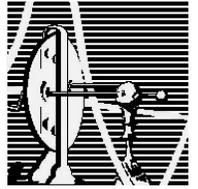




Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho



Mauricio Garcia de Souza Costa

Estudo computacional de interações entre a heparina e proteínas relacionadas à angiogênese tumoral

Orientador: Dr. PEDRO GERALDO PASCUTTI

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Mauricio Garcia de Souza Costa

Estudo computacional de interações entre a heparina e proteínas relacionadas à angiogênese tumoral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Biofísica).

Orientador:

Dr. Pedro Geraldo Pascutti – IBCCF – UFRJ

Rio de Janeiro

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

Centro de Ciências da Saúde, Bloco G - Sala G1-003 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão, CEP: 21949-900 - Rio de Janeiro - RJ

Este exemplar é de propriedade do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmear ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

COSTA, Mauricio Garcia de Souza

Estudo computacional de interações entre a heparina e proteínas relacionadas à angiogênese tumoral/ Mauricio Garcia de Souza Costa. - Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

111 f. 44 il, 8tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

- I. Câncer .
- II. Catepsina B.
- III. Endostatina.
- IV. Modelagem Molecular

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

MAURICIO GARCIA DE SOUZA COSTA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Dr. Pedro Geraldo Pascutti.

Aprovada em 26 de agosto de 2009 pela seguinte Banca Examinadora:

Dr. Pedro Geraldo Pascutti. – IBCCF/UFRJ – Presidente

Dra. Ana Paula Cabral de Araújo Lima – IBCCF/UFRJ

Dr. Laurent Emmanuel Dardenne – LNCC

Dra. Kátia Zaccur Leal - UFF

Dr. Paulo Mascarello Bisch – IBCCF/UFRJ – Revisor e Suplente interno

Dr. Ernesto Raúl Caffarena. - FIOCRUZ – Suplente externo

Rio de Janeiro

2009

Abreviaturas

- Å** – Ângstron
- catB** – Catepsina B
- DM** – Dinâmica Molecular
- GAG** – Glicosaminoglicano
- HEP** – Heparina
- LGA** – Algoritmo Genético Lamarchiano
- MC** – Cadeia principal (Main Chain)
- MMP** – Metalo-proteinase de matriz extracelular
- PCA** – Análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*)
- PDB** – *Protein Data Bank*
- RMSD** – Raiz do desvio quadrático médio (*Root Mean Square Deviation*)
- RMSF** – Raiz da flutuação média quadrática (*Root Mean Square Fluctuation*)
- RMN** – Ressonância Magnética Nuclear
- SC** – Cadeia lateral (Side Chain)
- SEM** – Microscopia de Escaneamento de Elétrons
- SPC** – *Single Point Charge*
- uPA** – Ativador de plasminogênio-urocinase

Resumo

Uma etapa primordial no desenvolvimento metastático é a estimulação de forte atividade proteolítica na periferia do tumor. Tal evento além de permitir a migração das células tumorais pela matriz extracelular favorece o crescimento de novos vasos (angiogênese). Este processo angiogênico permite que os tumores cresçam a partir de determinado tamanho e atinjam a corrente sanguínea. A enzima proteolítica catepsina B e a proteína antiangiogênica endostatina são dois alvos farmacológicos promissores na tentativa de combater tumores. Estas duas proteínas têm suas atividades moduladas pela interação com o glicosaminoglicano heparan sulfato, encontrado em abundância nas superfícies celulares e na matriz extracelular. Esta dissertação visa estudar a partir de técnicas de modelagem molecular o comportamento destas proteínas ao interagir com heparina, usada como modelo de heparan sulfato. A partir dos resultados obtidos foi possível se discutir aspectos ainda não observados experimentalmente a respeito da dinâmica da catepsina B que podem ser determinantes no desenvolvimento de novos inibidores. Já para a endostatina, os resultados permitem a re-discussão de dados experimentais e como resultado foi proposto um novo modelo de interação entre a proteína e o heparan sulfato.

Abstract

Proteolysis is a crucial event in metastatic development. Besides creating a path for the migrating tumor cells, proteolysis is an important step in the development of angiogenesis in the tumor periphery. This process allows tumors to grow beyond a certain size and also the tumor cells reach the blood stream. Cathepsin B, a lysosomal cysteine proteinase, and the antiangiogenic protein endostatin have been shown through the last years as key participants in metastasis, appearing as two promising pharmacological targets. These two proteins interact with heparan sulfate glycosaminoglycans which modulate their activities. This work intends to analyze the effects of the interaction between these two proteins and heparin, used as heparan sulfate model. It was used molecular modeling techniques which provided new information about the proteins' dynamics. Data obtained in this work will be useful in further development of more efficient inhibitors for cathepsin B. The results also revealed a new model of interaction between the endostatin and heparan sulfate sequences.

