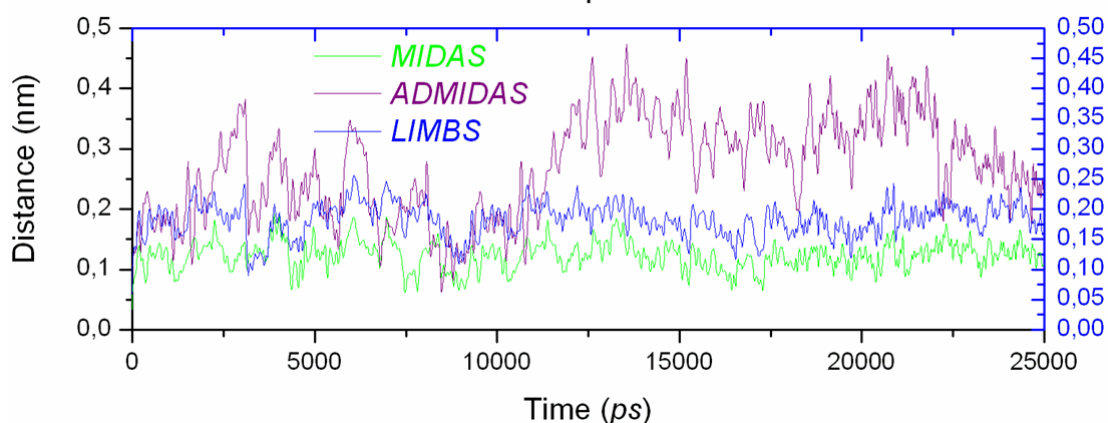
Após um período de $12ns$ de simulação de DM estes íons sofreram uma modificação nos resíduos responsáveis pela sua coordenação (Fig.4.31). Alguns resíduos estão melhor posicionados e outros perderam o contato com os íons e passaram a realizar um outro tipo de interação dentro do complexo estrutural.

Verificamos que o íon *MIDAS* continua a ser coordenado pelo grupo hidroxila da Ser11 e Ser13 e o oxigênio carboxílico do Glu108, sofrendo uma melhor aco-

Figura 4.30: Coordenação dos Cátions Divalentes *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS*.



RMS - Fluctuation in alpha6beta1-ADAM2dsld

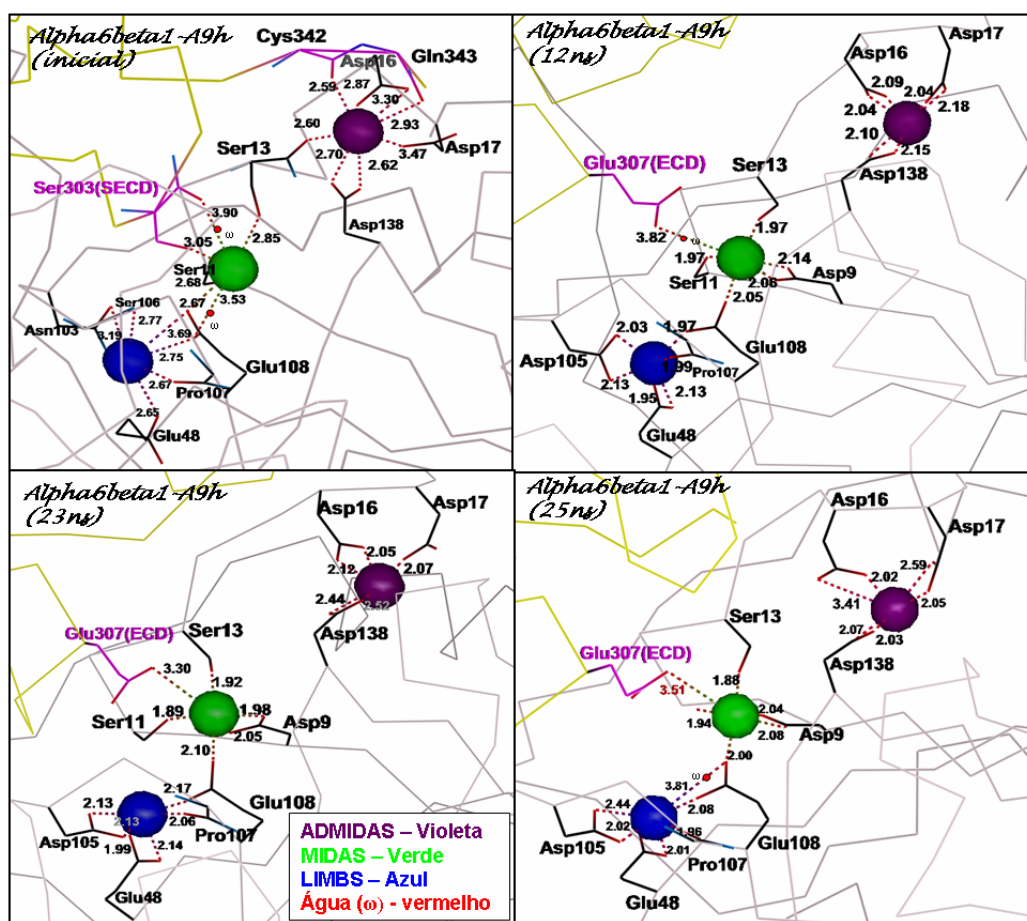


Demonstração dos resíduos responsáveis pela coordenação nos íons *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS*, no modelo da integrina alfa6beta1-ADAM2dsld inicial, após 12ns, 23ns e 25ns. A cadeia lateral dos resíduos responsáveis pela coordenação é mostrada em wire. Átomos de oxigênio em vermelho e carbono em preto. O glutamato do ligante ADAM2dsld está destacado em rosa. Gráfico de flutuação para os íons da cadeia β -A da integrina alfa6beta1 durante 25ns de simulação de DM.

modação (aproximação) em relação ao modelo inicial. O *MIDAS* sofreu a perda

da coordenação da Ser303 (motivo SECD) do ligante, mas outro resíduo do *loop* reativo da ADAM9*dsld* passou a coordenar o íon, agora pelo oxigênio carboxílico do Glu307. Devido a distância de 3.82Å essa coordenação deve estar sendo mantida através de uma molécula de água. O Asp9 sofre uma acomodação e passa a fazer parte da coordenação do *MIDAS*. O cátion *ADMIDAS* perde a coordenação dos resíduos Ser13 e Gln343 (ligante), sendo realizada pela cadeia lateral dos resíduos Asp16, Asp17 e Asp138, agora melhor posicionados. A coordenação do íon *LIMBS* continua sendo mantida pelos resíduos Glu48, Glu108 e oxigênio carbonila da Pro107 sofrendo uma alteração do resíduo Asn103 para o Asp105 provavelmente devido à flutuação da estrutura da proteína (Fig.4.31).

Figura 4.31: Coordenação dos Cátions Divalentes *ADMIDAS*, *MIDAS* e *LIMBS*.



Demonstração dos resíduos responsáveis pela coordenação nos íons ADMIDAS, MIDAS e LIMBS, no modelo da integrina alfa6beta1-ADAM9*dsld* inicial, após 12ns, 23ns e 25ns. A cadeia lateral dos resíduos responsáveis pela coordenação é mostrada em *stick*. Átomo de oxigênio em vermelho e carbono em preto. A serina e o glutamato do ligante ADAM9*dsld* está destacado em rosa.

Este complexo também sofreu maior tempo de simulação, sendo a coordenação monitorada durante o processo de DM como pode ser observado na figura 4.31. A coordenação do cátion *MIDAS* com 23ns de simulação de DM foi mantida em relação à coordenação dos primeiros 12ns, ocorrendo somente um melhor posicionamento das cadeias laterais. O mesmo ocorreu para o ADMIDAS e LIMBS. De acordo com a análise total de 25ns de DM, podemos inferir que a coordenação a partir de 12ns foi mantida até o final do processo, sofrendo algumas flutuações, mas não perdendo em momento algum os respectivos contatos, sendo somente melhor posicionados.

4.4 Resultados da Análise da Flutuação, Equilíbrio e Energia de Interação do Complexo Integrina-ADAM*dsld*.

4.4.1 Análise da Arquitetura Estrutural do Complexo Alfa6beta1-ADAM2*dsld* em 25ns de DM

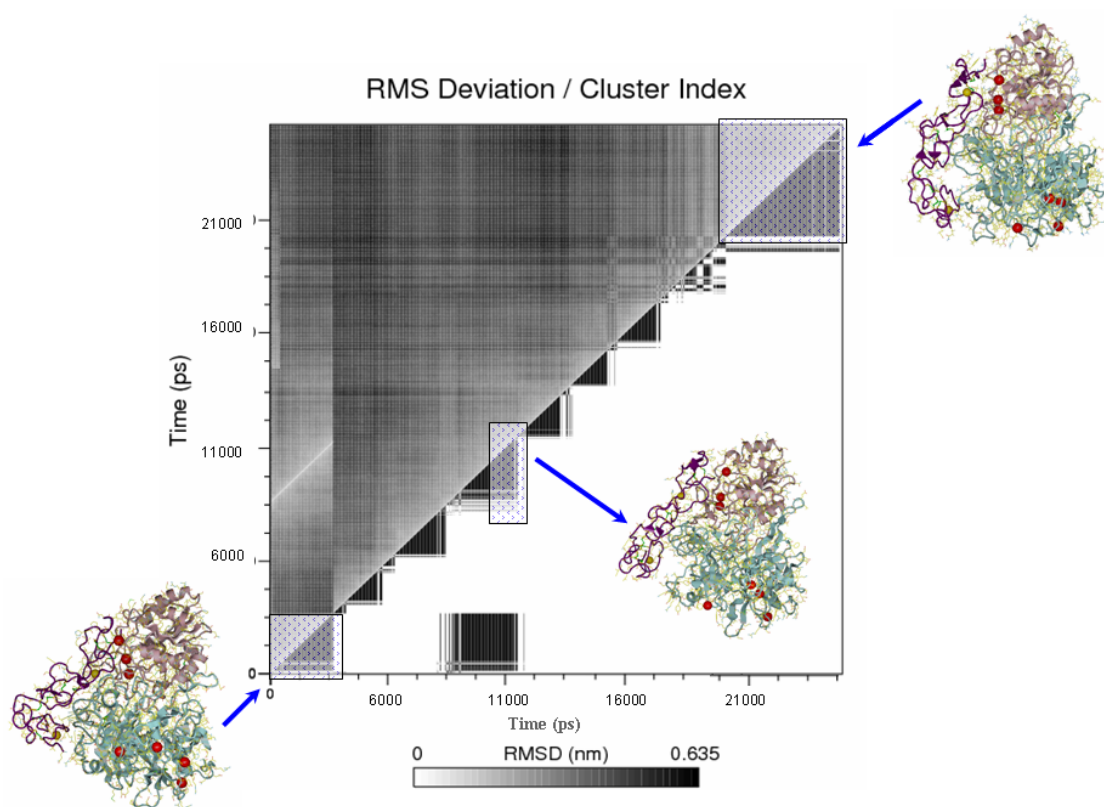
Depois de 25ns de simulação de DM, foram executadas as análises de clusterização, flutuação estrutural, flutuação de energia e análise das regiões de contato entre a proteína e o ligante.

Na experimentação de DM, é de suma importância acompanhar a flutuação do complexo em estudo até que este se “estabilize” em uma estrutura energeticamente mais favorável. No caso do estudo aqui discutido, a trajetória da DM por 25ns do complexo alfa6beta1-ADAM2*dsld* foi clusterizada para se obter estruturas representativas com até 2.6Å de RMSD (Fig.4.32).

De acordo com a matriz de clusterização para o complexo, não somos capazes de comprovar a estabilidade do sistema, mas pudemos inferir que ocorreu a formação de um cluster por volta de 20ns e foi mantida até o final da DM. Este fato nos levar a crer que o complexo “estabilizou” em uma estrutura de equilíbrio (Fig.4.32).

Na análise para os componentes de energia (*Potencial de Lenard-Jones e Coulomb*) na interação alfa6beta1-ADAM2*dsld* podemos conferir uma flutuação

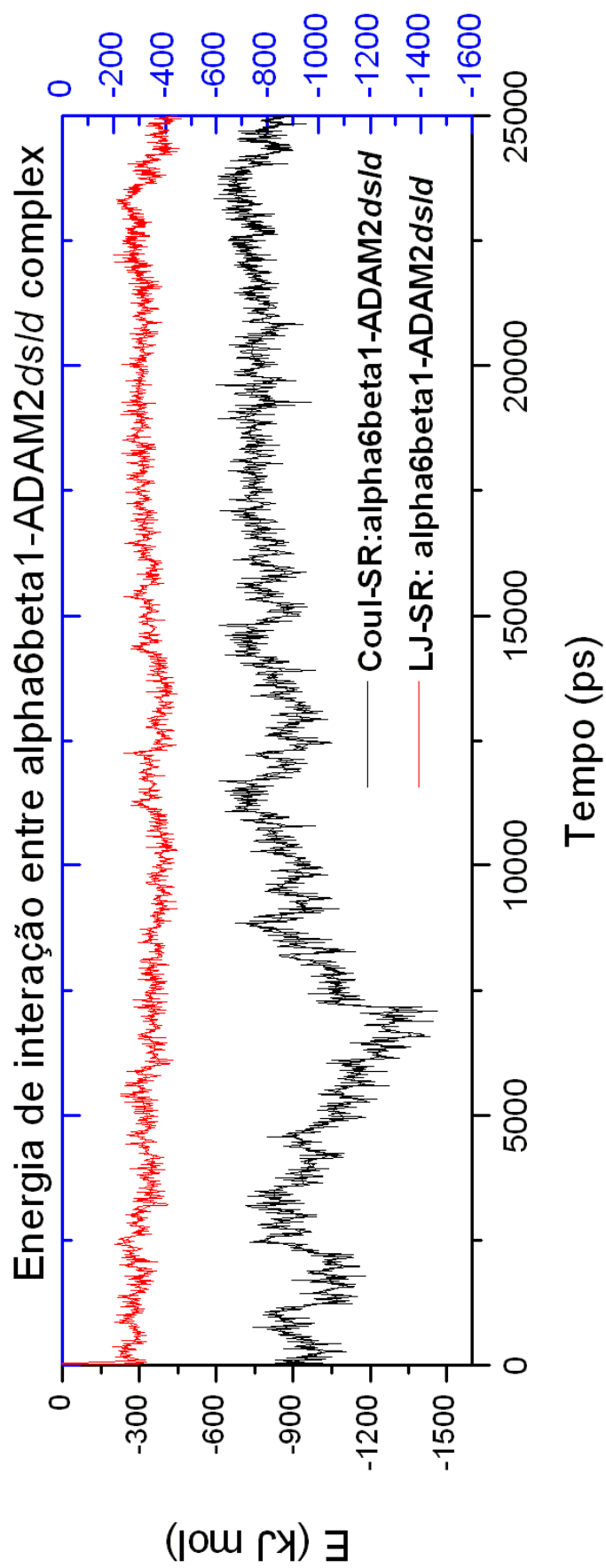
Figura 4.32: Matriz de Clusterização para IntegrinA Alfa6beta1-ADAM2*dsld*.



Representação gráfica dos resultados da clusterização da trajetória de 25ns de DM do complexo alfa6betaADAM2*dsld*. Estruturas representativa no tempo de 0ns, 12ns e 25ns.

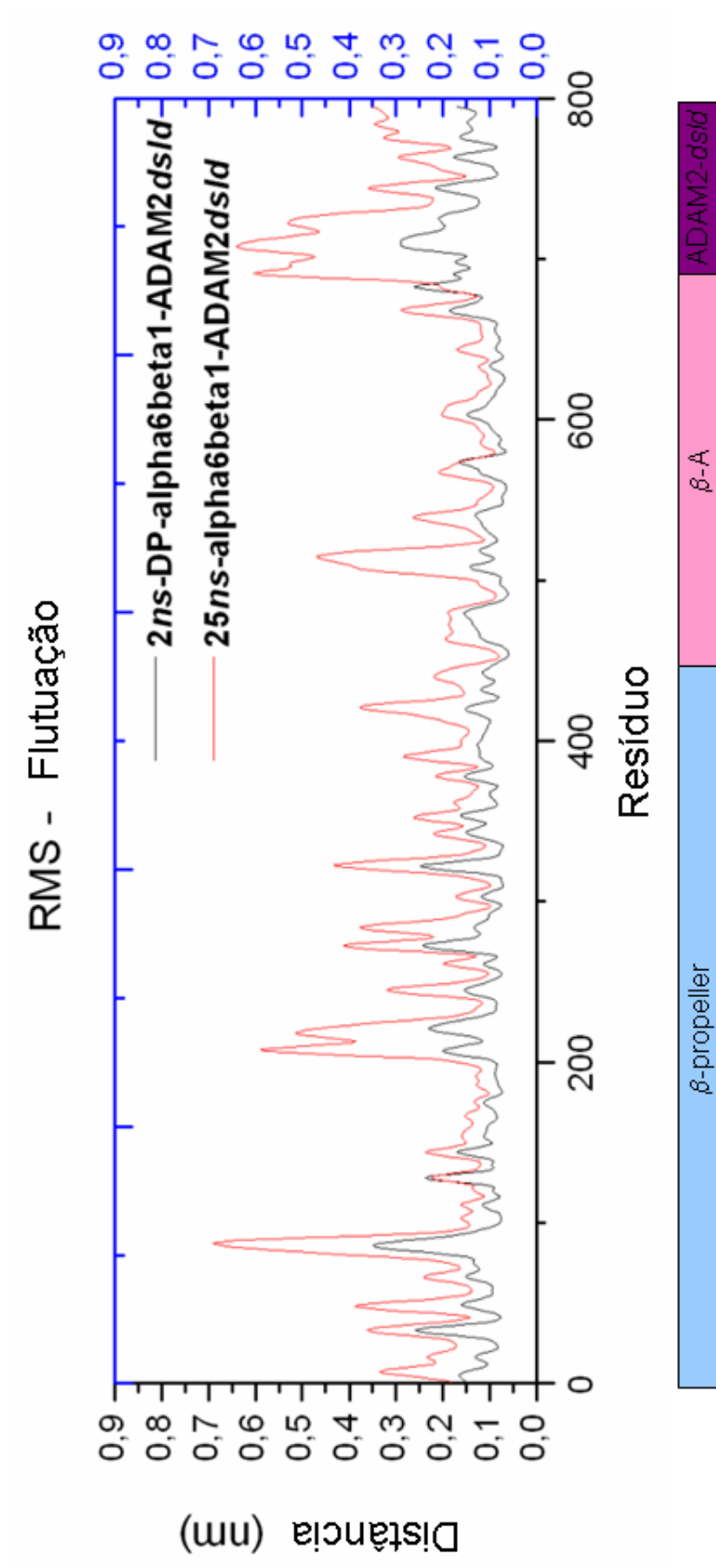
de energia eletrostática próxima a 7ns. Esta flutuação pode ser produto de acomodação do complexo. Foi verificada ainda pouca flutuação do potencial de *Lenard-Jones* no final da dinâmica (Fig.4.33).