Índice de Figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1: Exemplo de superfície eletrostática gerada com o programa APBS (Baker et al, 2001) e visualizada com o programa Pymol (Delano, 1998)..... | 15 |
| Figura 2: Série de dados em duas dimensões (x,y)..... | 17 |
| Figura 3: Série de dados ajustada e com os dois autovetores representados por linhas pontilhadas..... | 19 |
| Figura 4: Série original de dados projetada no primeiro autovetor..... | 20 |
| Figura 5: Tipos celulares que super-expressam cisteíno catepsinas no câncer. Adaptado de Mohamed & Sloane, 2006..... | 26 |
| Figura 6: Representação frontal em cartoon da estrutura cristalográfica da catepsina B (Musil et al, 1991). Em azul: domínio L; em cinza: domínio R. Os resíduos da tríade catalítica (Cis 29, His 199 e Asn 219) estão representados em verde. Em amarelo a alça de oclusão contendo as histidinas 110 e 111 representadas em vermelho..... | 29 |
| Figura 7: Inibidores do tipo epóxi-succinil. (A) Estrutura química do inibidor padrão de cisteíno proteases E-64. (B) Inibidores derivados do E-64 com maior especificidade pela catepsina B. (Adaptado de Cathers et al, 2002)..... | 31 |
| Figura 8: Disposição na estrutura tridimensional da catepsina B dos resíduos diferencialmente protonados em condições ácida e alcalina..... | 36 |
| Figura 9: Representação do contato entre o triptofano (Trp) 80 e o glutamato (Glu) 171. Estes resíduos pertencem a domínios diferentes (domínio L em azul e domínio R em vermelho). Destacou-se o próton predito na carboxila de Glu 171 predito pelo servidor PROPKA para este resíduo em pH 5,5, o que permite o mesmo desempenhar o papel de doador de próton na ligação hidrogênio..... | 38 |
| Figura 10: Superfície eletrostática da catepsina B em diferentes condições. Regiões vermelhas representam áreas onde o potencial eletrostático é negativo; regiões brancas áreas representam áreas neutras; regiões azuis representam áreas positivas..... | 39 |
| Figura 11: Resultado do cálculo de ancoramento molecular mostrando as regiões preferenciais de interação da heparina com a catepsina B. Na figura estão mostradas algumas das conformações de mais baixa energia nos dois clusters (domínio L / R) de mais baixa energia. Os desvios entre cada estrutura do mesmo sítio vão até 2 Å..... | 40 |
| Figura 12: Evolução temporal da raiz do desvio médio quadrático dos átomos da cadeia principal da catepsina B nos quatro sistemas simulados..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 13: Representação tridimensional das flutuações do esqueleto protéico da catepsina B durante as simulações de 40 ns. O ponto de vista frontal foi utilizado conforme a figura 6 e as estruturas representadas correspondem às estruturas médias de cada simulação. O gradiente de cores corresponde às flutuações em nm. A seta indica a região da cisteína (Cis) 29 a qual é um dos resíduos catalíticos..... | 43 |
| Figura 14: Desvio médio por resíduo durante as simulações de 40 ns..... | 44 |
| Figura 15: Evolução temporal da distância entre os centros de massa dos domínios L e R..... | 45 |
| Figura 16: Esquema ilustrando a formação e perda do par iônico Cis 29 – His 199 em diferentes pHs. No esquema S representa o grupo tiolato da cisteína 29 e Im equivale ao grupo imidazol da histidina. Adaptado de Turk et al, 1994..... | 46 |
| Figura 17: Acompanhamento da distância entre os centros de massa da cisteína 29 (Domínio L) e a histidina 199 (Domínio R). Ambos resíduos pertencem à tríade catalítica da catepsina B..... | 46 |
| Figura 18: Representação em cartoon da catepsina B destacando a região inicial da alfa hélice principal (em vermelho) presente no domínio L (em azul) da proteína. O domínio R foi representado em cinza e a alça de oclusão e amarelo..... | 47 |
| Figura 19: Gráficos phi x psi (Diagrama de Ramachandran) temporais para os primeiros resíduos da alfa hélice principal (Ser 28 – His 45). Em preto: catB / pH 8 ; em vermelho: catB / pH 8 + heparina..... | 48 |
| Figura 20: Acompanhamento da distância entre os centros de massa do triptofano 80 (Domínio L) e o glutamato 171 (Domínio R). Ambos resíduos pertencem à interface interdomínios..... | 51 |
| Figura 21: Disposição tridimensional do arranjo de interações entre Gln 23, Ser 220 e Glu 36. Em azul: domínio L; em vermelho: domínio R. Na figura está representada a condição de pH igual a 5,5, na qual ocorre a protonação da carboxila de Glu 36 (na esfera amarela), o qual perde a capacidade de acceptor do próton doado por Ser 220. Em pH alcalino a carboxila desprotonada realiza interações iônicas e a ligação hidrogênio com a serina..... | 53 |
| Figura 22: Evolução temporal da distância entre Asp 22 e His 110. Nota-se que no sistema catB/ pH 8 há completa desestabilização da interação, que se revelou mais estável no complexo com heparina (em vermelho). Porém a maior proximidade se dá apenas em condições ácidas (azul e verde)..... | 55 |
| Figura 23: Sobreposição das estruturas durante as simulações em condições alcalinas. (A) enzima livre; (B) complexo catB – heparina..... | 56 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 24: Percentagem cumulativa do movimento da catepsina B acumulada ao longo dos PCs. Em preto: catB/pH8 ; em vermelho : catB/pH8 + heparina..... | 58 |
| Figura 25: Desvio médio por resíduo (RMSF) obtido a partir da projeção das trajetórias nos cinco primeiros componentes principais do movimento (PC 1-5)..... | 59 |
| Figura 26: Representação dos movimentos principais extraídos a partir do primeiro componente (PC1). (A) catB / pH 8 ; (B) catB / pH 8 + hep. Os sentidos e o comprimento das setas relacionam-se com os sentidos e amplitudes respectivamente. Mostraram-se apenas os movimentos da alça de oclusão e dos resíduos catalíticos (esferas brancas)..... | 60 |
| Figura 27: Representação dos movimentos referentes ao segundo componente principal (PC2). (A) catB / pH 8; (B) catB / pH 8 + hep. . Os sentidos e o comprimento das setas relacionam-se com os sentidos e amplitudes respectivamente. Mostraram-se apenas os movimentos da alça de oclusão e dos resíduos catalíticos (esferas brancas)..... | 61 |
| Figura 28. Resultados dos primeiros experimentos utilizando a endostatina, mostrando reversão do tumor (O'Reily et al, 1997) (A). É mostrado que o tratamento com a proteína é capaz de manter o tumor em volumes microscópicos (B)..... | 70 |
| Figura 29: Imagem de microscopia de escaneamento de elétrons (SEM) mostrando a microvasculatura normal (a) e tumoral (b). Adaptado de McDonald & Choyke, 1993..... | 71 |
| Figura 30: Representação em cartoon com programa VMD (Humphrey et al, 1996) do dímero de endostatina resolvido por Difração de Raios-x (código PDB: 1BNL) (Ding et al, 1998). As esferas em cinza correspondem aos íons zinco presentes na interface dimérica..... | 73 |
| Figura 31: (A): Estrutura do aminoácido arginina. (B): Superfície eletrostática de Poisson-Boltzmann da endostatina, calculada com o programa APBS e visualizada com o programa Pymol (De Lano, 1998) (azul: positivo; vermelho: negativo; branco: neutro). As argininas representadas (R) correspondem às descritas em Sasaki et al, 1999 como formadoras dos “clusters” primário e secundário..... | 80 |
| Figura 32. Isosuperfície eletrostática do dímero de endostatina. A convenção de cargas/cores segue a mesma regra da figura 31..... | 81 |
| Figura 33: Complexos entre o dímero e a heparina de menor energia obtidos após ancoramento molecular com AUTODOCK. Nota-se a preferência pela interação nas formas transversal e longitudinal..... | 82 |
| Figura 34: Complexos de mais baixa energia selecionados para simulações de DM..... | 83 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 35: Análise das flutuações dos complexos mostrando baixos desvios (RMSD) para todos os sistemas simulados..... | 84 |
| Figura 36: Energias de interação endostatina – heparina mostrando melhor acomodação das estruturas dos dímeros (diminuição das energias) durante a MD. Para o monômero notou-se uma tendência À estabilidade das energias (em preto)..... | 85 |
| Figura 37. Análise da área de interação dos resíduos do monômero com a heparina. Destacadas em azul estão as argininas (ARG) superficiais, as quais apresentam maiores áreas de interação..... | 86 |
| Figura 38: Área média de interação para o complexo dímero – heparina transversal. As argininas presentes em um dos campos eletrostáticos primários do dímero com interação significativa estão destacadas em azul..... | 87 |
| Figura 39: Área média de interação para o complexo dímero – heparina longitudinal. A convenção de cores segue a mesma das figuras 37 e 38 destacando a interação com as argininas superficiais..... | 88 |
| Figura 40: Número médio de ligações hidrogênio durante a DM. Em preto: complexo 1; em azul: complexo 2; em vermelho: complexo 3..... | 89 |
| Figura 41: Esquema representativo da molécula de heparina separando o dodecassacarídeo em unidades monoméricas coloridas e numeradas sequencialmente..... | 90 |
| Figura 42: Área de interface dimérica discriminada por tipo de aminoácido..... | 93 |
| Figura 43: Modelo proposto por Kreuger em 2002 mostrando a interação entre a endostatina e seqüências sulfatadas – acetiladas - sulfatadas (SAS) de heparan sulfato. (ES): endostatina; (R) argininas; Em vermelho – regiões sulfatadas ; Em azul regiões acetiladas..... | 98 |
| Figura 44: Novo modelo de interação mostrando a interação entre a endostatina dimérica e seqüências sulfatadas – acetiladas - sulfatadas (SAS) de heparan sulfato. (ES): endostatina; (R) argininas; (K) lisinas ; Em vermelho – regiões sulfatadas ; Em azul regiões acetiladas..... | 99 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1: Sumário do experimento com camundongos <i>knock out</i> para algumas catepsinas demonstrando a importância destas enzimas em diversos aspectos da tumorigênese..... | 26 |
| Tabela 2: Sistemas submetidos às simulações de DM..... | 41 |
| Tabela 3: Prevalência (tempo percentual de existência) das ligações hidrogênio durante a DM. Quanto ao tipo, há a discriminação entre as interações com átomos da cadeia principal (MC) e também às que envolvem as cadeias laterais (SC)..... | 50 |
| Tabela 4: Porcentagem dos movimentos totais da enzima obtidos pela análise dos primeiros componentes (PC) nos sistemas em pH alcalino..... | 57 |
| Tabela 5: Sistemas submetidos às simulações de DM..... | 83 |
| Tabela 6: Ligações hidrogênio entre a endostatina monomérica e a heparina (complexo 1). A molécula de heparina foi numerada conforme a figura 41. Os átomos participantes das ligações hidrogênio são oriundos de: cadeia lateral (SC); cadeia principal (MC); grupo sulfato (SO_3); carboxila (COO^-)..... | 90 |
| Tabela 7: Ligações hidrogênio entre a endostatina dimérica e a heparina (complexo 2). A molécula de heparina foi numerada conforme a figura 41 . Os átomos participantes das ligações hidrogênio são oriundos de: cadeia lateral (SC); cadeia principal (MC); grupo sulfato (SO_3); carboxila (COO^-). Cada cadeia (A e B) corresponde a uma unidade monomérica..... | 92 |
| Tabela 8: Ligações hidrogênio entre a endostatina dimérica e a heparina (complexo 3). A molécula de heparina foi numerada conforme a figura 41. Os átomos participantes das ligações hidrogênio são oriundos de: cadeia lateral (SC); cadeia principal (MC); grupo sulfato (SO_3); carboxila (COO^-). Cada cadeia (A e B) corresponde a uma unidade monomérica..... | 94 |