Figura 4.33: Gráfico de Energia Representando os Potenciais de *Lennard-Jones* e *Coulomb*.



Flutuação de energia de interação do complexo *alpha6beta1-ADAM2ds/d* entre 25ns de Dinâmica Molecular.

Figura 4.34: Gráfico de Flutuação para o Complexo Integrina Alfa6beta1-ADAM2*dsld*.



Flutuação do sistema para cada um dos respectivos domínios, durante o período de 25ns de DM e para 2ns de DM em precisão dupla.

As proteínas para serem ativas precisam apresentar estabilidade conformacional. Dado um conjunto de várias conformações para qualquer um dos sistemas em estudo, uma das formas de se observar como este sistema se comporta é verificando a flutuação dos componentes do mesmo durante a simulação. Os resultados que mostram as flutuações conformacionais dos resíduos do complexo ao longo de suas respectivas dinâmicas podem ser vistos nos gráficos da figura 4.34. A amostragem nas flutuações foi feita para os 25ns de simulação e para os últimos 2ns de simulação com precisão dupla, a fim de estudar a estabilidade do sistema. Os picos vistos no gráfico indicam pontos onde houve maior flutuação durante a dinâmica, correspondentes geralmente a regiões de loop. Nos últimos 2ns elas tiveram uma menor movimentação. Ainda, pode-se observar que a média da flutuação do sistema ficou inferior a 2Å, o que pode ser considerado um valor razoável (Fig.4.34).

4.4.2 Resultados da Análise dos Contatos Integrina Alpha6beta1-ADAM2*dsl*d Durante a Dinâmica Molecular.

Sequências peptídicas de disintegrinas quando unidas às integrinas que servem como receptores, podem ser formadoras do maior sistema de reconhecimento de adesão celular.

Podemos constatar que a estabilidade estrutural do complexo durante a trajetória é assegurada pelos diferentes tipos de interações existentes entre a proteína e o ligante. Estas interações podem ser eletrostáticas, pontes de hidrogênio etc., permitindo-nos um melhor entendimento da interação do complexo estudado.

O modelo do complexo alfa6beta1-ADAM2*dsl*d após solvatação e equilíbrio do sistema por DM foi utilizado para o estudo do mecanismo de adesão entre o domínio ADAM2*dsl*d e a “cabeça” da integrina alfa6beta1.

O *loop* SDL é uma das regiões importantes para contato presente no domínio β -A (Xiao et al., 2004). O estudo detalhado das áreas de contato entre as duas proteínas nos revela através do gráfico da figura 4.35-A-C o contato entre os resíduos

Glu69 e Glu325 do SDL (β -A) com a cadeia lateral dos resíduos His327, Tyr328 e Ser56, Thr57 respectivamente da ADAM2*dsl*d. O cátion *MIDAS* é um importante sítio de reconhecimento dos resíduos carregados negativamente do ligante, sendo o Glu308 (motivo EECD) do loop reativo da disintegrina o resíduo responsável por manter esse contato (Fig.4.35-B). Através do gráfico de flutuação das distâncias entre os resíduos, visualizamos que eles ficam a uma distância inferior a 3Å em relação à posição inicial com exceção do Glu325 em contato com Thr57, ficando a 3.67Å a partir de aproximadamente 22ns.

A integrina apresenta outras regiões discriminantes de ligantes presentes no domínio β -propeller, como também descrito anteriormente (item 4.1.3), esta região chamada de subdomínio CAP apresenta 4 *loops* de interação, um destes *loops* apresenta interação com o ligante através da cadeia lateral (grupo carboxil) do resíduo Glu160 em contato direto com a Cys303, Arg304, Ser322 e Cys323 (Fig.4.36-A-C). As flutuações das distâncias entre os resíduos durante a simulação podem ser visualizadas no gráfico da figura 4.36-E-F.

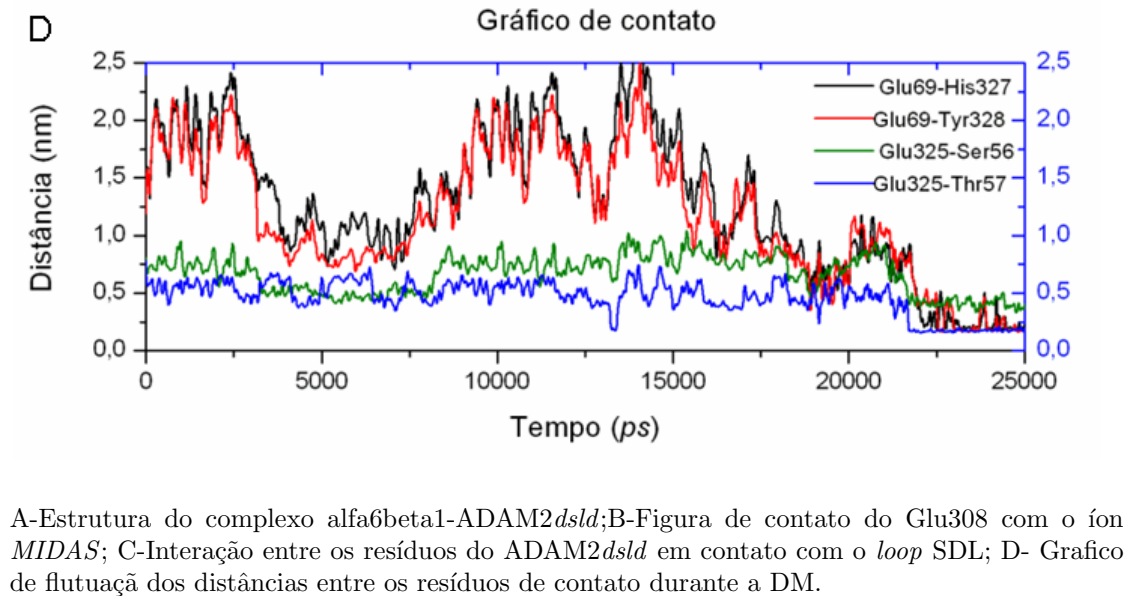
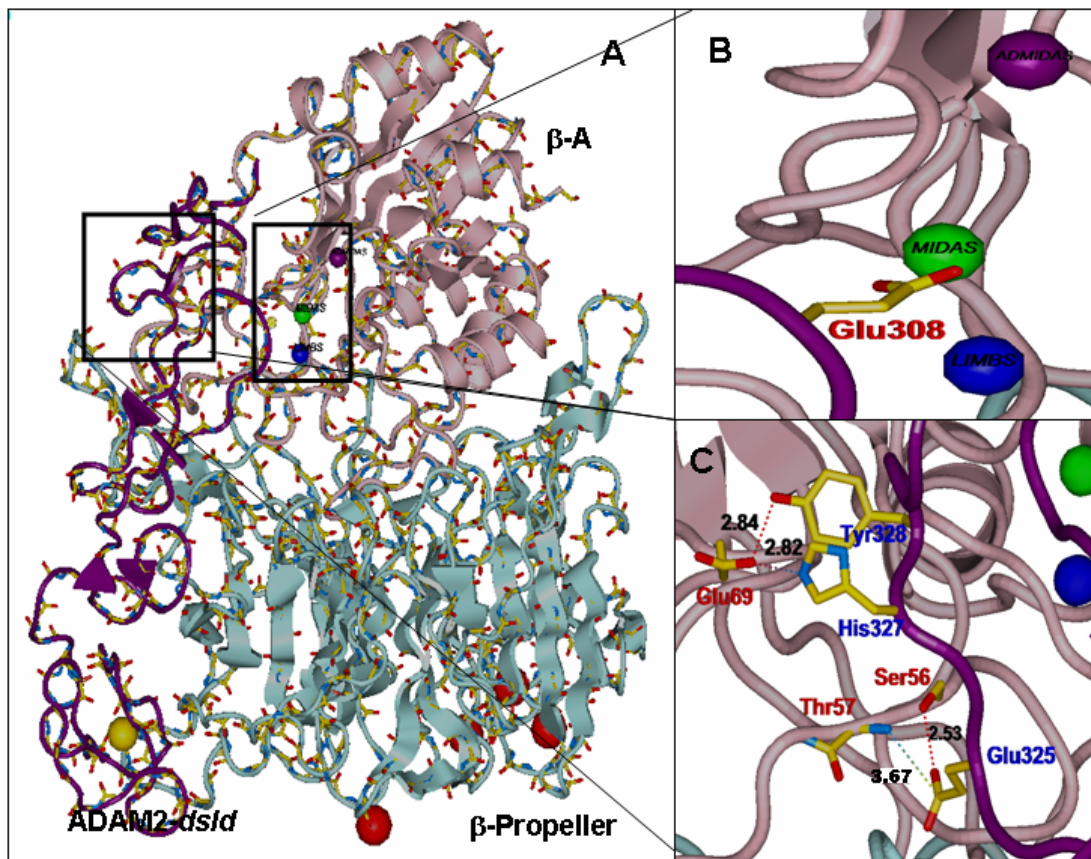
4.4.3 Análise da Arquitetura Estrutural do Complexo Alfa6beta1-ADAM9*dsl*d em 25ns de Dinâmica Molecular.

Como dito anteriormente da importância da flutuação do sistema em análises de DM, realizamos a clusterização de 25ns do complexo alfa6beta1-ADAM9*dsl*d para obtermos estruturas representativas com até 2.6Å de RMSD (Fig.4.37).

De acordo com a matriz de clusterização para o complexo, podemos inferir que ocorreu a formação de um cluster por volta de 18ns, sendo mantida até o final de 25ns de DM. Isto nos leva a crer que a estrutura do complexo está mais “estável” em uma estrutura de equilíbrio (Fig.4.37).

Os valores para os termos de interação de *Coulomb* e *Lennard-Jones* calculados para a energia de contato entre o complexo alfa6beta1-ADAM9*dsl*d foram negativos oscilando de -900 kJ mol para -800 kJ mol para *Coulomb*. O potencial de *Lenard-Jones* apresentou pouca flutuação mantendo os valores de energia em

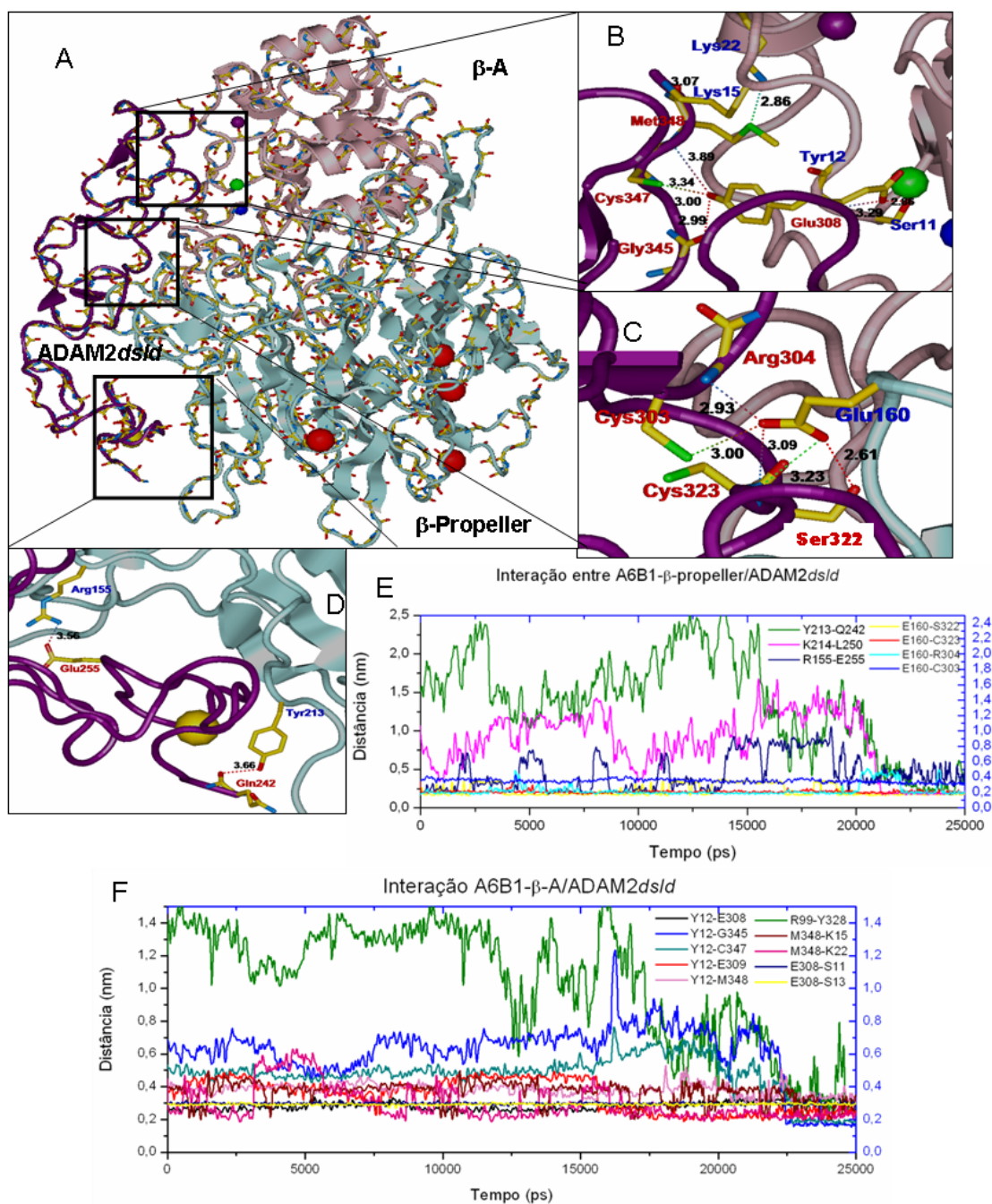
Figura 4.35: Contatos entre ADAM2*dsl*d e *loop* SDL da Integrina Alfa6beta1.



torno de -400 kJ mol (Fig.4.38).

Como dito anteriormente, sabe-se da importância da estabilidade conformacional da proteína e da sua flutuação estrutural. As análises das flutuações foram realizadas para 25ns de simulação e para os últimos 2ns de simulação em precisão

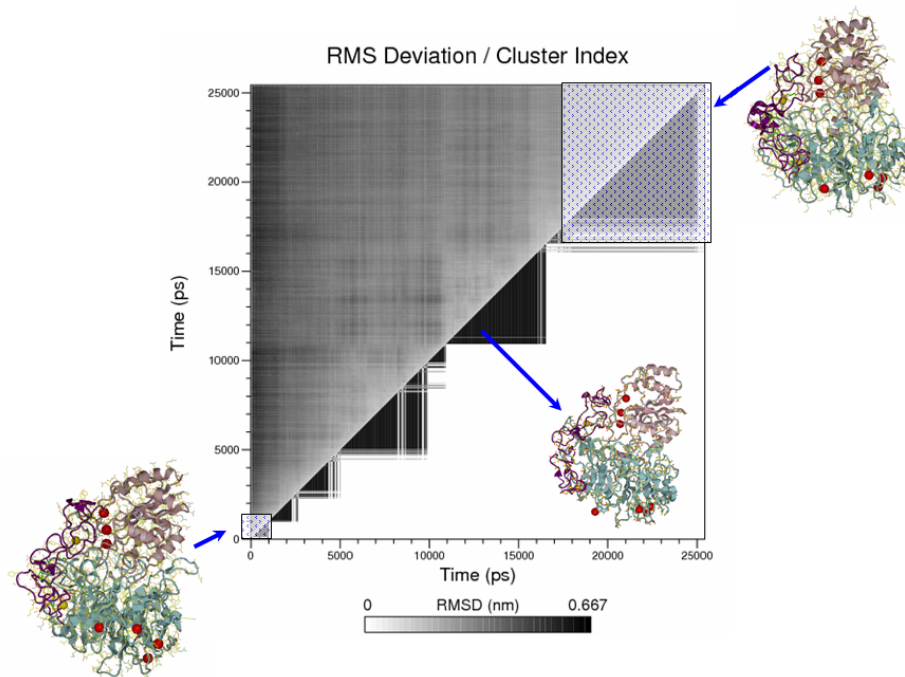
Figura 4.36: Contatos entre ADAM2*dsld* e Domínio β -A e β -propeller da Integrina Alfa6beta.