Índice de Equações

| | |
|--|-----------|
| Eq.1: Função Energia potencial total..... | 9 |
| Eq. 2: Cálculo das forças para cada átomo i | 11 |
| Eq. 3: Cálculo da aceleração para cada átomo i a partir das forças | 11 |
| Eq. 4: Cálculo das posições para cada átomo i a partir das acelerações | 11 |
| Eq. 5: Cálculo das forças para cada átomo i a partir das velocidades..... | 11 |
| Eq. 6: Cálculo das velocidades e posições..... | 12 |
| Eq.7: Cálculo de pK_a em proteínas. Na equação pK_{model} é o pK_a dos resíduos em solução. ΔpK_a corresponde à soma dos componentes referentes aos efeitos de solvatação (ΔpK_{des}), ligações hidrogênio (ΔpK_{HB}) e efeitos eletrostáticos (ΔpK_{elec}). | 14 |
| Eq.8: Cálculo do desvio médio (RMSD) para uma coordenada x qualquer..... | 16 |
| Eq.9: Cálculo da covariância entre x e y | 18 |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Introdução Geral..... | 4 |
| 1 – O desenvolvimento tumoral e a angiogênese | 4 |
| 2 – Relação entre a angiogênese e os glicosaminoglicanos | 5 |
| 3 – Antiangiogênese | 5 |
| Objetivo | 7 |
| Métodos..... | 9 |
| 1 – Campo de Forças | 9 |
| 2 – Otimização de Geometrias Moleculares | 10 |
| 3 – Dinâmica Molecular | 11 |
| 4 – Ancoramento (<i>Docking</i>) Molecular..... | 12 |
| 5 – Cálculo de pK _a em proteínas | 13 |
| 6 – Análise de superfície eletrostática | 14 |
| 7 – Ligações hidrogênio | 15 |
| 8 – Análise do desvio médio – RMSD..... | 15 |
| 9 – Análise de dinâmica essencial..... | 16 |
| Capítulo 1: Estudo teórico do mecanismo de estabilização da catepsina B mediada por heparina em diferentes pH | 21 |
| 1– Enzimas proteolíticas | 22 |
| 2 – Proteólise e desenvolvimento tumoral e metastático | 22 |
| 3 – Importância das cisteíno catepsinas em processos tumorais | 24 |
| 4 – Características da catepsina B | 27 |
| 5 – Interações com glicosaminoglicanos | 28 |
| 6 – Detalhes estruturais..... | 28 |
| 7 – Inibidores da catepsina B | 30 |
| 8- Objetivos Específicos..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 9 – Procedimentos..... | 34 |
| 9.1 – Parâmetros para realização de ancoramento molecular | 34 |
| 9.2 – Parâmetros utilizados na DM..... | 34 |
| 9.3 – Análise de Componentes Principais | 35 |
| 10 – Resultados e Discussão | 36 |
| 10.1 – Determinação dos estados de protonação em diferentes pH..... | 36 |
| 10.2 – Análise da superfície eletrostática da catepsina B em diferentes estados de protonação | 38 |
| 10.3 – Obtenção dos complexos por ancoramento molecular..... | 40 |
| 10.4 – Sistemas simulados..... | 41 |
| 10.5 – Medidas de controle das simulações..... | 41 |
| 10.6 – Análises das flutuações dos sistemas durante a DM..... | 42 |
| 10.7 – Análises da estabilidade da interface inter-domínios | 45 |
| 10.8 – Análise do comportamento do sítio ativo | 46 |
| 10.9 – Acompanhamento da estrutura secundária na região catalítica | 47 |
| 10.10 – Outros contatos da interface..... | 49 |
| 10.11 – Dinâmica da alça de oclusão..... | 54 |
| 10.12 – Amplitude dos movimentos da alça de oclusão | 56 |
| 10.13 – Dinâmica essencial da catepsina B..... | 57 |
| 11 – Conclusões parciais | 63 |

Capítulo 2: Interação entre diferentes formas da endostatina e heparina: um novo modelo de interação.

..... **69**

| | |
|---|----|
| 1 – A antiangiogênese e a endostatina | 70 |
| 2 – Detalhes estruturais..... | 72 |
| 3 – Interação com glicosaminoglicanos | 74 |
| 4 - Objetivos Específicos..... | 76 |
| 5 – Procedimentos..... | 77 |

| | |
|--|------------|
| 5.1 – Parâmetros para realização de ancoramento molecular | 77 |
| 5.2 – Parâmetros utilizados na DM..... | 77 |
| 5.3 – Análise da área de interação endostatina-heparina | 78 |
| 6 – Resultados | 80 |
| 6.1 – Superfície eletrostática da endostatina | 80 |
| 6.2 – Obtenção dos complexos endostatina – heparina | 81 |
| 6.3 – Sistemas simulados | 83 |
| 6.4 – Análises das flutuações dos complexos | 84 |
| 6.5 – Análise das energias de interação endostatina – heparina..... | 85 |
| 6.6 – Análise da área de interação endostatina – heparina | 86 |
| 6.7 - Análise de ligações hidrogênio durante a dinâmica molecular..... | 88 |
| Perspectivas | 101 |
| Referências Bibliográficas | 102 |

Introdução Geral

1 – O desenvolvimento tumoral e a angiogênese

A busca de terapias para combate ao câncer esbarra em diversas dificuldades, sendo o desenvolvimento de metástases uma questão que até hoje não é completamente compreendida. Metástases podem ser definidas como o espalhamento e posterior estabelecimento de células malignas em novas localizações, distantes do tumor. É dado conhecido que a maioria dos pacientes acometidos por tumores sólidos falece devido à formação de metástases em sítios distantes do tumor primário e não pela massa tumoral primária (Gocheva & Joyce, 2007). O entendimento do processo metastático é, portanto, uma tarefa desafiadora no que concerne aos tratamentos anti-tumores nos dias atuais.

Como já mencionado, a metástase é um processo complexo envolvendo uma série de passos e mecanismos. Uma etapa crucial no desenvolvimento de metástases é o aumento da invasividade das células tumorais. A ocorrência deste evento é possível graças à estimulação de atividade proteolítica na proximidade do tumor, o que ocasiona mudanças na adesão celular, nas interações com o estroma e um rearranjo de componentes da matriz extracelular. Este processo também é importante para que se estabeleça um processo angiogênico local (DeClerk *et al*, 2004; Gocheva & Joyce, 2007).

A angiogênese, formação de novos vasos a partir de brotamento de vasos preexistentes é um processo fisiológico que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, ciclo menstrual, regeneração de tecidos e também se mostra importante no câncer. Com respeito aos processos cancerígenos, a angiogênese é fundamental para que um tumor consiga se nutrir e se difundir, pois a partir de um determinado tamanho da massa tumoral a difusão de nutrientes passa a ser insuficiente com a vascularização normal (Folkman, 1989).

O processo angiogênico ocorre em estágios bem definidos, envolvendo diversos tipos celulares e moleculares. Primariamente há a ocorrência de um aumento da vasopermeabilidade. A seguir, há a estimulação à produção de

enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular. Dessa forma, há a abertura de espaços nos tecidos adjacentes para que as células possam progredir. Seguindo o processo, há a ocorrência da diferenciação das células e posterior estabilização e maturação dos novos vasos.

2 – Relação entre a angiogênese e os glicosaminoglicanos

É conhecido que a angiogênese é controlada pelo equilíbrio entre fatores capazes de estimular e outros capazes de inibir o crescimento de vasos (Hanahan & Folkman, 1996). Os tumores conseguem interferir no controle do processo secretando fatores estimulatórios e induzindo as células próximas a também fazerem o mesmo (Kandel *et al*, 1991). Uma das formas de promover tal indução é a partir da estimulação da proteólise, responsável pela clivagem e ativação de certos fatores. Entre estes fatores, destacam-se o bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básico) e o VEGF₁₆₅, (fator de crescimento de endotélio vascular) que já foram mostrados em modelos *in vitro* e *in vivo* como agentes promotores de angiogênese.

Diversos estudos apontam que a interação dos fatores angiogênicos com glicosaminoglicanos (GAGs), uma classe especial de polissacarídeos sulfatados, é de fundamental importância para os mesmos promoverem seus efeitos (Lindahl, 2007). Um claro exemplo é o papel de co-receptor exercido pelo heparan sulfato, um GAG encontrado na superfície celular, necessário para que ocorra a interação entre o FGF e seu receptor (Pellegrini *et al*, 2000).

Ademais, os GAGs interagem com uma vasta gama de moléculas que incluem as enzimas proteolíticas da matriz extracelular e outros fatores chamados inibidores de angiogênese (Conrad, 1998; Capila & Linhardt, 2002). Dessa forma, configura-se uma complexa rede de interações moleculares, onde os polissacarídeos desempenham funções regulatórias que vão além do papel estrutural inicialmente proposto aos mesmos.