A-Estrutura do complexo alfa6beta1-ADAM2*dsld*;B-Figura de contato entre os resíduos do domínio β -A com o domínio ADAM2*dsld*; C-D-Figura de contato entre os resíduos do β -propeller e o domínio ADAM2*dsld*; E-F-Graficos de flutuaça dos resíduos de contato do domínio β -A e β -propeller da integrina alfa6beta1 com o domínio ADAM2*dsld* durante a DM.

dupla (Fig.4.39). As regiões de loop podem ser verificadas através dos picos demonstrados no gráfico, geralmente regiões que apresentam maior flutuação. A média do RMSD do complexo ficou em torno de 2, podendo entretanto ser considerado

Figura 4.37: Clusterização do Complexo Integrina Alfa6beta1-ADAM9*dsld*.



Representação gráfica dos resultados da clusterização da trajetória de 25ns de DM do complexo alfa6beta-ADAM9dsld. Estruturas mais representativas no tempo de 0ns, 12ns, 25ns.

um valor razoável.

4.4.4 Resultados da Análise dos Contatos Integrina Aplha6beta1-ADAM9*dsld* Durante a Dinâmica Molecular.

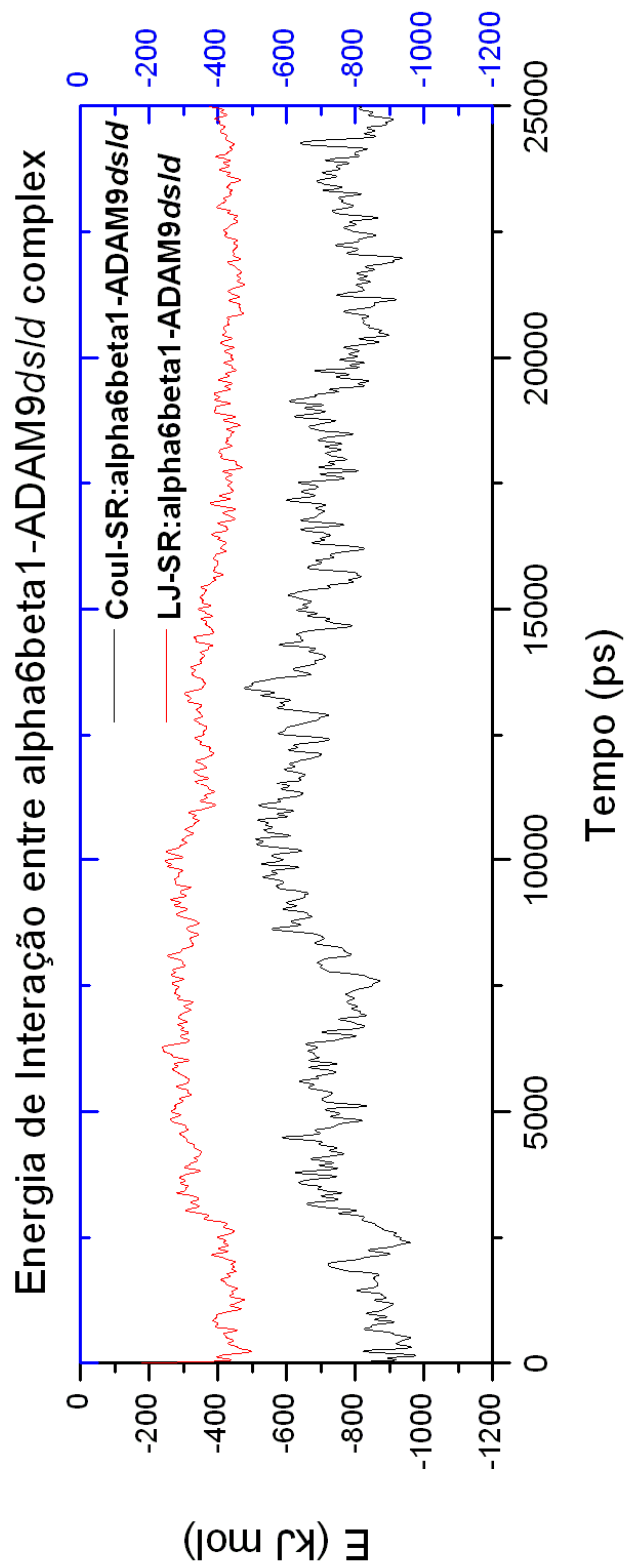
Depois de realizadas as simulações de DM, a estrutura mais representativa do cluster escolhido foi utilizado para o estudo do mecanismo de adesão entre o domínio ADAM9*dsld* e a “cabeça” da integrina alfa6beta1.

Como dito anteriormente, o *loop* SDL (β -A) é importante para reconhecimento e discriminação de ligantes (Xiong et al., 2003; Xiao et al., 2004). Através das análises realizadas podemos verificar que essa região mantém contato com o *dsld* da ADAM9, mais precisamente com a região N-terminal do rico em cisteína (Fig.4.40-A-C-D). A flutuação das distâncias entre os resíduos podem ser visualizadas no grafico (Fig.4.40-D), sendo que a Thr67 e Ser68 foram os resíduos que mais sofreram movimentação (cadeia lateral) nos últimos 3ns.

Ainda podemos verificar os pontos de contato do domínio ADAM9*dsld* em contato com o domínio β -A através da figura 4.41-A-B. Pelo gráfico das distâncias entre resíduos, eles se “estabilizaram” por volta de 13*ns*, mantendo esses contatos até o final da dinâmica (Fig.4.41-C).

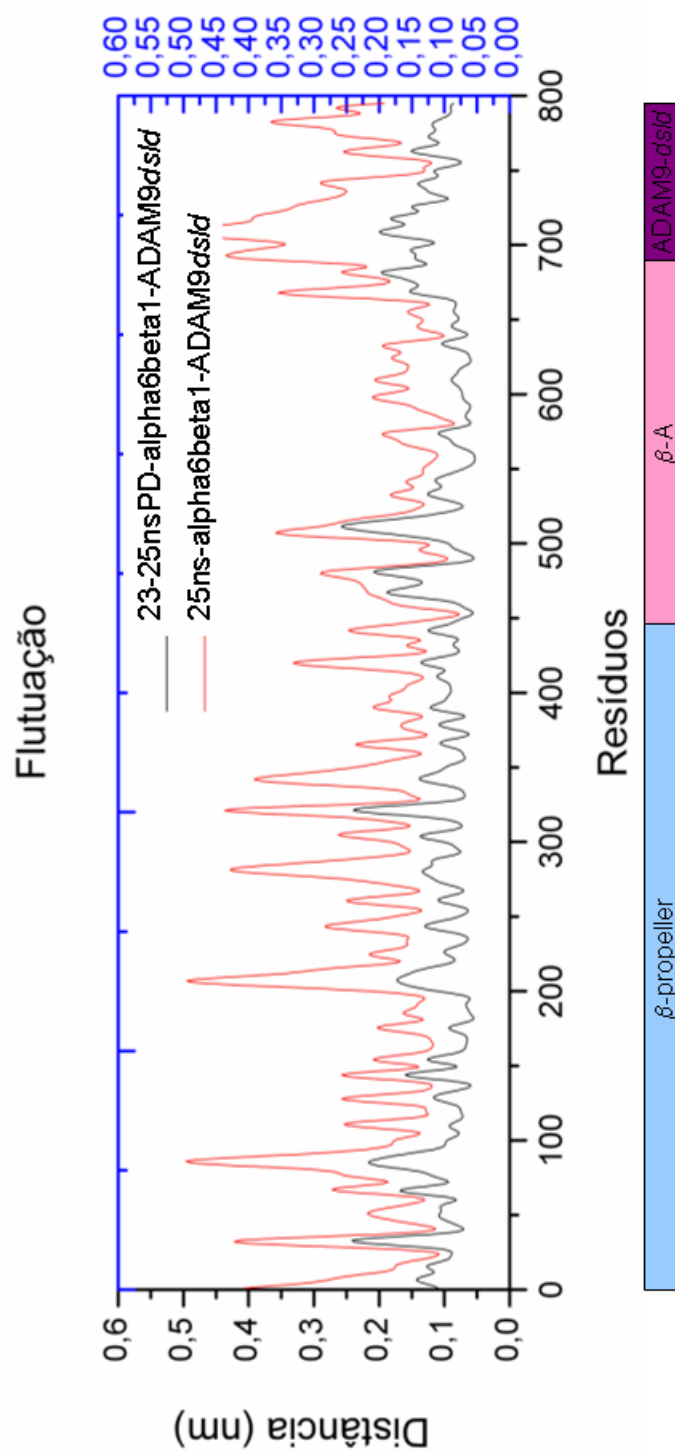
Outras regiões do domínio β -propeller são importantes para o reconhecimento de ligantes na integrina, como os 4 *loops* do subdomínio CAP e o *loop* de reconhecimento para pequenos ligantes entre os subdomínios D3 e D4. Através da figura 4.42 podemos observar a interação entre o *loop* de reconhecimento e a porção N-terminal do domínio tipo-disintegrina, verificando que esta flutuação se “estabiliza” por volta de 17*ns* (Fig.4.42-D). Porém, ADAM9*dsld* não apresentou contato direto com o subdomínio CAP (α 6) nas nossas simulações.

Figura 4.38: Gráficos de Energia Representando os Potencial de *Lennard-Jones* e *Coulomb*.



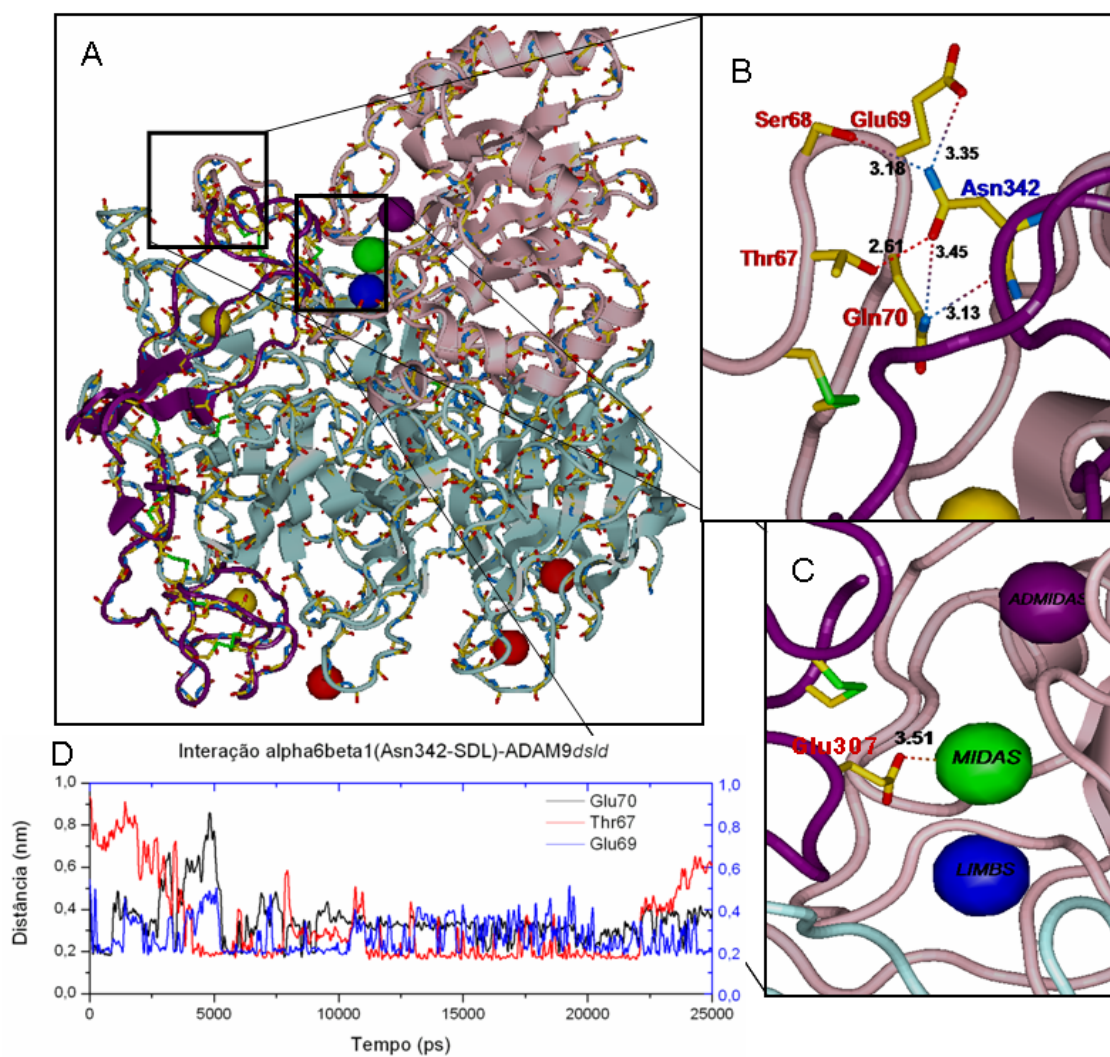
Flutuação de energia de interação do complexo $\alpha 6\beta 1$ -ADAM9ds/d em 25ms de DM.

Figura 4.39: Gráfico de Flutuação para o Complexo Integrina Alfa6beta1-ADAM9 *ds/d*.



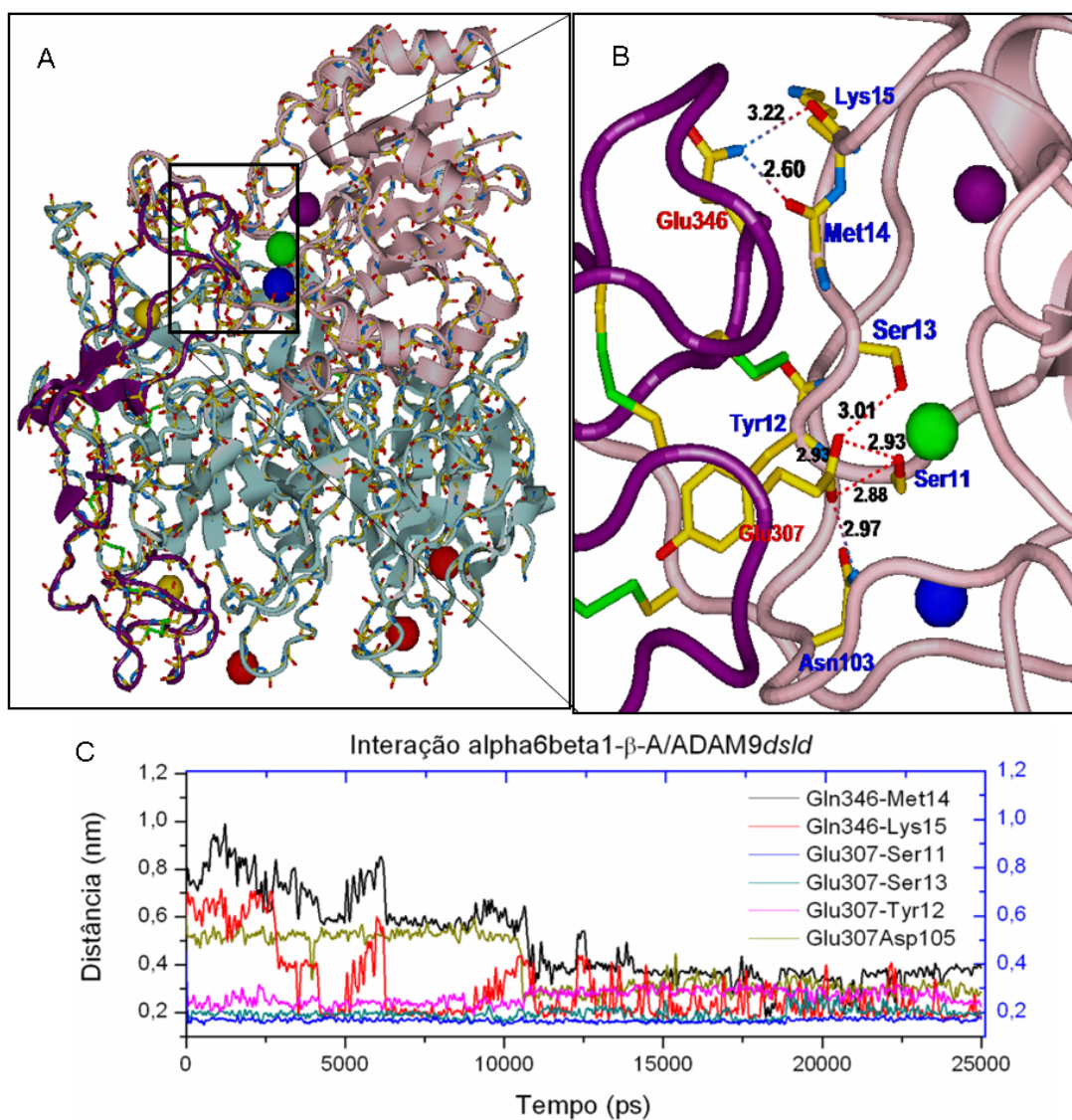
Flutuação do sistema para cada um dos respectivos domínios, durante o período de 25ns de DM e para 2ns de DM em precisão dupla.

Figura 4.40: Contato entre ADAM9*dsld* e Loop SDL da Integrina Alfa6beta1.



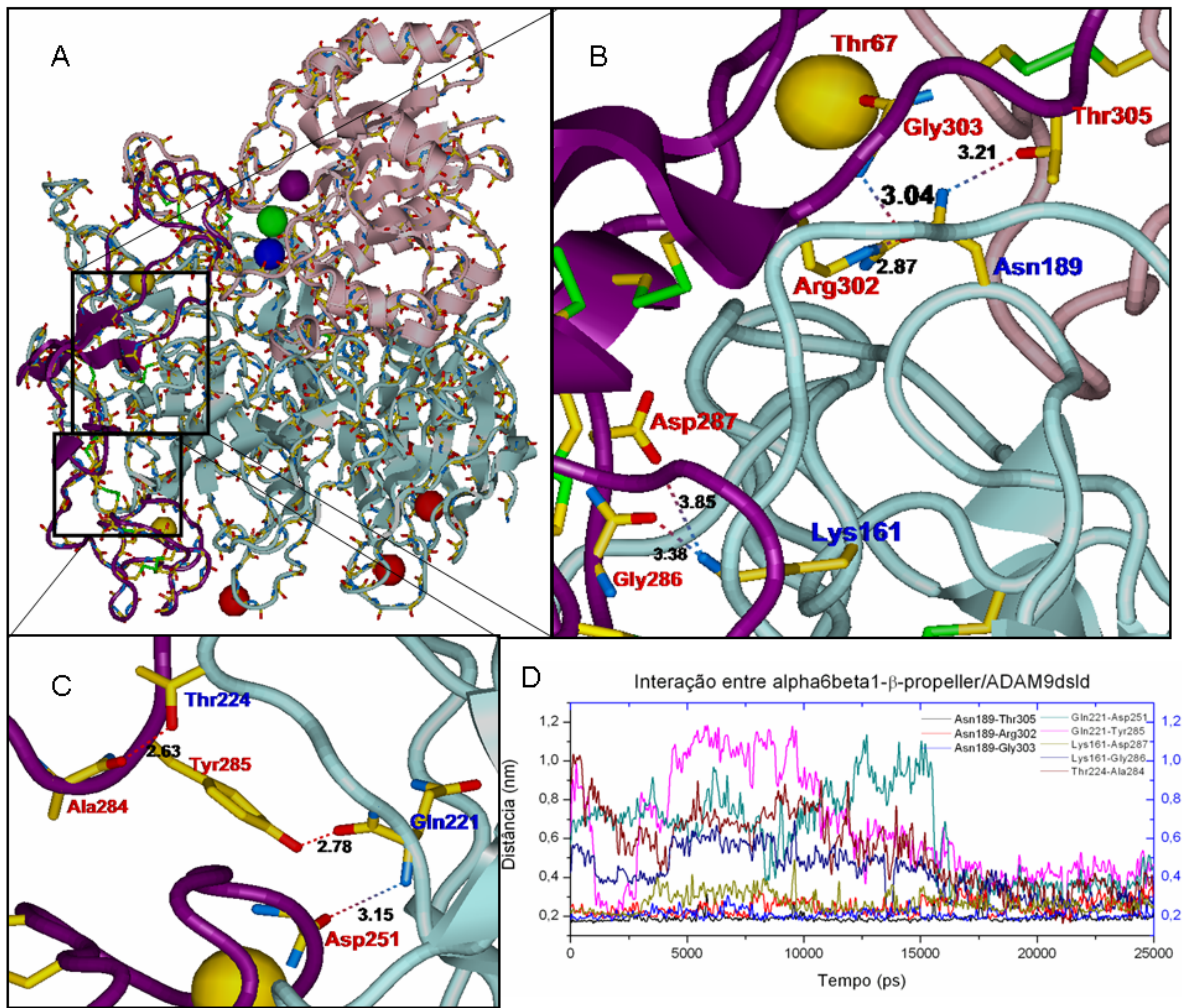
A-Estrutura do complexo alfa6beta1-ADAM9*dsld*; B-Figura de contato entre os resíduos do domínio β -A loop SDL da integrina alfa6beta1 em contato com a ADAM9*dsld*; C-Figura de contato do Glu307 com o íon MIDAS; D-Gráfico de contato dos resíduos durante a trajetória de DM.

Figura 4.41: Contato entre ADAM9*dsl*d e Domínio β -A da Integrina Alfa6beta1.



A-Estrutura do complexo alfa6beta1-ADAM9*dsl*d; B-Figura de contato entre os resíduos do domínio β -A da integrina alfa6beta1 em contato com a ADAM9*dsl*d. C-Gráfico de contato dos resíduos durante a trajetória de DM.

Figura 4.42: Contato entre ADAM9*dsl*d e Domínio β -propeller da Integrina Alfa6beta1



A-Estrutura do complexo alfa6beta1-ADAM9*dsl*d; B-C-Figura de contato entre os resíduos do domínio β -Propeller da integrina alfa6beta1 em contato com a ADAM9*dsl*d. D-Gráfico de contato dos resíduos durante a trajetória de DM.

4.5 Estrutura de ADAM2 e ADAM9 murinas.

Como parte deste estudo foram modeladas as proteínas ADAM2 (*fertilin* β) e ADAM9 (*meltrin* γ) murinas. Elas apresentam a estrutura típica dos membros da família ADAM. Seu domínio tipo-disintegrina é homólogo a disintegrina de venenos de serpente SVMPs, um inibidor potencial de integrinas.

Os modelos dos complexos alfa6beta1-ADAM2*dsld* e alfa6beta1-ADAM9*dsld* murinos foram os primeiros complexos estudados para verificar o mecanismo de interação entre estas duas proteínas. Posteriormente foram utilizados para uma comparação do modo de ligação com as ADAM2 e 9 humanas. As etapas de modelagem das proteínas isoladas foram as mesmas descritas no capítulo 3. Todas as pontes dissulfetos são mantidas também para as ADAMs murinas, mantendo com isso sua estabilidade estrutural (Fig.4.43).

As seqüências das ADAMs murinas apresentam para ADAM2, o triplete AQD adjacente ao motivo ECD, diferentemente da ADAM2 humana (triplete SFE) o que poderia alterar o seu modo de ligação à integrinas (Fig.4.43). A dinâmica de reconhecimento entre integrina e ADAM é inicialmente eletrostática, através do sítio *MIDAS*, sendo ainda descritas outras regiões importantes para reconhecimento e discriminação dos ligantes (item 4.1.30). Nos complexos alfa6beta1-ADAM2*dsld* e alfa6beta1-ADAM9*dsld* murinas, o *loop* de interação e a porção N-terminal do domínio rico em cisteína (C-) e o subdomínio CAP da integrina após 11*ns* de DM demonstram ser às principais regiões de contato. No complexo com a ADAM2*dsld* murina, o íon de magnésio do sítio *MIDAS* é coordenado por um resíduo Asp (motivo AQDECD), situado lateralmente ao *loop* reativo da ADAM2 murina. Em comparação a ADAM2*dsld* humana seria o mesmo resíduo responsável pela coordenação do *MIDAS*, no caso o Glu do motivo SFEECD. Estes dados contradizem a literatura atual (Bigler et al., 1997; Calvete et al., 2003; Nath et al., 2000) pois estes autores afirmam que a interação com o ligante seria mediada frontalmente pelo triplete ECD do *loop* de interação (Bigler et al., 1997; Calvete et al., 2003). No caso da ADAM9*dsld* murina, o íon de magnésio do sítio *MIDAS* é coordenado

pelo Glu do motivo KTSECD, ou seja, igualmente a ADAM9*dsl*d humana. Estes resultados demonstram uma interação mediada lateralmente pelo *loop* reativo. O resíduo Asp (motivo ECD) não demonstra interação com as cadeias da integrina, coordenando o tempo todo o íon de cálcio, responsável pela manutenção da estrutura do *loop* reativo, tanto para ADAM2 e 9 murina como humana.

4.5.1 Mudança Conformacional da Integrina Alfa6beta1 em Complexo com seus Ligantes.

Como já mencionado no capítulo 1.2.1, um dos aspectos estruturais mais interessantes nas integrinas é o passo da estrutura da sua forma “inativa” a sua forma “ativa” (Fig.1.1). Este processo envolve rearranjos estruturais complexos e movimentação dos domínios das cadeias alfa e beta. Entre outros aspectos, a separação do domínio Hybrid do domínio β -A e a presença de ligantes interagindo com o domínio β -A têm sido ligados à ativação das integrinas (Xiao et al., 2004).

Os resultados de experimentos “*in silico*” de E.Pulkin-Faucher et al. (2006) sugerem que a integrina alfabeta3 em complexo com fibronectina sofre alterações estruturais que levariam a sua ativação, fato não observado na ausência do ligante (E.Pulkin-Faucher et al., 2006). Os autores modelaram e submetem a simulações por dinâmica molecular o complexo formado pela “cabeça” da integrina alfabeta3 com fibronectina e, mensurando o ângulo entre os domínios β -A/*Hybrid*, sugeriram que o aumento considerável do ângulo entre estes domínios é causado pela interação da integrina com seu ligante. A separação do domínio Hybrid estaria entre as mudanças conformacionais que levam a estrutura da integrina a sua forma ativa.

No intuito de confirmar se a interação de ligantes leva à movimentação diferenciada do domínio Hybrid no nosso modelo, foram simuladas as interações da “cabeça” da alfa6beta1 em complexo com o domínio ADAM9*dsl*d, e com os peptídeos inibidores desenhados (Fig.4.44-A). O ângulo entre os domínios β -A/*Hybrid* a ser monitorado foi definido como o ângulo entre os vetores definidos pelo elemento beta formado entre os resíduos Gln 45 e Lys 52 do *Hybrid*, e o elemento beta for-

mado entre os resíduos Asp 60 e Met 65 do domínio β -A. Ambos os elementos da estrutura secundária estão posicionados de forma central nos seus respectivos domínios, e demonstraram pouca flutuação durante as dinâmicas (Fig.4.44-B).

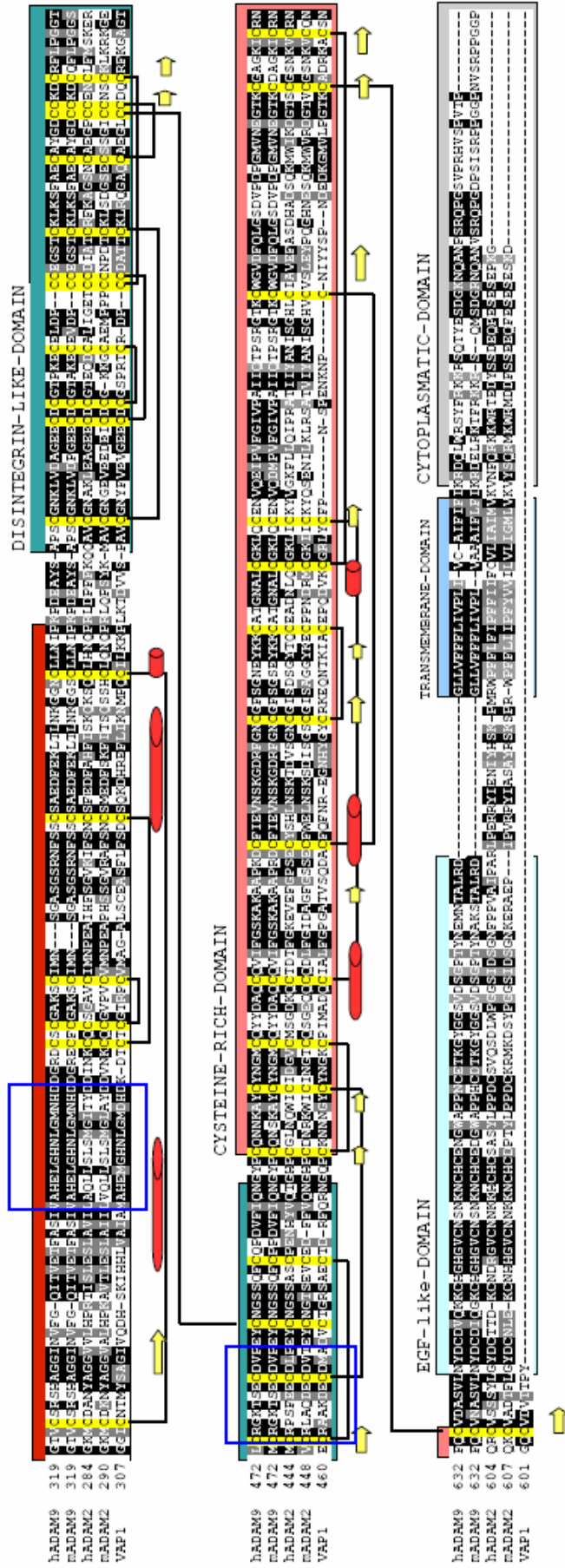
A integrina isolada e em complexo foi submetida a solvatação e equilíbrio em uma caixa octaédrica com moléculas de água explícita (SPC) com a ferramenta GROMACS 3.3.1, usando campo de força GROMOS 53a6. As regiões incluídas no estudo foram os domínios β -propeller da subunidade alfa6 e os domínios β -A/Hybrid da subunidade beta1. As condições de simulação foram as mesmas usadas em experimentos anteriores. A estrutura pré-equilibrada de simulação do modelo da integrina alfa6beta1 foi usada como ponto de partida para a modelagem dos respectivos complexos de interação.

As simulações de produção de dados foram de 5ns, tanto para o complexo de interação alfa6beta1-ADAM9*dsl*d, como para os complexos alfa6beta1-peptídeo. Os resultados obtidos para estas simulações foram comparados com os obtidos para 5ns de simulação da “cabeça” da integrina na ausência de ligantes (Fig.4.45-A-F).

Observamos um aumento da abertura angular entre os domínios β -A/Hybrid (ângulo de ativação) nos primeiros 5ns (12-14°) da integrina alfa6beta1 na ausência de ligantes (Fig.4.45-A,G). O aumento inicial da abertura angular pode ser atribuída à solvatação e acomodação da estrutura protéica no sistema de simulação.

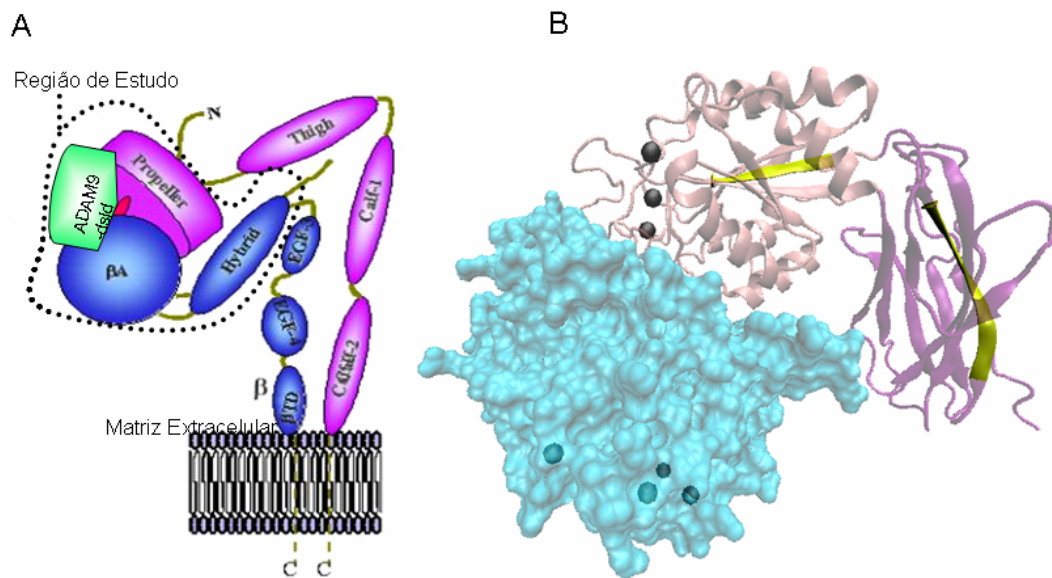
Já o acompanhamento da abertura angular para o complexo alfa6beta1-ADAM9*dsl*d mostra uma abertura acentuada de mais de 25°, já no primeiro nanosegundo de simulação. Esta abertura é mantida nos próximos 4ns de análise com pequenas flutuações (Fig.4.45-B,G). Este comportamento é bastante parecido para os complexos alfa6beta1-A9b (Fig.4.45-D,G) e alfa6beta1-A9e (Fig.4.45-E,G), embora com maior flutuação nos valores observados (Fig.4.45-G). O teste de variância mostra que estes complexos têm valores bem próximos, sugerindo que os diferentes ligantes atuam de igual forma neste grupo.

Figura 4.43: Alinhamento entre ADAM2, ADAM9 murino e humana e VAP1.



Alinhamento das ADAM2 e 9 humanas e ADAM2 e 9 murinas com a VAP1 representando as ligações dissulfídicas. Representados por um retângulo estão as regiões do sítio catalítico e *loop* reativo.

Figura 4.44: Esquema Representativo do Sistema Definido para o Estudo do Ângulo de Abertura do Domínio Hybrid em Complexos Integrina-Ligante.