3 – Antiangiogênese

O controle da angiogênese – a antiangiogênese – surgiu como uma alternativa aos tratamentos convencionais ao câncer, os quais até hoje não apresentaram a eficácia desejada. Além da cirurgia, a quimioterapia e a

radioterapia são os procedimentos mais empregados no combate à doença. Os altos índices de resistência observados a estes tratamentos, e as altas taxas de efeitos colaterais foram os fatores que impulsionaram o surgimento da antiangiogênese.

Entre as estratégias mais utilizadas encontram-se a busca de inibidores que impeçam a formação de novos vasos, além da tentativa de controle do processo a partir da inibição de enzimas proteolíticas, necessárias para a iniciação da angiogênese. Contudo, até os dias atuais os promissores resultados obtidos em modelos murinos (O'Reily et al, 1997; Bohem et al, 1997) não foram obtidos nos testes com humanos (Herbst et al, 2000; Eder et al, 2002; Kullke et al, 2006).

Esta dissertação é dividida em capítulos que abordam como tema o estudo estrutural de proteínas que participam do processo de desenvolvimento tumoral e metastático: a endostatina e a catepsina B. Na época de sua descoberta em 1997, a proteína antiangiogênica endostatina foi apresentada como a provável cura do câncer devido aos resultados obtidos em roedores. Já a catepsina B é uma enzima proteolítica lisossomal a respeito da qual vem sendo proposto um papel importante tanto na angiogênese quanto em outras etapas da tumorigênese.

Estas duas proteínas compartilham a característica de apresentarem suas atividades moduladas pela interação com glicosaminoglicanos de heparan sulfato (Sasaki et al, 1999; Almeida et al, 2001; Kreuger et al, 2002; Caglic et al, 2007). Logo, nesta dissertação serão apresentados dois trabalhos onde se analisou os efeitos da interação entre as proteínas e o glicosaminoglicano heparina – usado como modelo de heparan sulfato. Para melhor organização, uma introdução detalhada de cada um dos dois sistemas é dada em cada um dos respectivos capítulos.

Metodologicamente, foi desenvolvida e aplicada uma técnica de obtenção de parâmetros para carboidratos, devido à falta dos mesmos na literatura e em banco de dados de programas de simulação molecular. Esta etapa gerou um trabalho paralelo a ser submetido.

Objetivo

A complexidade do câncer e principalmente dos processos metastáticos é bem conhecida, sendo a dificuldade em se desenvolver um tratamento eficaz atribuída aos diversos mecanismos regulatórios envolvidos na doença. A literatura atual aponta que os glicosaminoglicanos do tipo heparan sulfato desempenham papel importante na regulação do desenvolvimento tumoral e metastático, posto que os mesmos interagem com enzimas e fatores de crescimento envolvidos no processo.

Esta dissertação possui como tema central o estudo de duas proteínas envolvidas na regulação da doença, a cathepsina B e a endostatina, e sua interação com glicosaminoglicanos, empregando a heparina como modelo dessa interação, já que não há estrutura tridimensional resolvida da molécula de heparan sulfato. Devido a alta relação estrutural entre estes GAGs, a heparina é frequentemente utilizada experimentalmente como modelo de heparan sulfato.

A cathepsina B, uma cisteína protease lisossomal proposta como fundamental no desenvolvimento tumoral, participa da proteólise de componentes da matriz extracelular e de proteínas de adesão celular contribuindo para mudanças nas interações entre célula-célula e célula – matriz extracelular, que levam à alteração de diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, motilidade e sobrevivência.

A terapia antiangiogênica com endostatina, um agente antiangiogênico endógeno, apresentou resultados promissores em camundongos os quais não se reproduziram nos testes clínicos em humanos. Este fracasso pode ser atribuído à falta de conhecimento do mecanismo de ação da proteína e também dos mecanismos de interação da mesma com seus ligantes fisiológicos, entre os quais se incluem os GAGs do tipo heparan sulfato.

Os objetivos específicos desta dissertação são a descoberta de novas informações a respeito dos sítios de interação entre essas proteínas e o GAG além da análise dinâmica da interação entre as moléculas. Tais dados servirão como complemento a informações estruturais e bioquímicas, possibilitando

novas interpretações dos mecanismos moleculares envolvidos e também o melhor entendimento de hipóteses já sugeridas na literatura.

Métodos

1 – Campo de Forças

A representação de um sistema molecular complexo para simulações computacionais deve envolver um equilíbrio entre acurácia e rapidez de cálculo. Dessa forma, utilizam-se funções que simplificam a representação do sistema, permitindo que se efetuem tempos de simulação suficientemente longos para análises estruturais e dinâmicas com o máximo de amostragem temporal.

Para se representar um sistema constituído de milhares de átomos, emprega-se funções potenciais empíricas calibradas por dados experimentais e cálculos quânticos sobre pequenas moléculas, devido à impossibilidade computacional da representação quântica de todo o sistema. Estas funções potenciais constituem-se em termos físicos simples que descrevem a interação entre dois, três e quatro átomos, somando-se esses termos para todo o sistema molecular, que inclui macromoléculas, água e íons. A sobreposição destes termos constitui o Campo de Forças.

A função energia potencial total para um sistema molecular é, portanto, a soma de termos que representam as interações entre átomos ligados e não ligados. Um sistema molecular constituído de N átomos com vetores posição r_i ($i= 1,2, \dots, N_{\text{átomos}}$) pode assumir a forma:

$$V(\{r_i\}) = V(r_1, r_2, \dots, r_{N_{\text{at}}}) = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{2} K_{bn} (b_n - b_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N\theta} \frac{1}{2} K_{\theta n} (\theta - \theta_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N\xi} \frac{1}{2} K_{\xi n} (\xi_n - \xi_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N\varphi} K_{\varphi n} [1 + \cos(n\varphi_n - \delta_n)] + \sum_{i < j}^{N_{\text{at}}} \left\{ \frac{C_{12}(ij)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i,j)}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \right\}$$

Eq.1: Função Energia potencial total

Na equação acima, os três primeiros termos à direita da igualdade são potenciais harmônicos. As ligações e ângulos, incluindo o chamado de diedral impróprio no terceiro termo, oscilam próximos ao seu valor de equilíbrio, sendo descritos pelo potencial de Hooke. O quarto termo, chamado diedral próprio, representa as torções em ligações com liberdade de rotação, sendo descrito

pela lei dos cossenos. O último termo representa os potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb para os átomos não ligados, sendo que a primeira parte (C_{12}/r^{12}) descreve a impenetrabilidade das nuvens eletrônicas, a segunda (C_6/r^6) as interações de curto alcance do tipo dipolo induzido - dipolo induzido ou dispersão, enquanto a última parte representa as interações entre as cargas atômicas parciais do sistema (uma descrição mais detalhada desses potenciais, bem como da técnica Dinâmica Molecular, pode ser encontrada em Pascutti, 2002). Os parâmetros K_b , b_0 , K_θ , θ_0 , K_ξ , ξ_0 , n , δ , as constantes $C_{12(i,j)}$ e $C_{6(i,j)}$ e as cargas atômicas parciais q_i e q_j para proteínas, ácidos nucleicos e alguns açúcares são descritas na literatura (Brooks *et al*, 1983, Weiner *et al*, 1984 e 1986 e Clark *et al*, 1989).

O campo de forças utilizado para os cálculos de Dinâmica Molecular foi o GROMOS 96 (Van Gunsteren e Berendsen, 1997), o qual é largamente aplicado para simulações com proteínas e está inserido no programa GROMACS (van der Spoel *et al*, 2004).

2 – Otimização de Geometrias Moleculares

A Otimização de Geometria ou Minimização de Energia é uma etapa preliminar ao emprego da Dinâmica Molecular de suma importância, já que é fundamental que se eliminem eventuais deformações presentes no sistema. Durante a dinâmica são constantes as conversões de energia entre potencial e cinética, portanto um sistema com muitas tensões locais (sobreposição de esferas de Van der Waals, como exemplo) apresentará energia cinética muito alta no início da simulação. Logo, temperaturas altas e irreais são registradas nos primeiros passos, levando a movimentos moleculares que na realidade são artefatos de simulação, podendo conduzir a mudanças conformacionais indesejáveis. A otimização das distâncias atômicas e dos ângulos entre ligações químicas minimiza tensões locais e evita regiões de altas temperaturas.