A-Diagrama da integrina em complexo com ADAM9dsld. As regiões referentes ao sistema usado nas simulações estão destacadas dentro da linha pontilhada. B-Cabeça da integrina alfa6beta1-Hybrid. Destacadas em amarelo estão as folhas betas utilizadas como vetores para mensuração do ângulo entre os domínios.

A abertura angular no complexo alfa6beta1-A9s foi bastante discreta e apresentou flutuação bem acentuada, mas seu comportamento foi semelhante ao do sistema sem ligantes, apresentando valores abaixo de 10° na maior parte do experimento (Fig.4.45-F,G). Já o comportamento da abertura angular no complexo alfa6beta1-A9a foi intermediária, apresentando valores que flutuaram em $10-15^\circ$ (Fig.4.45-C,G).

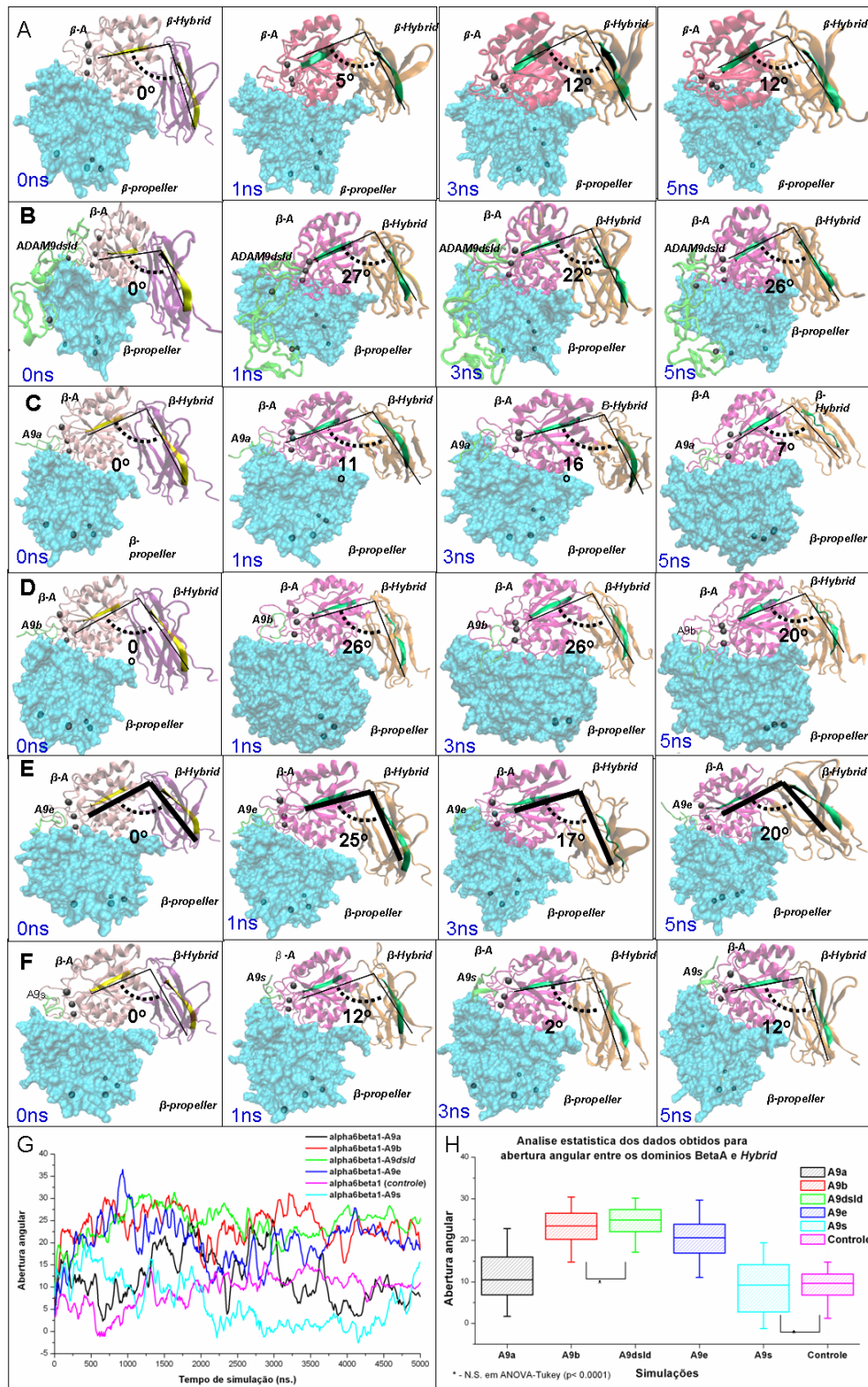
Destes resultados podemos deduzir que os peptídeos A9b e A9e desenhados para serem inibidores de alfa6beta1 são bons candidatos estruturais para testes “*in vitro*” pois apresentam valores de abertura angular semelhantes aos obtidos para o complexo alfa6beta1-ADAM9*dsl*d.

4.6 Coordenação do Íon de Cálcio do Sítio-III das ADAMs.

Sabe-se da importância dos íons de cálcio na manutenção da estrutura do domínio tipo-disintegrina das SVMPs (Takeda et al., 2006). Os subdomínios Ds e Da apresentam um sítio de ligação ao cálcio (sítio-II e sítio-III respectivamente), sendo o sítio-III responsável pela manutenção da estrutura do loop reativo do domínio tipo-disintegrina (Fig.4.29-A-B). No item 4.2.2 foi mostrada a coordenação do sítio-III no domínio tipo-disintegrina para o *molde* VAP1. Em ADAM2 e ADAM23 humanas os resíduos que mantêm a coordenação do cálcio no sítio-III diferem em um aminoácido quando comparados com ADAM9 e as SVMPs VAP1 e VAP2 (pDBs 2ERP e 2DW1 respectivamente), sendo um resíduo Asp (D) substituído por uma Asn (N) (Fig.4.29-C).

De acordo com os resultados observados no experimento de DM de $25ns$ no complexo alfa6beta1-ADAM2*dsl*d, o íon de cálcio do sítio-III aparece totalmente solvatado por moléculas de água no final da simulação. Este processo de solvatação do cálcio no sítio III se inicia a partir de $9.5ns$ aproximadamente e acontece em $6-7ns$ (Fig.4.46). É importante ressaltar que a ruptura da coordenação do cálcio no sítio III não foi observada na simulação do complexo alfa6beta1-ADAM9*dsl*d (dados não mostrados).

Figura 4.45: Estruturas Representativas da Determinação da Abertura Angular da Alfa6beta1-Hybrid em Complexo com Diferentes Ligantes.



A-Conformação estrutural da integrina alfa6beta1-Hybrid isolada (controle) com alteração angular de 13° para os primeiros 10ns. B-Complexo alfa6beta1-Hybrid/ADAM9dslid com variação angular 24° para um período de 5ns. C-F-Complexo alfa6beta1-Hybrid/peptídeos representando a movimentação angular para 1ns, 3ns e 5ns de simulação. G-Gráfico de flutuação dos valores dos ângulos para os complexos em simulação de 5ns. H-Análise estatística dos valores obtidos para a abertura angular do hybrid. O teste de variância mostra a formação de três grupos fundamentais, sendo que os peptídeos A9b e A9e mostram dados bem parecidos com os obtidos para o complexo com ADAM9dslid, diferenciando drasticamente da abertura angular do controle e A9s. Os valores obtidos para A9a formam um grupo intermediário ($p < 0.0001$).

Os valores de rdf (*Radial Distribution Function*) foram calculados para mapear a distribuição radial de moléculas de água ao redor do cálcio-III entre 9 e 18ns de simulação. Isto é, partindo do centro de massa do cálcio, calculamos a quantidade de moléculas de água (estatisticamente) encontradas radialmente durante parte da DM. Os valores do rdf observados entre 2.4 e 2.6{Å} vão de 2-3 (10ns) até 6 (18ns), demonstrando que o íon de cálcio no sítio III troca gradativamente a coordenação pentagonal-bi-piramidal dos oxigênios carboxílicos e carbonílicos (Takeda et al., 2006)(Fig.4.24) por moléculas de água (Fig.4.46).

No intuito de confirmar esta observação, resolvemos então realizar quatro repetições de 6ns para a simulação do complexo alfa6beta1-ADAM2*dsld*. O sistema foi selecionado a partir de 9ns (anterior ao início do processo de solvatação do cálcio III), gerando repetições independentes até os 15ns do mesmo sistema. Para garantir que estes quatro novos experimentos fossem independentes, foi mudado o *script* de parâmetros da simulação no campo “*gen-seed*” para gerar valores de velocidades randômicas aleatórias através da ferramenta GROMACS. De acordo com estas modificações, o programa gerou valores de velocidades randômicas a partir de uma “semente” aleatória, ou seja, no início dos quatro experimentos foram gerados valores de velocidades diferenciadas.

Para que pudéssemos confirmar estes dados, calculamos os parâmetros de rdf do cálcio no sítio III nos quatro experimentos. Analisamos o rdf entre o cálcio (sítio-III) e a água em cinco tempos diferentes da simulação: entre 50-500ps, 500-1000ps, 1500-2000ps, 3000-4000ps e 5000-6000ps. Ao mesmo tempo geramos figuras da coordenação final (6000ps), (Fig.4.46). Pelos resultados obtidos, verificamos que estes íons realmente sofrem solvatação, mas nos 6ns de simulação analisados, a ruptura acentuada da coordenação pentagonal-bi-piramidal (4 moléculas de água, $\text{rdf} = 4$) foi observada só em uma das repetições (Fig.4.46, experimento 2). Em outro caso foram observados valores de $\text{rdf} = 3-4$, coincidindo com o início da ruptura da coordenação do cálcio (Fig.4.46, experimentos 1 e 3). Nas repetições restantes o valor de rdf calculado foi de 1-2, mostrando que o processo de ruptura

da coordenação do cálcio não tinha ocorrido (Fig.4.46, experimentos 3 e 4).

Conforme observamos nos gráficos de rdf na Figura 4.45, ocorre realmente a ruptura da coordenação do cálcio no sitio III pelas moléculas de água para simulação do complexo alfa6beta1-ADAM2*dsld* e duas repetições. Para termos total certeza deste processo o tempo de 6ns de simulação deve ser aumentado em mais 5ns aproximadamente, pois mesmo verificando a solvatação do íon de cálcio, o início/término do processo completo pode demorar bem mais do que os 6ns analisados para as quatro repetições.

4.7 Resultados Preliminares dos Testes “*in vitro*” dos Inibidores Sintetizados.

É conhecido que peptídeos sintéticos que contêm motivos de ligação a integrina podem ser usados para definir a especificidade de interação integrina-ligante e suas funções no sistema biológico. Este enfoque teve êxito particularmente para peptídeos miméticos de RGD na ativação de integrinas (Nath et al., 2000).

A comparação das seqüências do *loop* disintegrina de várias ADAMs revela que em mais de 12 ADAMs, incluindo ADAM2 e ADAM9, está presente o motivo XECD, um potente agente de ligação a integrina (Nath et al., 2000). Vários estudos têm mostrado que peptídeos baseados no motivo ECD podem eficientemente inibir a interação entre substrato específico para integrina alfa6beta1 (Nath et al., 2000). Estes resultados sugerem que o domínio tipo disintegrina de metrin- γ (ADAM9) está envolvido na ligação celular, demonstrando ser um forte candidato ao desenho de inibidores sintéticos.

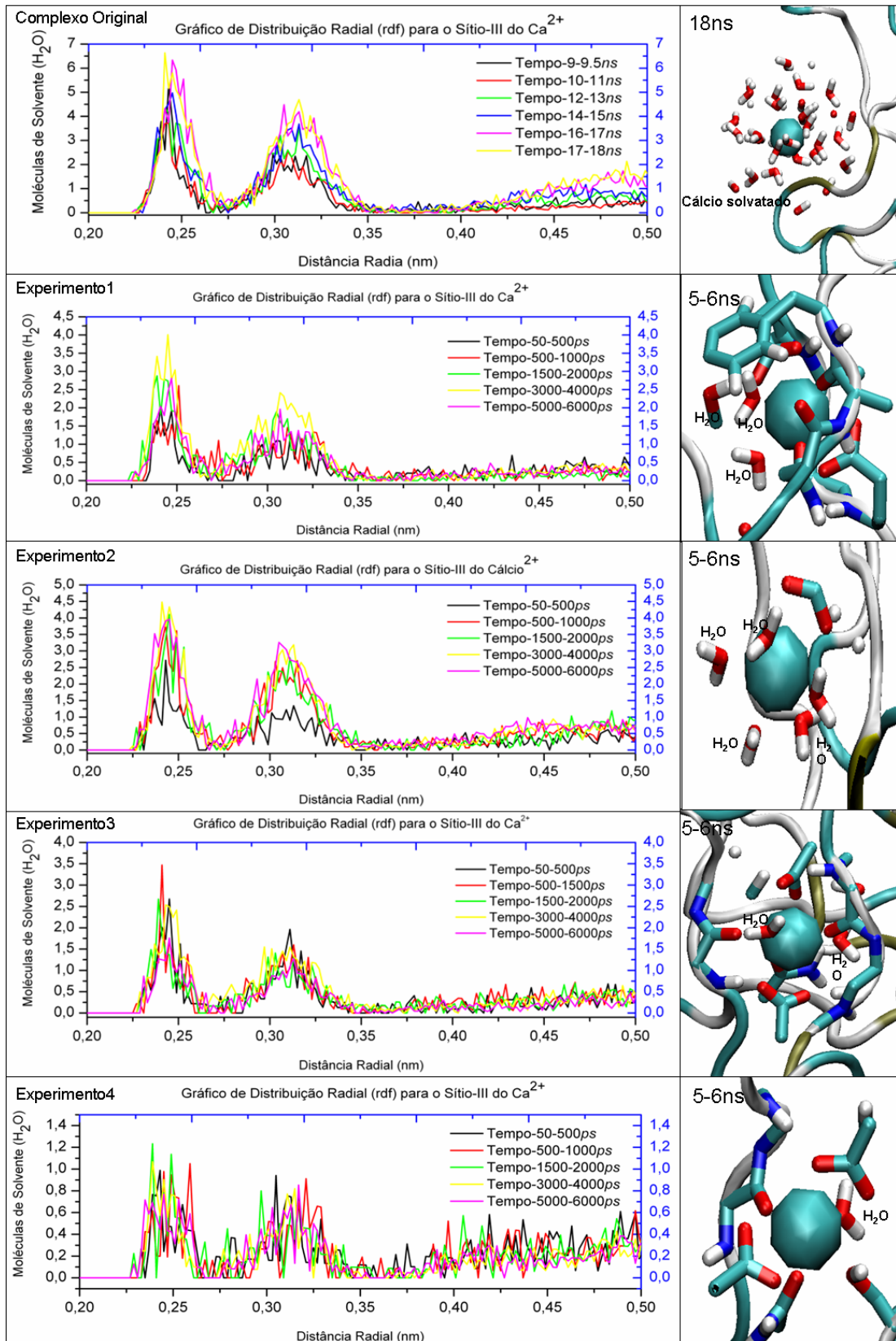
A integrina alfa6beta1 é expressa em uma variedade de células incluindo linfócitos e célula mesenquimal, podendo ser importante em respostas inflamatórias (Nath et al., 2000). ADAM9*dsld* se apresenta como um novo e significativo ligante biológico, a partir do qual desenhamos peptídeos sintéticos tentando inibir a ação de ligantes responsáveis pelos processos inflamatórios. Para demonstrar que o motivo XECD de metrin γ possibilita o envolvimento da ligação à inte-

grina alfa6beta1, testamos a capacidade de inibição de peptídeos cíclicos baseados no seu loop de interação (seqüência CRGKTSEADVPEYCN) para inibir a atividade de alfa6beta1 (Fig.4.47-A). Como controle negativo, o peptídeo *scramble* (CDERTVGKESPYACN) foi usado na mesma concentração.

De acordo com os resultados preliminares “*in vitro*” obtidos pelos nossos colaboradores do Laboratório de estudos do Timo na Fundação Osvaldo Cruz (Fig.4.47-B) observamos que o peptídeo A9a utilizado como inibidor da migração celular promovida pela integrina alfa6beta1 é uma boa plataforma estrutural para o desenvolvimento de inibidores de alfa6beta1, pois a mobilidade destas células é acoplada à capacidade de interação de alfa6beta1-Laminina e o peptídeo A9a em concentração nMolar conseguiu diminuir esta interação em 75%. Dados experimentais para os outros peptídeos desenhados a partir do A9wt, ainda não foram possíveis de serem acrescentados nesta dissertação, pois ainda não apresentam resultados conclusivos de acordo com nossos colaboradores.