Utilizaram-se métodos gradientes para minimização de energia antes de realizar as dinâmicas. Estes métodos são poderosos para que se atinjam mínimos locais de energia, mas não tão eficientes quando se visa alcançar os mínimos globais partindo de conformações de alta energia. Contudo, neste

trabalho partiu-se de estruturas determinadas experimentalmente, que já estão próximas ao mínimo global de energia.

3 – Dinâmica Molecular

Nas simulações de Dinâmica Molecular (DM) são resolvidas as equações clássicas de movimento para se estudar o comportamento de um sistema molecular durante um intervalo de tempo.

Na Dinâmica Molecular calcula-se a força \mathbf{F}_i que atua sobre cada átomo i ($i= 1,2,3,\dots$ até N , o número de átomos do sistema), a partir da derivada da função energia potencial total $V(\{r_i\})$, representada na equação-1, em relação a sua posição \mathbf{r}_i .

$$\mathbf{F}_i = - \partial V(\{r_i\})/\partial \mathbf{r}_i$$

Eq. 2: Cálculo das forças para cada átomo i .

A aceleração de cada átomo é obtida dividindo-se a força \mathbf{F}_i pela massa atômica m_i .

$$\mathbf{a}_i = \mathbf{F}_i/m_i$$

Eq. 3: Cálculo da aceleração para cada átomo i a partir das forças.

Para determinar as posições em incrementos de tempo δt , ou seja, a trajetória das partículas no tempo substitui-se a aceleração no algoritmo de Verlet (1967) ou um similar:

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t) + \mathbf{a}_i(t) \delta t^2$$

Eq. 4: Cálculo das posições para cada átomo i a partir das acelerações.

Para se determinar as velocidades, necessárias para o cálculo da energia cinética, utiliza-se o algoritmo de Verlet para propagação das velocidades.

$$\mathbf{v}_i(t) = [\mathbf{r}_i(t + \delta t) - \mathbf{r}_i(t - \delta t)]/2\delta t$$

Eq. 5: Cálculo das forças para cada átomo i a partir das velocidades

A energia cinética somada à potencial determina a energia total do sistema, a temperatura é definida em termos da energia cinética média. Geralmente utiliza-se nas simulações um algoritmo derivado do algoritmo de Verlet, chamado de “leapfrog” ou “summed Verlet onde:

$$\mathbf{v}_i(t + \delta t/2) = \mathbf{v}_i(t - \delta t/2) + \mathbf{a}_i(t)\delta t$$

$$\mathbf{r}_i(t + \delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t + \delta t/2) \delta t$$

Eq. 6: Cálculo das velocidades e posições

No cálculo das trajetórias pela Dinâmica Molecular, neste procedimento, toma-se a função de energia potencial total do sistema (equação-1) e deriva-se esta função para se obter a força sobre cada átomo. A seguir, utilizam-se as equações da mecânica clássica ($\mathbf{F}_i = m_i\mathbf{a}_i$) para se obter as acelerações, as acelerações são inseridas na primeira equação acima para predição das velocidades, as quais por sua vez são inseridas na equação seguinte para predição das posições e em seguida há a repetição de todo o processo (Pascutti, 2002).

4 – Ancoramento (*Docking*) Molecular

A busca pelo melhor entendimento de interações moleculares, utilizando-se a técnica computacional de ancoramento molecular, aparece como uma área de destaque na biologia estrutural. A técnica vem sendo largamente usada desde os anos 80, principalmente em projetos visando o desenho de fármacos.

Houve considerável evolução da técnica ao longo dos anos principalmente na representação da flexibilidade do sistema. Nos primeiros experimentos de ancoramento molecular utilizavam-se modelos rígidos, que não ofereciam grande acurácia para se compreender as interações moleculares. Hoje, prevalecem modelos que conferem flexibilidade apenas ao ligante e já há métodos onde é também oferecida flexibilidade a certas regiões do receptor.

Para avaliar as interações, utilizam-se algoritmos de busca que visam encontrar soluções de menor energia no menor intervalo de tempo possível.

Atualmente, entre os algoritmos disponíveis mais utilizados estão o *simulated annealing*, os algoritmos genéticos e a construção em incrementos (incremental construction). A escolha do algoritmo a se utilizar deve ser cuidadosa, se possível baseada em dados na literatura e também no conhecimento profundo do sistema a ser estudado.

Além de obter as soluções, os programas necessitam de um critério para classificá-las, e nesse caso o que se utiliza é a energia obtida para cada conformação. Para quantificar esta energia classificam-se as estruturas com as chamadas “funções de custo” (ou funções de *score*).

No programa Autodock 3.0 (Morris *et al*, 1998), utilizado nos cálculos para esta dissertação, a função de custo é baseada em alguns termos para descrever as interações entre as moléculas a serem encaixadas. Entre estes termos estão presentes potenciais como o de Coulomb (interação eletrostática), potencial torsional e potencial de Lennard-Jones (impenetrabilidade de nuvens eletrônicas e dispersão) descritos no item anterior. Além destes há também um potencial para representar as contribuições energéticas das ligações hidrogênio e dos efeitos de solvatação.

5 – Cálculo de pK_a em proteínas

O valor de pK_a de um resíduo titulável pode ser definido como o valor de pH em que o mesmo está 50 % protonado. A importância deste tipo de cálculo reside no conhecimento de que os valores de pK_a de certos resíduos podem se alterar consideravelmente em proteínas devido aos efeitos de vizinhança. Tais efeitos são decorrentes de interações com o microambiente próximo ao resíduo, as quais interferem na ionização dos grupos carregados. Além disso, é dado conhecido que grupos ionizáveis com valores pK_a não frequentemente observáveis muitas vezes se localizam em sítios ativos de proteínas (Li *et al*, 2005). Logo esta análise pode em certos casos facilitar a identificação de regiões funcionais em enzimas e também auxiliar na compreensão de mecanismos moleculares dependente do pH.

Para a realização do cálculo dos estados de protonação da catepsina B, em diferentes pHs, utilizou-se o servidor PROPKA (Li *et al*, 2005) que utiliza

parâmetros empíricos para calcular o pK_a de resíduos em diferentes micro-ambientes. Os parâmetros levados em conta na análise são: ligações de hidrogênio, interações por carga e efeitos de desolvatação de resíduos tituláveis. A equação sete mostra o princípio básico de obtenção do pK_a pelo servidor PROPKA.

$$pK_a = pK_{\text{model}} + \Delta pK_a$$

$$\text{sendo: } \Delta pK_a = \Delta pK_{\text{des}} + \Delta pK_{\text{HB}} + \Delta pK_{\text{elec}}$$

Eq.7: Cálculo de pK_a em proteínas. Na equação pK_{model} é o pK_a dos resíduos em solução. ΔpK_a corresponde à soma dos componentes referentes aos efeitos de solvatação (ΔpK_{des}), ligações de hidrogênio (ΔpK_{HB}) e efeitos eletrostáticos (ΔpK_{elec}).

Ressalta-se que o servidor PROPKA foi recentemente comparado a outros métodos de predição de pK_a de resíduos em proteínas. Na ocasião os autores apontaram que os resultados obtidos com o programa foram satisfatórios, e foi destacada também a velocidade do cálculo devido ao baixo custo computacional para a execução do mesmo (Davies et al, 2006).

6 – Análise de superfície eletrostática

A superfície molecular acessível ao solvente é gerada ao se girar uma esfera de prova com o raio aproximado ao raio de uma molécula de água (1,4 Å) sobre as esferas de van der Waals de cada átomo da proteína. O programa APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) (Baker *et al*, 2001) calcula o potencial eletrostático resolvendo a equação de Poisson-Boltzmann para uma distribuição precisa de cargas na superfície.

A superfície eletrostática de uma proteína ao mesmo tempo em que analisa a área acessível, descreve a distribuição do potencial eletrostático na superfície da mesma. Esta análise é utilizada para se compreender melhor a interação entre moléculas, por comparar a superfície acessível de um sítio de ligação em uma proteína à superfície de ligantes, verificando a complementariedade eletrostática entre ambas as superfícies. As imagens dessas superfícies são visualizadas com o programa Pymol, atribuindo-se tonalidades de azul ao vermelho, para descrever o potencial eletrostático

positivo e negativo, passando pelo branco, que indica as regiões hidrofóbicas (figura 1)(Delano, 1998).

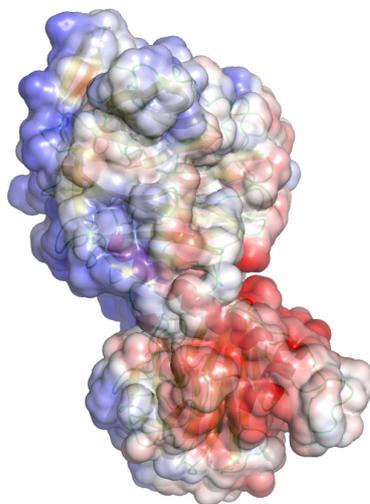


Figura 1: Exemplo de superfície eletrostática gerada com o programa APBS (Baker et al, 2001) e visualizada com o programa Pymol (Delano, 1998).

7 – Ligações hidrogênio

A ligação hidrogênio é cerca de 10% covalente e 90% eletrostática e desempenha um papel importante na estabilização de estruturas de macromoléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos e açúcares. Em proteínas especificamente este tipo de interação é fundamental na manutenção das estruturas em conformações de menor energia como alfa-hélices e folhas beta.

A análise e quantificação de ligações hidrogênio fornecem dados importantes sobre a especificidade da interação entre moléculas vizinhas. Este tipo de ligação ocorre quando há aproximação entre dois átomos eletronegativos, sendo um ligado covalentemente a um hidrogênio, chamado “doador” e outro não ligado a este mesmo hidrogênio, denominado “aceitador”.

8 – Análise do desvio médio – RMSD

O desvio padrão ou Raiz do Desvio Quadrático Médio - RMSD (*root mean square deviation*) é uma ferramenta para se estudar o desvio global de uma determinada estrutura no tempo, em relação a uma estrutura de referência.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x^{\text{ref}})^2}$$

Eq.8: Cálculo do desvio médio (RMSD) para uma coordenada x qualquer.

Na equação acima: n é o número total de amostras, X_i é a coordenada tridimensional de cada átomo da amostra i e X^{ref} é a coordenada de referência. O resultado destes cálculos mostra o quanto as estruturas variaram durante a simulação.

9 – Análise de dinâmica essencial

Na análise de qualquer evento é necessário que se leve em consideração o tempo de ocorrência do mesmo. O passo da dinâmica molecular se dá em fento-segundos, visando à reprodução das vibrações das ligações químicas. Logo, para que se atinjam longos tempos de simulação (centenas de nano-segundos a micro segundos) necessita-se de um grande poderio computacional. A indisponibilidade de tal capacidade levou ao desenvolvimento de ferramentas de análise visando à predição de eventos que ocorrem em escalas de tempo muito maiores do que os tempos convencionais de simulação.

É de fundamental importância também a relação entre amplitude do movimento (evento) observado e sua frequência. Movimentos de baixa amplitude como, por exemplo, a movimentação de cadeias laterais, ocorre com maior frequência que movimentos de grande amplitude exemplificados por grandes mudanças conformacionais ou os que envolvem estruturas complexas como domínios inteiros das proteínas.

A dinâmica essencial é uma técnica que se usa da Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*), uma ferramenta estatística usada em diversos campos de estudo. No âmbito da modelagem molecular, usa-se o PCA para avaliar os movimentos de mais baixa frequência geralmente imperceptíveis a partir da simples análise das trajetórias das dinâmicas. Como estes movimentos de grande amplitude geralmente estão relacionados a alguma função biológica convencionou-se

chamá-los de essenciais (Amadei *et al*, 1993). A aplicação desta ferramenta é relatada em diversos trabalhos (Van Aalten *et al*, 1995; Van Aalten *et al*, 1997; Amadei *et al*, 1999).

A seguir será descrito como o método pode ser aplicado em uma série de dados qualquer:

Inicialmente tem-se uma série de dados em duas dimensões (x,y) que deve ser ajustada a partir da subtração de cada valor pela média (figura 2).

| x | y | | x | y |
|-----|-----|--------------------------|-------|-------|
| 2.5 | 2.4 | Ajuste dos dados → | .69 | .49 |
| 0.5 | 0.7 | | -1.31 | -1.21 |
| 2.2 | 2.9 | | .39 | .99 |
| 1.9 | 2.2 | | .09 | .29 |
| 3.1 | 3.0 | | 1.29 | 1.09 |
| 2.3 | 2.7 | | .49 | .79 |
| 2 | 1.6 | | .19 | -.31 |
| 1 | 1.1 | | -.81 | -.81 |
| 1.5 | 1.6 | | -.31 | -.31 |
| 1.1 | 0.9 | | -.71 | -1.01 |

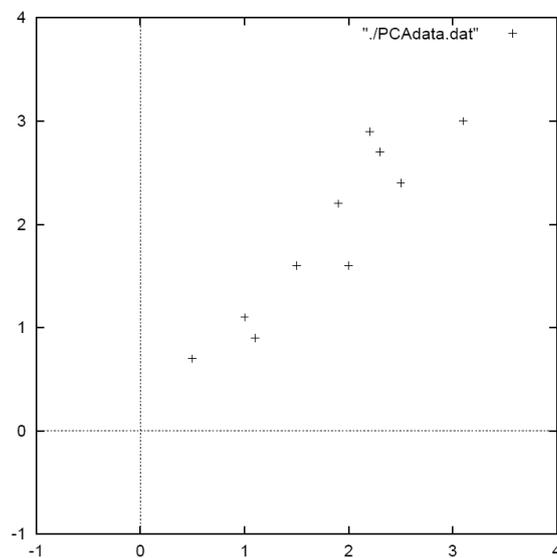


Figura 2: Série de dados em duas dimensões (x,y).

Em seguida é calculada a matriz de covariância que tem a seguinte forma:

$$\begin{pmatrix} \text{cov}(x, x) & \text{cov}(x, y) \\ \text{cov}(y, x) & \text{cov}(y, y) \end{pmatrix}$$

Sendo a covariância entre duas dimensões representada pela fórmula:

$$\text{cov}(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x - \langle x \rangle)(y - \langle y \rangle)}{(n - 1)}$$

Eq.9: Cálculo da covariância entre x e y.

Pode-se notar que na diagonal principal da matriz de covariância tem-se a covariância de cada série com respeito a si mesma (variância). Os outros pontos configuram uma matriz simétrica. Além disso, estas matrizes apresentam propriedades especiais entre as quais a existência de autovetores e autovalores associados. Para a série de dados tomada como exemplo tem-se a seguinte matriz de covariância:

$$\text{cov} = \begin{pmatrix} .616555556 & .615444444 \\ .615444444 & .716555556 \end{pmatrix}$$

A partir do uso de ferramentas de álgebra linear que não serão descritas nesta dissertação se podem obter os autovetores e autovalores associados a esta matriz de covariância.

$$\text{eigenvalues} = \begin{pmatrix} .0490833989 \\ 1.28402771 \end{pmatrix}$$

$$\text{eigenvectors} = \begin{pmatrix} -.735178656 & -.677873399 \\ .677873399 & -.735178656 \end{pmatrix}$$

A projeção destes autovetores no plano cartesiano revela claramente uma propriedade dos mesmos: a ortogonalidade.

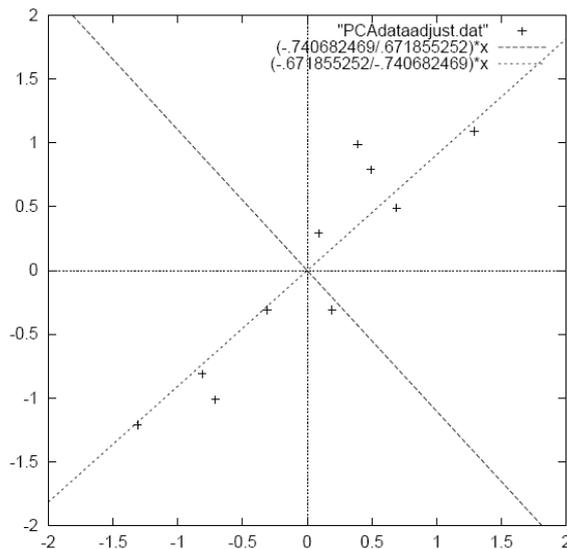


Figura 3: Série de dados ajustada e com os dois autovetores representados por linhas pontilhadas

É de fácil observação que o primeiro autovetor (o de maior autovalor) corresponde à direção no espaço cartesiano correspondente à maior covariância entre x e y. Já o segundo autovetor corresponde à 2ª direção de maior covariância da série de dados. O processo de redução dimensional se dá pela projeção da série de dados em apenas 1 dos vetores, obtendo-se assim a direção de maior covariância referente à tal série de dados. Para uma série bidimensional conforme mostrado no exemplo, a análise não é de grande utilidade, já que o espalhamento dos dados no espaço cartesiano era facilmente observável. Entretanto, para uma série complexa constituída de várias dimensões, o PCA mostra-se uma ferramenta extremamente útil na análise de padrões não facilmente observáveis.