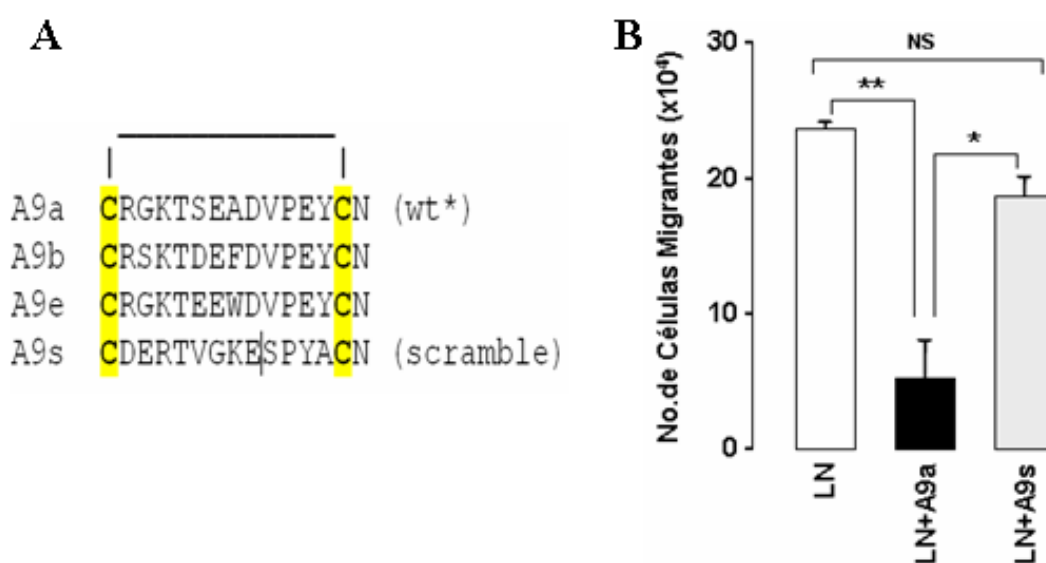
Nossos resultados “*in silico*” e os resultados preliminares “*in vitro*” indicam que os peptídeos desenhados neste trabalho podem servir como potentes inibidores para alfa6beta1.

Figura 4.46: Coordenação do Cálcio-III



Ruptura da coordenação do cálcio do sítio-III no complexo alfa6beta1-ADAM2*dsl*d em 6ns de simulação. Gráfico de distribuição radial das moléculas de água em volta do Ca^{2+} (sítio-III), calculadas em diferentes momentos de simulação para os experimentos 1 ao 4. Os valores obtidos confirmam que o cálcio é realmente solvatado nos experimentos 1 e 2, mas necessitam de um maior tempo de simulação para terminar o processo.

Figura 4.47: Resultados obtidos "in vitro" para os peptídeos testados em laboratório.



A-Sequência dos peptídeos desenhados e usados no experimento. B- Gráfico representativo do padrão de migração da linhagem CEM, tratada ou não com cada um dos peptídeos (A9a, ou A9s), frente a laminina. Conforme detalhado em Materiais e Métodos, 106 células foram colocadas sobre membrana de *transwell* com poros de 8 μ m previamente tratada com 10 μ g/mL de albumina bovina (BSA), ou laminina (LN). Após 4 horas de migração as células foram recolhidas da parte inferior da câmara e contadas em microscópio óptico. As barras representam médias + erro padrão referente a 2 experimentos feitos com triplicatas. Os valores de BSA foram deduzidos de cada um dos estímulos específicos. Os valores de p foram calculados comparando-se cada estímulo específico. **p<0.001, *p<0.01, NS (não significativo).

Capítulo 5

CONCLUSÕES

Técnicas de biologia computacional como modelagem e dinâmica molecular são fortes ferramentas de experimentação “*in silico*” para elucidar as peculiaridades moleculares das interações entre complexos protéicos, seus ligantes naturais e inibidores específicos. As técnicas experimentais que mais se aproximam da DM e dão apoio a esta são a Cristalografia de raio-X (estrutura) e a Ressonância Magnética Nuclear (estrutura e função). Embora essas técnicas permitam determinar estruturas macromoleculares, a DM permite que seja estudada em detalhes a dinâmica dessas estruturas.

No decorrer deste trabalho foram obtidos os primeiros modelos da estrutura protéica das ADAMs 2 e 9 humanas (região extracelular), e a da “cabeça” da integrina alfa β 1-*Hybrid* [domínio β -A e *hybrid* (cadeia β 1) e β -propeller (cadeia α 6)]. A integrina apresenta estrutura muito semelhante a resolvida por cristalografia para a integrina alfa β 3.

Os domínios metaloprotease (M), tipo-disintegrina (D) e rico em cisteína (C) das ADAMs humanas tem uma estrutura modular muito semelhante à resolvida por cristalografia para as SVMs, porém em solução os domínios que a formam tem uma flutuação bastante acentuada. Este comportamento sugere que a estrutura quaternária da arquitetura MDC das ADAMs humanas não se restringe ao modelo compacto e fechado proposto por cristalografia para as SVMs.

Através da técnica de DM podemos compreender a interação entre estas duas

proteínas, sendo possível a partir deste estudo o desenho de pequenos inibidores protéicos específicos para integrina alfa6beta1 com base na estrutura do *loop* de interação das ADAMs 2 e 9 humanas.

Os subdomínios CAP e SLD das integrinas são fatores estruturais importantes no reconhecimento e discriminação dos ligantes das integrinas.

Pequenas estruturas protéicas podem ser usadas como inibidores da atividade de integrinas, e usadas no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o combate de patologias associadas ao sistema imune e a processos de metástase. Os resultados obtidos para a movimentação do domínio *Hybrid* da alfa6beta1 sugerem que os ligantes peptídicos desenhados a partir do *loop* de interação da ADAM 9 são bons inibidores da atividade desta integrina. As análises “*in silico*” sugerem que os peptídeos A9b e A9e modelados interagem com a integrina alfa6beta1, mimetizando a ação do domínio ADAM9*dsl*, levando-nos a compreender a eficácia do desenvolvimento de inibidores protéicos da integrina alfa6beta1 a partir das estruturas dos peptídeos ADAM9*dsl*, A9b e A9e.

Assim, espera-se ter justificado o objetivo principal que norteou esta dissertação, indicando a metodologia de Dinâmica Molecular como uma ferramenta para a pesquisa e avaliação de proteínas complexadas com seus respectivos ligantes.

Capítulo 6

PERSPECTIVAS

As perspectivas deste projeto vêm se projetando tanto na área de experimentação “*in silico*” quanto na experimentação “*in vitro*”.

Prosseguindo na área de experimentação “*in silico*”, uma abordagem complementar a este estudo seria o emprego do método de docking a fim de reforçar a qualidade dos modelos integrina-inibidor propostos neste trabalho, conjuntamente com a verificação de afinidade receptor/ligante pelo cálculo de energia livre. Ainda é do interesse dos pesquisadores envolvidos neste estudo a expansão do modelo das estruturas das proteínas ADAM2 e 9 e da integrina alfa6beta1 (na porção extracelular) para o estudo dos mecanismos de interação destas proteínas em sistemas maiores e mais completos, modelados junto à membrana citoplasmática.

Já na área de experimentação “*in vitro*”, a aplicação mais importante observada para os inibidores peptídicos A9b e A9e propostos, seria seu uso para interagir de forma sistêmica com a integrina alfa6beta1. Estes experimentos estão sendo realizados atualmente em colaboração com pesquisadores da Fundação Osvaldo Cruz, no Laboratório de pesquisas sobre o Timo - Departamento de Imunologia, pela pesquisadora Dra. Suse Dayse Silva Barbosa.

Outro trabalho em desenvolvimento é a determinação das estruturas dos inibidores A9a, A9b e A9e por ressonância magnética nuclear (RMN) junto ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS (Campinas, S.P.) em colaboração com a Dra. Ana Carolina Zeri.

Referências Bibliográficas

- S. M. Albelda, S. A. Mette, e D. E. et al. Elder. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. **Cancer Res**, 50(20):6757–64, 1990.
- B. Alberts, J. Lewis, e et al. **Molecular Biology of the Cell**. Garland, 2002.
- E. A. Almeida, A. P. Huovila, e A. E. et al. Sutherland. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. **Cell**, 81(7):1095–104, 1995.
- S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, e et al. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 25(17):3389–402, 1997.
- M. A. Arnaout. Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion. **Immunol Rev**, 186:125–40, 2002.
- M. T. Assakura, C. A. Silva, e R. et al. Mentele. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a p-iii metalloproteinase from the venom of bothrops jararaca. **Toxicon**, 41(2):217–27, 2003.
- K. A. Baker e T. Hagg. Developmental and injury-induced expression of alpha1beta1 and alpha6beta1 integrins in the rat spinal cord. **Brain Res**, 1130(1):54–66, 2007.
- H. M. Berman, J. Westbrook, e Z. et al. Feng. The protein data bank. **Nucleic Acids Res**, 28(1):235–42, 2000.

- D. J. Bevitt, J. Mohamed, e J. B. et al. Catterall. Expression of adamts metalloproteinases in the retinal pigment epithelium derived cell line arpe-19: transcriptional regulation by tnfalpha. **Biochim Biophys Acta**, 1626(1-3):83–91, 2003.
- D. Bigler, M. Chen, S. Waters, e et al. A model for sperm-egg binding and fusion based on adams and integrins. **Trends Cell Biol**, 7(6):220–5, 1997.
- D. Bigler, Y. Takahashi, e M. S. et al. Chen. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse adam 2 (fertilin beta) and murine eggs. role of the alpha(6) integrin subunit. **J Biol Chem**, 275(16):11576–84, 2000.
- R. A. Black e J. M. White. Adams: focus on the protease domain. **Curr Opin Cell Biol**, 10(5):654–9, 1998.
- C. P. Blobel, T. G. Wolfsberg, e C. W. et al. Turck. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**, 356(6366):248–52, 1992.
- L. C. Bridges, D. Sheppard, e R. D. Bowditch. Adam disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7. **Biochem J**, 387(Pt 1):101–8, 2005.
- B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, e et al. Charmm : A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculation. **Journal of Computational Chemistry**, 4(2):187–217, 1983.
- C. D. Buckley e D. L. Simmons. Cell adhesion: a new target for therapy. **Mol Med Today**, 3(10):449–56, 1997.
- K. Burridge e M. Chrzanowska-Wodnicka. Focal adhesions, contractility, and signaling. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 12:463–518, 1996.
- T. V. Byzova, C. K. Goldman, e N. et al. Pampori. A mechanism for modulation

- of cellular responses to vegf: activation of the integrins. **Mol Cell**, 6(4):851–60, 2000.
- H. Cai, J. Kratzschmar, e D. et al. Alfandari. Neural crest-specific and general expression of distinct metalloprotease-disintegrins in early xenopus laevis development. **Dev Biol**, 204(2):508–24, 1998.
- S. Cal, J. M. Freije, e J. M. et al. Lopez. Adam 23/mdc3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an rgd-independent mechanism. **Mol Biol Cell**, 11(4):1457–69, 2000.
- J. J. Calvete. Structure-function correlations of snake venom disintegrins. **Curr Pharm Des**, 11(7):829–35, 2005.
- J. J. Calvete, C. Marcinkiewicz, e D. et al. Monleon. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, 45(8):1063–74, 2005.
- J. J. Calvete, M. P. Moreno-Murciano, e R. D. et al. Theakston. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem J**, 372(Pt 3):725–34, 2003.
- D. P. Cerretti, R. F. Dubose, e R. A. et al. Black. Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (adam) cdnas that show testis-specific gene expression. **Biochem Biophys Res Commun**, 263(3):810–5, 1999.
- H. C. Chen, P. A. Appeddu, e J. T. et al. Parsons. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. **J Biol Chem**, 270(28):16995–9, 1995.
- J. Chen, A. Salas, e T. A. Springer. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. **Nat Struct Biol**, 10(12):995–1001, 2003.
- I. Choi, J. M. Woo, e S. et al. Hong. Identification and characterization of adam32 with testis-predominant gene expression. **Gene**, 304:151–62, 2003.
- D. Choquet, D. P. Felsenfeld, e M. P. Sheetz. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. **Cell**, 88(1):39–48, 1997.

- J. Chung e A. M. Mercurio. Contributions of the alpha6 integrins to breast carcinoma survival and progression. **Mol Cells**, 17(2):203–9, 2004.
- M. G. Coppolino e S. Dedhar. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **Int J Biochem Cell Biol**, 32(2):171–88, 2000.
- F. F. Costa, C. Colin, e S. M. et al. Shinjo. Adam23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neurosci Lett**, 380(3):260–4, 2005.
- F. F. Costa, N. V. Verbisck, e A. C. et al. Salim. Epigenetic silencing of the adhesion molecule adam23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, 23(7):1481–8, 2004.
- D. Craig, M. Gao, e K. et al. Schulten. Structural insights into how the midas ion stabilizes integrin binding to an rgd peptide under force. **Structure**, 12(11):2049–58, 2004.
- M. H. Disatnik e T. A. Rando. Integrin-mediated muscle cell spreading. the role of protein kinase c in outside-in and inside-out signaling and evidence of integrin cross-talk. **J Biol Chem**, 274(45):32486–92, 1999.
- L. W. Donaldson, G. Gish, e T. et al. Pawson. Structure of a regulatory complex involving the abl sh3 domain, the crk sh2 domain, and a crk-derived phosphopeptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99(22):14053–8, 2002.
- M. J. Duffy, T. M. Maguire, e A. et al. Hill. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Res**, 2(4):252–7, 2000.
- E. Pulkin-Faucher, M. Gao, e V. Vogel. How the headpiece hinge angle is opened: new insights into the dynamics of integrin activation. **The Journal of Cell Biology**, 175(2):349–360, 2006.
- K. Eto, C. Huet, e T. et al. Tarui. Functional classification of adams based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **J Biol Chem**, 277(20):17804–10, 2002.

- J. P. Evans, R. M. Schultz, e G. S. Kopf. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin alpha subunit to mouse eggs: evidence for function as a cell adhesion molecule in sperm-egg binding. **Dev Biol**, 187(1): 94–106, 1997.
- Ge. Foley, H. Lazarus, Bg. Uzman, Ba. Boone, e Re. Mccarthy. Continuous culture of human lymphoblast from peripheral blood of a acute leukemia. **Cancer**, - (18):522–529, 1965.
- J. W. Fox e S. M. Serrano. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the m12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, 45(8):969–85, 2005.
- Z. R. Gan, R. J. Gould, e J. W. et al. Jacobs. Echistatin. a potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, echis carinatus. **J Biol Chem**, 263(36):19827–32, 1988.
- A. Gaultier, H. Cousin, e T. et al. Darribere. Adam13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. **J Biol Chem**, 277(26):23336–44, 2002.
- S. E. Gill, M. C. Pape, e R. et al. Khokha. A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis. **Dev Biol**, 261(2):313–23, 2003.
- B. J. Gilpin, F. Loechel, e M. G. et al. Mattei. A novel, secreted form of human adam 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. **J Biol Chem**, 273(1): 157–66, 1998.
- R. J. Gould, M. A. Polokoff, e P. A. et al. Friedman. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc Soc Exp Biol Med**, 195 (2):168–71, 1990.
- L. J. Green, A. P. Mould, e M. J. Humphries. The integrin beta subunit. **Int J Biochem Cell Biol**, 30(2):179–84, 1998.

- N. Groome, A. Chantry, C. Earl, e et al. A new epitope on human myelin basic protein arising from cleavage by a metalloendoprotease associated with brain myelin membranes. **J Neuroimmunol**, 19(1-2):77–88, 1988.
- J. L. Guan, J. E. Trevithick, e R. O. Hynes. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kda protein. **Cell Regul**, 2(11):951–64, 1991.
- W. F. Van Gunsteren e H. J. Berendsen. Thermodynamic cycle integration by computer simulation as a tool for obtaining free energy differences in molecular chemistry. **J Comput Aided Mol Des**, 1(2):171–6, 1987.
- S. K. Gupta, K. Alves, L. O. Palladino, e et al. Molecular cloning of the human fertilin beta subunit. **Biochem Biophys Res Commun**, 224(2):318–26, 1996.
- R. J. Hall e C. A. Erickson. Adam 10: an active metalloprotease expressed during avian epithelial morphogenesis. **Dev Biol**, 256(1):146–59, 2003.
- C. Ham, B. Levkau, e E. W. et al. Raines. Adam15 is an adherens junction molecule whose surface expression can be driven by ve-cadherin. **Exp Cell Res**, 279(2): 239–47, 2002.
- J. Hermans, J. C. Berendsen, W. F. van Gunsteren, e J. P. M. Postma. A consistent empirical potential for water-protein interactions. **Biopolymers**, 23:1513–1518, 1984.
- L. A. Hite, L. G. Jia, e J. B. et al. Bjarnason. cdna sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch Biochem Biophys**, 308(1):182–91, 1994.
- N. Hogg, R. Henderson, e B. et al. Leitinger. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. **Immunol Rev**, 186:164–71, 2002.

- L. Howard, X. Lu, S. Mitchell, e et al. Molecular cloning of madm: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. **Biochem J**, 317 (Pt 1):45–50, 1996.
- A. Howe, A. E. Aplin, e S. K. et al. Alahari. Integrin signaling and cell growth control. **Curr Opin Cell Biol**, 10(2):220–31, 1998.
- X. Hu e W. H. Shelver. Docking studies of matrix metalloproteinase inhibitors: zinc parameter optimization to improve the binding free energy prediction. **J Mol Graph Model**, 22(2):115–26, 2003.
- T. F. Huang, J. H. Chang, e C. Ouyang. Characterization of hemorrhagic principles from trimeresurus gramineus snake venom. **Toxicon**, 22(1):45–52, 1984.
- T. F. Huang, Y. J. Wu, e C. Ouyang. Characterization of a potent platelet aggregation inhibitor from agkistrodon rhodostoma snake venom. **Biochim Biophys Acta**, 925(3):248–57, 1987.
- P. E. Hughes, F. Diaz-Gonzalez, e L. et al. Leong. Breaking the integrin hinge. a defined structural constraint regulates integrin signaling. **J Biol Chem**, 271 (12):6571–4, 1996.
- M. J. Humphries. Integrin structure. **Biochem Soc Trans**, 28(4):311–39, 2000.
- M. J. Humphries, P. A. Mcewan, e S. J. et al. Barton. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. **Trends Biochem Sci**, 28(6):313–20, 2003.
- T. L. Hurskainen, S. Hirohata, M. F. Seldin, e et al. Adam-ts5, adam-ts6, and adam-ts7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. general features and genomic distribution of the adam-ts family. **J Biol Chem**, 274(36): 25555–63, 1999.
- R. O. Hynes. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, 48(4):549–54, 1987.

- R. O. Hynes. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, 69(1):11–25, 1992a.
- R. O. Hynes. Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. **Curr Opin Genet Dev**, 2(4):621–4, 1992b.
- R. O. Hynes. Cell adhesion: old and new questions. **Trends Cell Biol**, 9(12):M33–7, 1999.
- R. O. Hynes, J. C. Lively, e J. H. et al. Mccarty. The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 67:143–53, 2002.
- K. Iba, R. Albrechtsen, e B. J. et al. Gilpin. Cysteine-rich domain of human adam 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **Am J Pathol**, 154(5):1489–501, 1999.
- T. Igarashi, S. Araki, H. Mori, e et al. Crystal structures of catrocollastatin/vap2b reveal a dynamic, modular architecture of adam/adamalysin/reprolysin family proteins. **FEBS Lett**, 581(13):2416–22, 2007.
- L. G. Jia, X. M. Wang, e J. D. et al. Shannon. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin a. inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J Biol Chem**, 272(20):13094–102, 1997.
- L. G. Jia, X. M. Wang, e J. D. et al. Shannon. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin a. **Arch Biochem Biophys**, 373(1):281–6, 2000.
- M. Jirouskova, J. K. Jaiswal, e B. S. Coller. Ligand density dramatically affects integrin alpha iib beta 3-mediated platelet signaling and spreading. **Blood**, 109(12):5260–9, 2007.
- G. L. Johnson e R. Lapadat. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by erk, jnk, and p38 protein kinases. **Science**, 298(5600):1911–2, 2002.

- L. S. Jones e S. Y. Grooms. Normal and aberrant functions of integrins in the adult central nervous system. **Neurochem Int**, 31(4):587–95, 1997.
- W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, e J. Tirado-Rives. "development and testing of the opls all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of American Chemical Society.**, 118:11225–11236, 1996.
- A. Karadag, M. Zhou, e P. I. Croucher. Adam-9 (mdc-9/meltrin-gamma), a member of the a disintegrin and metalloproteinase family, regulates myeloma-cell-induced interleukin-6 production in osteoblasts by direct interaction with the alpha(v)beta5 integrin. **Blood**, 107(8):3271–8, 2006.
- I. Karkkainen, E. Rybnikova, e M. et al. Peltto-Huikko. Metalloprotease-disintegrin (adam) genes are widely and differentially expressed in the adult cns. **Mol Cell Neurosci**, 15(6):547–60, 2000.
- M. Karplus e G. A. Petsko. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, 347(6294):631–9, 1990.
- L. Killar, J. White, e R. et al. Black. Adamalysins. a family of metzincins including tnf-alpha converting enzyme (tace). **Ann N Y Acad Sci**, 878:442–52, 1999.
- R. M. Kini. Do we know the complete sequence of metalloproteinase and nonenzymatic platelet aggregation inhibitor (disintegrin) precursor proteins? **Toxicon**, 33(9):1151–60, 1995.
- R. M. Kini, C. Y. Zhang, e B. K. Tan. Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains. **Toxicon**, 35(4): 529–35, 1997.
- L. D. Klentzeris, J. N. Bulmer, e L. K. et al. Trejdosiewicz. Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. **Hum Reprod**, 8(8):1223–30, 1993.

- L. Kornberg, H. S. Earp, e J. T. et al. Parsons. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. **J Biol Chem**, 267(33):23439–42, 1992.
- J. Kratzschmar, L. Lum, e C. P. Blobel. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an rgd integrin binding sequence. **J Biol Chem**, 271(9):4593–6, 1996.
- E. Krissinel e K. Henrick. Secondary-structure matching (ssm), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 60(Pt 12 Pt 1):2256–68, 2004.
- T. Kurisaki, S. Wakatsuki, e A. Sehara-Fujisawa. Meltrin beta mini, a new adam19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells. **FEBS Lett**, 532(3):419–22, 2002.
- S. E. Laflamme e K. L. Auer. Integrin signaling. **Semin Cancer Biol**, 7(3):111–8, 1996.
- R. A. Laskowski, J. A. Rullmann, e M. W. et al. Macarthur. Aqua and procheck-nmr: programs for checking the quality of protein structures solved by nmr. **J Biomol NMR**, 8(4):477–86, 1996.
- A. M. Lesk, L. Lo Conte, e T. J. Hubbard. Assessment of novel fold targets in casp4: predictions of three-dimensional structures, secondary structures, and interresidue contacts. **Proteins**, Suppl 5:98–118, 2001.
- B. A. Lessey, A. J. Castelbaum, e S. W. et al. Sawin. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, 79(2):643–9, 1994.
- J. M. Lewis e M. A. Schwartz. Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin beta 1 cytoplasmic domain mutants. **Mol Biol Cell**, 6(2):151–60, 1995.

- R. C. Liddington e L. A. Bankston. The structural basis of dynamic cell adhesion: heads, tails, and allostery. **Exp Cell Res**, 261(1):37–43, 2000.
- T. H. Lin, Q. Chen, e A. et al. Howe. Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases. **J Biol Chem**, 272(14): 8849–52, 1997.
- L. Liu e J. W. Smith. Identification of adam 31: a protein expressed in leydig cells and specialized epithelia. **Endocrinology**, 141(6):2033–42, 2000.
- S. Liu, D. A. Calderwood, e M. H. Ginsberg. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. **J Cell Sci**, 113 (Pt 20):3563–71, 2000.
- S. H. Lo e L. B. Chen. Focal adhesion as a signal transduction organelle. **Cancer Metastasis Rev**, 13(1):9–24, 1994.
- F. Loechel, J. W. Fox, e G. et al. Murphy. Adam 12-s cleaves igfbp-3 and igfbp-5 and is inhibited by timp-3. **Biochem Biophys Res Commun**, 278(3):511–5, 2000.
- F. Loechel, B. J. Gilpin, E. Engvall, e et al. Human adam 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. **J Biol Chem**, 273(27):16993–7, 1998.
- F. Loechel, M. T. Overgaard, C. Oxvig, e et al. Regulation of human adam 12 protease by the prodomain. evidence for a functional cysteine switch. **J Biol Chem**, 274(19):13427–33, 1999.
- R. M. Mahimkar, O. Visaya, e A. S. et al. Pollock. The disintegrin domain of adam9: a ligand for multiple beta1 renal integrins. **Biochem J**, 385(Pt 2): 461–8, 2005.
- M. A. Mclane, E. E. Sanchez, e A. et al. Wong. Disintegrins. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**, 4(4):327–55, 2004.
- S. Miyamoto, H. Teramoto, e J. S. et al. Gutkind. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and map kinase

- activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. **J Cell Biol**, 135(6 Pt 1):1633–42, 1996.
- L. Moro, M. Venturino, e C. et al. Bozzo. Integrins induce activation of egf receptor: role in map kinase induction and adhesion-dependent cell survival. **Embo J**, 17 (22):6622–32, 1998.
- A. M. Moura-Da-Silva, C. Marcinkiewicz, e M. et al. Marcinkiewicz. Selective recognition of alpha2beta1 integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from bbothrops jararaca venom. **Thromb Res**, 102(2):153–9, 2001.
- H. Muramatsu, P. Zou, e H. et al. Suzuki. alpha4beta1- and alpha6beta1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. **J Cell Sci**, 117(Pt 22):5405–15, 2004.
- D. Nath, P. M. Slocombe, e A. et al. Webster. Meltrin gamma(adam-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. **J Cell Sci**, 113 (Pt 12):2319–28, 2000.
- S. Niewiarowski, M. A. Mclane, M. Kloczewiak, e et al. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin Hematol**, 31(4):289–300, 1994.
- K. Nishiwaki, N. Hisamoto, e K. Matsumoto. A metalloprotease disintegrin that controls cell migration in caenorhabditis elegans. **Science**, 288(5474):2205–8, 2000.
- A. E. Oliver, L. M. Crowe, P. S. De Araujo, e et al. Arbutin inhibits pla2 in partially hydrated model systems. **Biochim Biophys Acta**, 1302(1):69–78, 1996.
- C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, e et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the gromos force-field parameter sets 53a5 and 53a6. **J Comput Chem**, 25(13):1656–76, 2004.

- C. A. Orengo, D. T. Jones, e J. M. Thornton. Protein superfamilies and domain superfolds. **Nature**, 372(6507):631–4, 1994.
- C. Ouyang e T. F. Huang. Potent platelet aggregation inhibitor from trimeresurus gramineus snake venom. **Biochim Biophys Acta**, 757(3):332–41, 1983.
- C. Ouyang e T. F. Huang. Effect of the purified phospholipases a2 from snake and bee venoms on rabbit platelet function. **Toxicon**, 22(5):705–18, 1984.
- M. J. Paine, H. P. Desmond, e R. D. et al. Theakston. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from bothrops jararaca venom. insights into the disintegrin gene family. **J Biol Chem**, 267(32):22869–76, 1992.
- M. A. Partridge e E. E. Marcantonio. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. **Mol Biol Cell**, 17(10):4237–48, 2006.
- L. Petruzzelli, M. Takami, e H. D. Humes. Structure and function of cell adhesion molecules. **Am J Med**, 106(4):467–76, 1999.
- E. F. Plow, T. A. Haas, e L. et al. Zhang. Ligand binding to integrins. **J Biol Chem**, 275(29):21785–8, 2000.
- K. Poindexter, N. Nelson, e R. F. et al. Dubose. The identification of seven metalloproteinase-disintegrin (adam) genes from genomic libraries. **Gene**, 237(1):61–70, 1999.
- S. Porter, S. D. Scott, e E. M. et al. Sassoon. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. **Clin Cancer Res**, 10(7):2429–40, 2004.
- M. Roghani, J. D. Becherer, e M. L. et al. Moss. Metalloprotease-disintegrin mdc9: intracellular maturation and catalytic activity. **J Biol Chem**, 274(6):3531–40, 1999.

- E. Rybnikova, I. Karkkainen, e M. et al. Peltto-Huikko. Developmental regulation and neuronal expression of the cellular disintegrin adam11 gene in mouse nervous system. **Neuroscience**, 112(4):921–34, 2002.
- K. Sagane, Y. Ohya, e Y. et al. Hasegawa. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins mdc2 and mdc3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem J**, 334 (Pt 1):93–8, 1998.
- A. Sali. Target practice. **Nat Struct Biol**, 8(6):482–4, 2001.
- A. Sali, L. Potterton, e F. et al. Yuan. Evaluation of comparative protein modeling by modeller. **Proteins**, 23(3):318–26, 1995.
- R. Sanchez e A. Sali. Evaluation of comparative protein structure modeling by modeller-3. **Proteins**, Suppl 1:50–8, 1997.
- R. Sanchez e A. Sali. Large-scale protein structure modeling of the saccharomyces cerevisiae genome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95(23):13597–602, 1998.
- H. Sawai, Y. Okada, e H. et al. Funahashi. Integrin-linked kinase activity is associated with interleukin-1 alpha-induced progressive behavior of pancreatic cancer and poor patient survival. **Oncogene**, 25(23):3237–46, 2006.
- M. D. Schaller e J. T. Parsons. Focal adhesion kinase and associated proteins. **Curr Opin Cell Biol**, 6(5):705–10, 1994.
- U. Schlomann, S. Rathke-Hartlieb, e S. et al. Yamamoto. Tumor necrosis factor alpha induces a metalloprotease-disintegrin, adam8 (cd 156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. **J Neurosci**, 20(21):7964–71, 2000.
- J. Schlondorff e C. P. Blobel. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. **J Cell Sci**, 112 (Pt 21):3603–17, 1999.

- M. A. Schwartz e V. Baron. Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. **Curr Opin Cell Biol**, 11(2):197–202, 1999.
- M. A. Schwartz, M. D. Schaller, e M. H. Ginsberg. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 11:549–99, 1995.
- D. F. Seals e S. A. Courtneidge. The adams family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev**, 17(1):7–30, 2003.
- D. R. Senger, K. P. Claffey, e J. E. et al. Benes. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94(25):13612–7, 1997.
- Y. Shan, J. L. Klepeis, M. P. Eastwood, e et al. Gaussian split ewald: A fast ewald mesh method for molecular simulation. **J Chem Phys**, 122(5):54101, 2005.
- J. R. Sheu, C. H. Lin, e H. C. et al. Peng. Triflavin, an arg-gly-asp-containing peptide, inhibits human cervical carcinoma (hela) cell-substratum adhesion through an rgd-dependent mechanism. **Peptides**, 15(8):1391–8, 1994.
- K. Shimokawa, J. D. Shannon, e L. G. et al. Jia. Sequence and biological activity of catrocollastatin-c: a disintegrin-like/cysteine-rich two-domain protein from crotalus atrox venom. **Arch Biochem Biophys**, 343(1):35–43, 1997.
- S. Shiokawa, Y. Yoshimura, e S. et al. Nagamatsu. Function of beta 1 integrins on human decidual cells during implantation. **Biol Reprod**, 54(4):745–52, 1996.
- J. B. Smith, R. D. Theakston, e A. L. et al. Coelho. Characterization of a monomeric disintegrin, ocellatusin, present in the venom of the nigerian carpet viper, echis ocellatus. **FEBS Lett**, 512(1-3):111–5, 2002.
- D. H. Souza, M. R. Iemma, L. L. Ferreira, e et al. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch Biochem Biophys**, 384(2):341–50, 2000.

- D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, e et al. Gromacs: fast, flexible, and free. **J Comput Chem**, 26(16):1701–18, 2005.
- T. A. Springer. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, 346(6283): 425–34, 1990.
- T. A. Springer. Folding of the n-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94(1): 65–72, 1997.
- P. Sriramarao, P. Steffner, e K. R. Gehlsen. Biochemical evidence for a homophilic interaction of the alpha 3 beta 1 integrin. **J Biol Chem**, 268(29):22036–41, 1993.
- Y. P. Sun, K. J. Deng, e F. et al. Wang. Two novel isoforms of adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene**, 325:171–8, 2004.
- B. E. Symington, Y. Takada, e W. G. Carter. Interaction of integrins alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1: potential role in keratinocyte intercellular adhesion. **J Cell Biol**, 120(2):523–35, 1993.
- S. Tabibzadeh. Ubiquitous expression of tnf-alpha/cachectin immunoreactivity in human endometrium. **Am J Reprod Immunol**, 26(1):1–4, 1991.
- J. Takagi, D. P. Debottis, e H. P. et al. Erickson. The role of the specificity-determining loop of the integrin beta subunit i-like domain in autonomous expression, association with the alpha subunit, and ligand binding. **Biochemistry**, 41(13):4339–47, 2002.
- S. Takeda, T. Igarashi, e H. et al. Mori. Crystal structures of vap1 reveal adams' mdc domain architecture and its unique c-shaped scaffold. **Embo J**, 25(11): 2388–96, 2006.