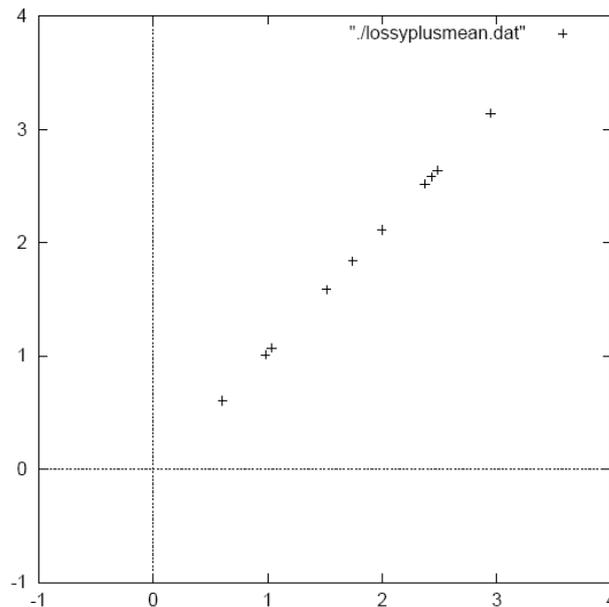


Figura 4: Série original de dados projetada no primeiro autovetor.

O princípio básico da aplicação do PCA como ferramenta de análise da dinâmica molecular é a filtragem estatística dos componentes principais a partir das covariâncias das posições atômicas, sendo as flutuações oriundas de uma simulação de DM. Em seguida, decompõem-se estas flutuações em componentes de movimento que correspondem a movimentos de variadas amplitudes. Após a separação dos movimentos, os mesmos são ordenados de acordo com as suas contribuições para a flutuação do sistema. Para tal classificação utilizam-se ferramentas de álgebra linear, revelando componentes de movimentos com direções precisas para cada átomo considerado na análise (geralmente carbonos alfa ou esqueleto protéico).

Para a análise são escolhidos apenas os componentes de maior amplitude, os quais representam a maior percentagem do movimento total da estrutura analisada. Os componente escolhidos constituem o que foi chamado de sub-espaco essencial e a análise destes componentes revela-se a movimentação de grande amplitude da proteína de interesse.

**Capítulo 1: Estudo teórico do mecanismo de
estabilização da catepsina B mediada por heparina em
diferentes pH**

1– Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas ou proteases têm como função catalisar a hidrólise das ligações peptídicas de peptídeos e proteínas (Whitaker, 1993). Estas enzimas são envolvidas em diversos processos fisiológicos como digestão celular, agregação plaquetária, processamento de proteínas e são envolvidas em diversas vias de sinalização. Deve-se ressaltar também a participação destas enzimas em diversos processos fisiopatológicos como processamento de proteínas virais, invasão de parasitas, doença de Alzheimer, distrofia muscular e outros.

Além disso, estas enzimas têm comprovada importância biotecnológica, sendo amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica, de alimentos e de detergentes. A vantagem da aplicação de proteases é pelo fato de não poluírem o ambiente em contrapartida dos produtos anteriormente empregados.

Um dado já bem estabelecido na comunidade científica é a participação destas enzimas em processos tumorais. Contudo, o entendimento dos processos desempenhados pelas proteases ainda não é suficiente para que se desenvolvam fármacos eficazes no controle da doença. Logo, é justificável o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a compreensão destas enzimas a fim de que se desenvolvam novas estratégias no controle do câncer.

2 – Proteólise e desenvolvimento tumoral e metastático

Como já mencionado, as células tumorais estimulam intensa proteólise de componentes da matriz e de proteínas de adesão celular. Como resultados da ação proteolítica observam-se mudanças nas interações entre célula-célula e célula – matriz extracelular, que levam à alteração diversos processos fisiológicos que ocorrem a nível celular como proliferação, diferenciação, motilidade e sobrevivência (DeClerk *et al*, 2004).

Os primeiros experimentos relacionando a proteólise ao desenvolvimento tumoral e metastático focavam-se nas etapas tardias do processo: invasão celular e estabelecimento das metástases. Entretanto, já se sabe do envolvimento direto das enzimas proteolíticas nas fases iniciais de

crescimento do tumor tanto no sítio primário quanto nas metástases (Koblinski et al, 2001).

Um exemplo claro da influência da proteólise no comportamento celular é a mudança nos padrões de adesão celular. Experimentos já demonstraram que a degradação de proteínas de adesão como a E-caderina, por exemplo, constitui um evento necessário para que as células tumorais adquiram o fenótipo migratório (DeClerk *et al*, 2004; Gocheva & Joyce, 2007).

A partir do conhecimento da importância dos eventos proteolíticos no desenvolvimento de metástases, a busca do entendimento da ação das proteases envolvidas neste processos se tornou um dos principais focos de pesquisa no combate a tumores. A tentativa do desenvolvimento de inibidores para estas enzimas, alguns inclusive em uso com certa eficácia, é uma árdua tarefa que ainda não atingiu o efeito definitivo, o qual seria o controle das metástases e do crescimento tumoral.

Entre as proteases responsáveis pela degradação e remodelação da matriz extracelular podem-se destacar as metaloproteinases (MMPs), as serino proteases e as cisteíno proteases (Egeblad & Werb, 2002; Laufs *et al*, 2006) . Todas estas enzimas apresentam papel fisiológico importante na constante remodelação da matriz extracelular, sendo seu nível de expressão alterado em processos tumorais.

A maior concentração dessas enzimas na região tumoral relaciona-se diretamente com mudanças nas interações dos tumores com o ambiente que o cerca, tanto aumentando a expressão de proteases quanto induzindo as células vizinhas a fazerem o mesmo. Entre as células na vizinhança dos tumores e que sofrem indução no aumento de enzimas proteolíticas estão fibroblastos, células endoteliais, células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos além de células da matriz óssea como osteoblastos e osteoclastos (Mohamed & Sloane, 2006).

Inicialmente pensava-se que os tumores induziam a expressão destas enzimas apenas para a penetração das células tumorais no tecido conjuntivo e nos vasos sanguíneos. Nos dias atuais, sabe-se que as proteases degradam

não apenas proteínas estruturais como colágenos, por exemplo, mas sim diversos alvos como fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas presentes na matriz, as quais facilitam o crescimento e invasão dos tumores (Egeblad & Werb, 2002; Gocheva & Joyce, 2007; DeClerk *et al*, 2004; Mohamed & Sloane, 2006).

O estudo das enzimas proteolíticas, especialmente as MMPs, aparece nos dias atuais como uma promissora estratégia no tratamento e prevenção de tumores. Entretanto, há menos conhecimento sobre mecanismos de ação de outra classe de proteases de grande importância nos processos tumorais – as cisteíno proteases. Recentemente a importância desta classe de enzimas vem sendo reconhecida em diversos estágios da tumorigênese.

3 – Importância das cisteíno catepsinas em processos tumorais

As cisteíno proteases têm a característica de possuir um resíduo de cisteína que age como um nucleófilo em processos catalíticos. Esta classe protéica compreende várias famílias de proteases, sendo a superfamília da papaína uma das mais estudadas. Esta família compreende além da papaína outras enzimas encontradas em plantas como a quimiopapaína e a actinidina, além da cruzipapaína e as catepsinas lisossomais.

Atualmente, estão descritos 11 membros da família das cisteíno catepsinas, (cat B, C, F, H, L, O, S, V, W, X/Z) que conservam a característica de possuírem o sítio ativo formado por resíduos de cisteína e histidina (Turk & Guncar, 2003). As seqüências de aminoácidos de todos os membros são conhecidas, porém apenas as catepsinas B, L, S, K, H, C, X (Musil *et al*, 1991; Guncar *et al*, 1999; McGrath *et al*, 1998; McGrath *et al*, 1997; Guncar *et al*, 1998; Turk *et al*, 2001a; Guncar *et al*, 2000) tem suas estruturas cristalográficas resolvidas. As informações obtidas a partir destes dados estruturais revelaram que tais enzimas compartilham o mesmo tipo de enovelamento, similar ao encontrado na papaína (Turk *et al*, 2002).