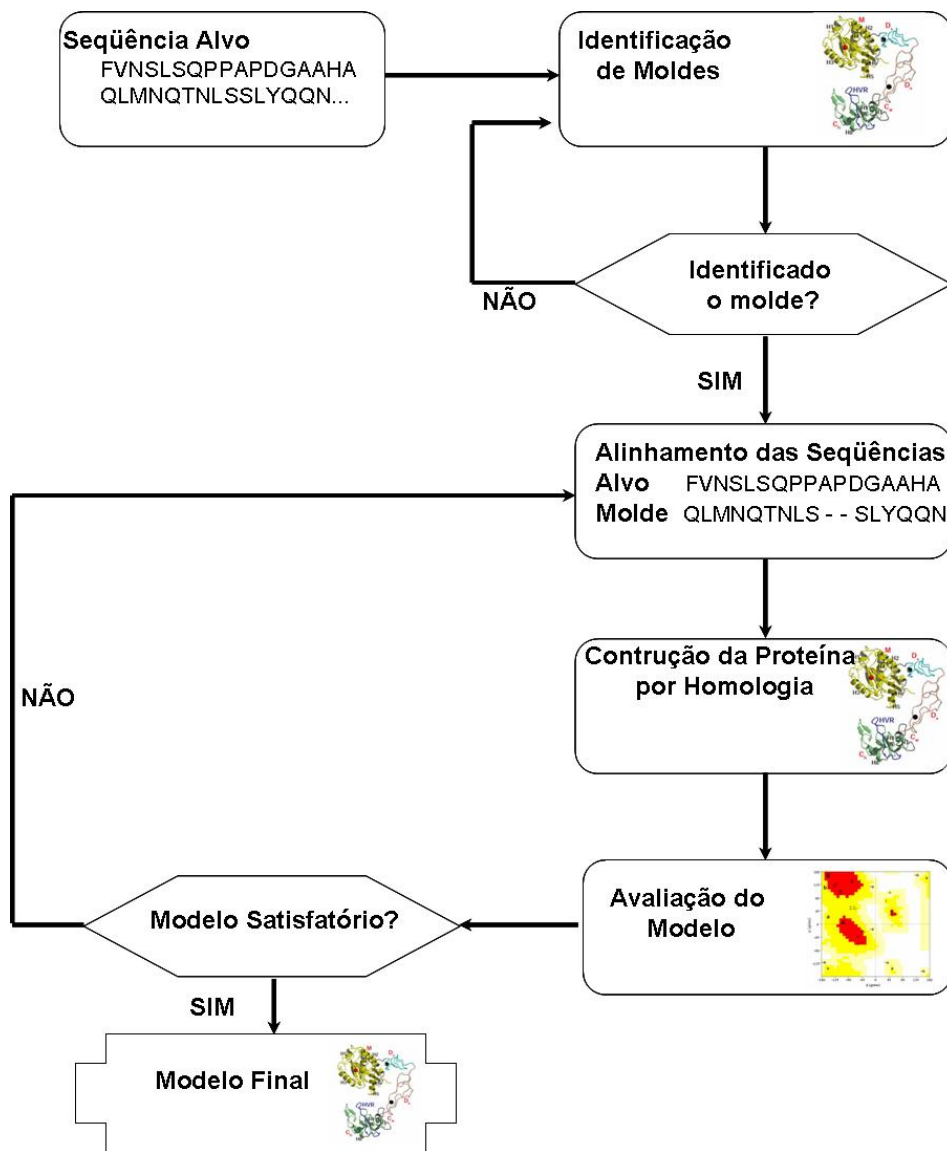
- N. Takizawa, T. C. Smith, e T. et al. Nebl. Supervillin modulation of focal adhesions involving trip6/zrp-1. **J Cell Biol**, 174(3):447–58, 2006.
- I. Tanjoni, D. Butera, e L. et al. Bento. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, 42(7):801–8, 2003a.
- I. Tanjoni, D. Butera, e P. J. et al. Spencer. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. **Toxicon**, 42(7):809–16, 2003b.
- D. Tarin. Clinical and experimental studies on the biology of metastasis. **Biochim Biophys Acta**, 780(3):227–35, 1985.
- M. Tomczuk, Y. Takahashi, e J. et al. Huang. Role of multiple beta1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of adams 2 and 3. **Exp Cell Res**, 290(1):68–81, 2003.
- Y. Usami, Y. Fujimura, e S. et al. Miura. A 28 kda-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-c) purified from bothrops jararaca venom inhibits collagen- and adp-induced platelet aggregation. **Biochem Biophys Res Commun**, 201(1):331–9, 1994.
- C. Van Waes. Cell adhesion and regulatory molecules involved in tumor formation, hemostasis, and wound healing. **Head Neck**, 17(2):140–7, 1995.
- O. Vinogradova, A. Velyvis, e A. et al. Velyviene. A structural mechanism of integrin alpha(iib)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. **Cell**, 110(5):587–97, 2002.
- G. Wagner e D. F. Wyss. Cell surface adhesion receptors. **Curr Opin Struct Biol**, 4(6):841–51, 1994.
- S. J. Weiner e P. A. Kollman. An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. **Journal of Computational Chemistry**, 7:230–252, 1986.

- Z. Werb. Ecm and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. **Cell**, 91 (4):439–42, 1997.
- G. Weskamp e C. P. Blobel. A family of cellular proteins related to snake venom disintegrins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91(7):2748–51, 1994.
- G. Weskamp, H. Cai, e T. A. et al. Brodie. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin mdc9 (adam9) have no evident major abnormalities during development or adult life. **Mol Cell Biol**, 22(5):1537–44, 2002.
- J. M. White. Adams: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol**, 15(5):598–606, 2003.
- S. Wiesner, K. R. Legate, e R. Fassler. Integrin-actin interactions. **Cell Mol Life Sci**, 62(10):1081–99, 2005.
- T. G. Wolfsberg, P. Primakoff, e D. G. et al. Myles. Adam, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J Cell Biol**, 131 (2):275–8, 1995.
- E. Wu, P. I. Croucher, e N. Mckie. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family adam in cells derived from a range of haematological malignancies. **Biochem Biophys Res Commun**, 235(2):437–42, 1997.
- T. Xiao, J. Takagi, B. S. Collier, e et al. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. **Nature**, 432(7013):59–67, 2004.
- J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, e et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha vbeta3. **Science**, 294(5541):339–45, 2001.
- J. P. Xiong, T. Stehle, e S. L. et al. Goodman. Integrins, cations and ligands: making the connection. **J Thromb Haemost**, 1(7):1642–54, 2003.

- J. P. Xiong, T. Stehle, e R. et al. Zhang. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha vbeta3 in complex with an arg-gly-asp ligand. **Science**, 296(5565):151–5, 2002.
- A. Yamada, Y. Nojima, K. Sugita, e et al. Cross-linking of vla/cd29 molecule has a co-mitogenic effect with anti-cd3 on cd4 cell activation in serum-free culture system. **Eur J Immunol**, 21(2):319–25, 1991.
- P. Yang, K. A. Baker, e T. Hagg. The adams family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. **Prog Neurobiol**, 79(2):73–94, 2006.
- R. Yuan, P. Primakoff, e D. G. Myles. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the adam family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. **J Cell Biol**, 137(1):105–12, 1997.
- I. Zachary e E. Rozengurt. Focal adhesion kinase (p125fak): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes. **Cell**, 71(6):891–4, 1992.
- X. P. Zhang, T. Kamata, e K. et al. Yokoyama. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of mdc-15 (metargidin, adam-15) with integrin alphavbeta3. **J Biol Chem**, 273(13):7345–50, 1998.
- H. M. Zhou, G. Weskamp, V. Chesneau, e et al. Essential role for adam19 in cardiovascular morphogenesis. **Mol Cell Biol**, 24(1):96–104, 2004.
- Q. Zhou, C. Dangelmaier, e J. B. Smith. The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. **Biochem Biophys Res Commun**, 219(3):720–6, 1996.
- Q. Zhou, J. B. Smith, e M. H. Grossman. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from crotalus atrox (western diamond-back rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochem J**, 307 (Pt 2):411–7, 1995.

- P. Zhu, Y. Sun, R. Xu, e et al. The interaction between adam 22 and 14-3-3zeta: regulation of cell adhesion and spreading. **Biochem Biophys Res Commun**, 301(4):991–9, 2003.
- X. Zhu e J. P. Evans. Analysis of the roles of rgd-binding integrins, alpha(4)/alpha(9) integrins, alpha(6) integrins, and cd9 in the interaction of the fertilin beta (adam2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. **Biol Reprod**, 66(4):1193–202, 2002.
- M. M. Zutter, S. A. Santoro, e W. D. et al. Staatz. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92(16):7411–5, 1995.

Figura A.2: Esquema de Modelagem por Homologia.



Etapas do processo de construção do modelo estrutural por homologia.

Figura A.3: Esquema de Dinâmica Molecular.

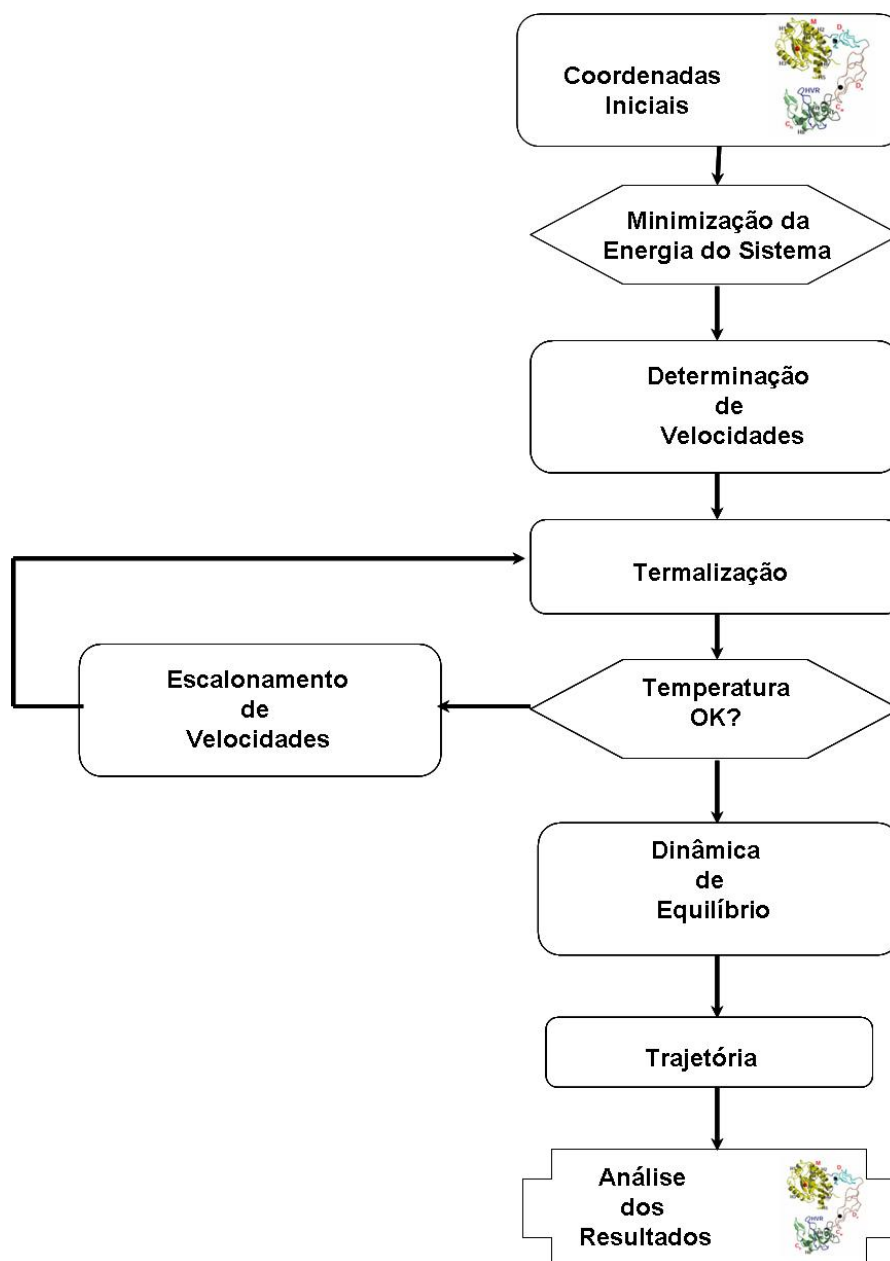
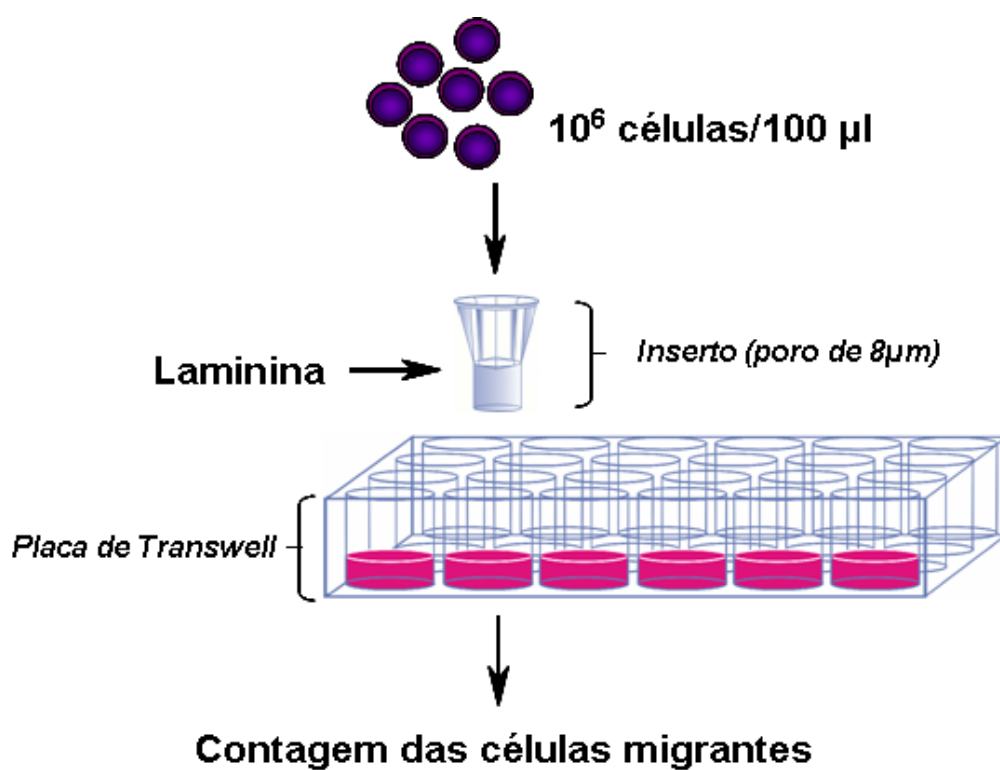


Diagrama esquemático com as etapas de Simulação de Dinâmica Molecular.

Figura A.4: Esquema representativo da Câmara de *Transwell*.



Representação da placa de transwell e inserto. A membrana porosa presente no inserto foi tratada com a proteína de matriz extracelular laminina. Após a aplicação de células sobre o inserto (parte superior da câmara), ocorre a migração e quantificação de células migrantes na parte inferior (placa).

Apêndice B

Scripts de Modelagem Molecular

B.1 *Malign.py*

```
# Step 2: family alignment
#
# Prepare an initial multiple family alignment of all structures and sequences
# related to your target sequence. For simplicity, only those structures found
# by search.py are aligned here. In general, you should add all the related
# structures found in MODINSTALL/modlib/seqfilt3.030XN.grp and all the
# related sequences that you can find by FASTA, BLAST, in papers, etc. For
# example, 2fdn, identified by search.py, is also related to
# 1clf 1fca 1fdn 1fdx 2fdn, as found in
# MODINSTALL/modlib/CHAINS3.0 40 XN.grp.
#
# Note: if you wanted to align more than one sequence (in addition to the target
sequence)
you'd have to modify the "alignstrsseq" routine.
from modeller.scripts import alignstrsseqlog.verbose()
env = environ()
# Set defaults
# Directories with input atom
files:env.io.atom_files_directory = './: ../atom_files'
```

```

# Identity matrix filename: env.matrix_file = 'fer2.id.mat'
# Write out the superposed structures: env.write_fit = True
# Some alignment parameters: env.overhang = 4
aln = align_structures(env,
    # Name of the input file specifying templates and the
    # target sequence: segfile='1L5Gavb3Modif2.seg',
    # Output alignment filename ('PIR' format) alnfile='A6B1+avb3Hybrid.ali',
    # Structures' PDB codes: knowns=('1L5Gavb3Modif'),
    # Target sequence code: sequence='A6B1_Hybrid')
# Write out the alignment in the 'PAP' format, too:
aln.write(file='A6B1Hybrid.seg.pap',
alignment_format = 'PAP')

```

B.2 Model.py

```

# A sample script for fully automated comparative modeling
from modeller.automodel import * # Load the automodel class
log.verbose()
env = environ()
env.io.hydrogen = env.io.hetatm = env.io.water = True # to read any HETATM
#
# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = './: ../atom_files'
a = automodel(env,
    # file with template codes and target sequence alnfile = '2ERPModif.ali',
    # PDB codes of the templates knowns = '2ERPModif.pdb',
    # code of the target sequence = 'A2')
a.autoalign() # get an automatic alignment a.make() # do homology modelling

```


B.3 *Otimize.py*

```
# Step 2: family alignment
#
# Prepare an initial multiple family alignment of all structures and sequences
# related to your target sequence. For simplicity, only # those structures found
# by search.py are aligned here. In general, you should
# add all the related # structures found in
MODINSTALL/modlib/seqfilt3.030XN.grp and all # the
# related sequences that you can find by FASTA, BLAST, in # papers, etc. For
# example, 2fdn, identified by search.py, is also related to
# 1clf 1fca 1fdn 1fdx 2fdn, as found in
# MODINSTALL/modlib/CHAINS3.040XN.grp.
#
# Note: if you wanted to align more than one sequence (in # addition to the
# target sequence) you'd have to modify the
'align_strs_eq' routine.
from modeller.automodel import *
# Redefine the special_patches routine to include the
additional disulfides
# (this routine is empty by default):
# class mymodel(automodel):
# def special_patches(self, aln) :
#     # A disulfide between residues X and Y in chain -:
#     self.patch(residuetype='DISU', residue_ids = ('8 :', '26 :'))
#     self.patch(residuetype='DISU', residue_ids = ('72 :', '96 :'))
#     self.patch(residuetype='DISU', residue_ids = ('19 :', '33 :'))
#     self.patch(residuetype='DISU', residue_ids = ('21 :', '34 :'))
#     self.patch(residuetype='DISU', residue_ids = ('39 :', '53 :'))
#     self.patch(residuetype='DISU', residue_ids = ('47 :', '78 :'))
```

```
# self.patch(residuetype='DISU', residue_ids = ('52 :', '56 :'))
# self.patch(residuetype='DISU', residue_ids = ('65 :', '85 :'))
log.verbose() env = environ() env.io.hydrogen =
env.io.hetatm = env.io.water = True
a = automodel(env, alnfile='2ERP2.ali', knowns=('2ERP'), sequence='A2')
# Very thorough VTFM optimization:
a.library_schedule = 1
a.maxvariterations = 300
# Very thorough MD optimization:
a.mdlevel = refine.very_low
# Repeat the whole cycle 3-times and do not stop unless obj.func. > 1E6
a.repeatoptimization = 3
a.maxmolpdf = 1e6
a.make()
```

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](#)