Algumas destas enzimas possuem atividade endopeptidase, outras são exopeptidases e outras apresentam as duas atividades (Turk *et al*, 2002). Uma característica comum às catepsinas é o fato das mesmas serem sintetizadas

como pró-enzimas (zimogênios) e posteriormente processadas às suas formas maduras.

As cisteíno catepsinas apresentam diversos papéis fisiológicos: degradação protéica nos lisossomos; reabsorção óssea e processamento de antígenos (Chapman et al, 1997). Entretanto, estas enzimas também participam de processos patológicos como: desenvolvimento metastático, distrofia muscular (Mort et al, 1984), infecção parasitária (McKerrow, 1999), distúrbios cardiovasculares (Lutgens et al, 2007) e mal de Alzheimer (Cataldo & Nixon, 1990).

Com relação ao desenvolvimento tumoral, há estudos que relacionam o aumento da expressão e, por conseguinte da atividade destas enzimas em diversos tipos de cânceres (Berdowska, 2004; Jedeszko & Sloane, 2004; Goldmann et al, 1999). É bem conhecido que em tumores de origem epitelial e mesenquimal, nos quais se enquadram câncer de seio, cérebro, pulmão, melanomas e outros tipos há aumento da atividade proteolítica das cisteíno catepsinas (Berdowska, 2004; Jedeszko & Sloane, 2004). Outro dado importante é a localização diferenciada destas enzimas em situações patológicas, onde as mesmas vão para a superfície celular para promoverem seus efeitos proteolíticos no meio extracelular (Mohamed & Sloane, 2006).

Na tabela1 é demonstrado o resultado de um estudo onde se utilizou camundongos *knock-out* para as cat B, C, L e S, ou seja, estes animais não eram capazes de expressar estas enzimas. Estes camundongos foram cruzados com portadores do tumor pancreático RT2 (Gocheva & Joyce, 2007).

Efeitos da deleção de catepsinas na tumorigênese RT2 (pâncreas)

| | catB ⁻ | catC ⁻ | catL ⁻ | catS ⁻ |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| Angiogênese | - 24 % | Sem mudanças | Sem mudanças | - 24% |
| Volume tumoral | - 72% | Sem mudanças | - 88% | - 47% |
| Apoptose | + 229% | Sem mudanças | + 337% | + 164% |
| Proliferação celular | - 44% | Sem mudanças | -58% | Sem mudanças |
| Invasividade | Redução significativa | Sem mudanças | Redução significativa | Redução significativa |

Tabela 1: Sumário do experimento com camundongos *knock out* para algumas catepsinas demonstrando a importância destas enzimas em diversos aspectos da tumorigênese (Gocheva & Joyce, 2007).

Como mostrado, ocorre uma redução dramática de diversos processos envolvidos na tumorigênese quando há a ausência das cisteíno catepsinas. Destacou-se na ocasião o fato da catepsina B desempenhar um papel central nestes processos, já que os tumores induzem a super-expressão da enzima em diversos tipos celulares em contato com a matriz: fibroblastos, neutrófilos, osteoclastos, macrófagos, células endoteliais além próprias células tumorais (figura 5) (Mohamed & Sloane, 2006).

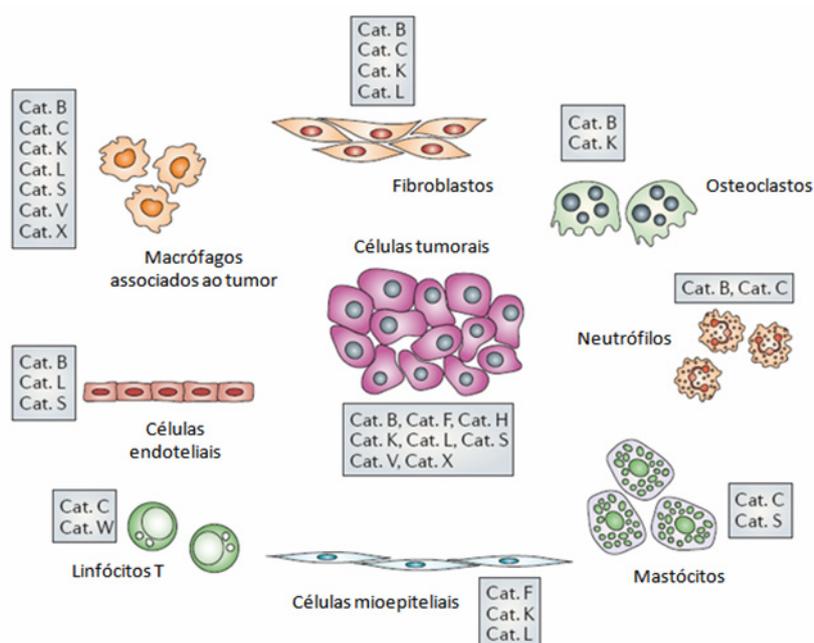


Figura 5 Tipos celulares que super-expressam cisteíno catepsinas no câncer. Adaptado de Mohamed & Sloane, 2006.

4 – Características da catepsina B

A catepsina B, a mais estudada das cisteíno catepsinas, pode ser encontrada tanto nos lisossomos quanto associada à membrana celular ou ainda secretada na matriz extracelular (Mohamed & Sloane, 2006). Devido à habilidade desta enzima em localizar-se em diferentes compartimentos, é de se esperar que as funções proteolíticas e seus substratos sejam dependentes da localização. Entre os substratos desta protease encontram-se proteínas da matriz como laminina (Buck *et al*, 1992), colágeno tipo IV (Buck *et al*, 1992), tenascina C (Mai *et al*, 2002), proteínas de adesão como E-caderina (Gocheva *et al*, 2006), e pro-enzimas como o pro-ativador de plasminogênio urocina (pro-uPA) (Kobayashi *et al*, 1993). Destaca-se também a associação da catepsina B em microdomínios de membrana como *lipid rafts* e regiões de caveola (Cavallo-Medved & Sloane, 2003). Neste último exemplo, foi observada associação da catepsina B com o heterotetrâmero de anexina II em células carcinogênicas humanas (Mai *et al*, 2000).

A catepsina B apresenta dois tipos de atividade proteolítica: exo-proteolítica (carboxipeptidase) e endo-proteolítica. Na primeira, a clivagem se dá na região carboxi-terminal de peptídeos, enquanto na segunda clivam-se regiões centrais dos substratos. Entre os inibidores endógenos da enzima encontram-se as proteínas da família das cistatinas. Estes inibidores se ligam reversivelmente a cisteíno proteases.

Outra característica marcante da catepsina B é a forte relação entre sua atividade e o pH do meio. Sabe-se que a ativação da enzima é disparada pelo pH ácido do interior do lisossomo e que a enzima é irreversivelmente inativada em pHs neutros e alcalinos (Turk *et al*, 1997). Entretanto, já foi observado que a forma da enzima associada à membrana plasmática apresenta maior resistência à inativação por pH (Sloane *et al*, 1986). Uma das hipóteses com maior relevância na literatura é que a interação com glicosaminoglicanos do tipo heparan sulfato seria responsável pela maior resistência ao pH observada (Almeida *et al*, 2001).

5 – Interações com glicosaminoglicanos

O heparan sulfato, um GAG estruturalmente relacionado à heparina, é encontrado na superfície celular e também na matriz extracelular. A interação entre estes GAGs e as cisteíno proteases vêm sendo investigada ao longo dos anos e alguns trabalhos apontaram funções cruciais na estabilização da papaína (Almeida *et al*, 1999). Neste caso, foi relatado que a interação com heparina/heparan sulfato estabilizaria a enzima proporcionando a preservação do conteúdo de alfa hélice, o qual é perdido em alto pH. Além disso, já se mostrou que estes GAGs são importantes na modulação da atividade da cruzipaina (Lima *et al*, 2002). Recentemente mostrou-se que a heparina e o heparan sulfato facilitam a ativação da pro-catepsina B (Caglic *et al*, 2007).

Em 2001, Almeida e colaboradores demonstraram que a interação catepsina B com heparina, usada como modelo de heparan sulfato, era capaz de estabilizar a enzima em pHs neutros e alcalinos. Dessa forma, ocorreria a preservação da atividade endo-proteolítica da enzima em altos pHs. O principal efeito observado foi a prevenção contra a perda do conteúdo de alfa-hélices conforme mostrado na papaína. Sugeriu-se na ocasião que a interação como GAG proporcionaria a manutenção de contatos que seriam perdidos em pHs alcalinos (Almeida *et al*, 2001).

6 – Detalhes estruturais

A estrutura da catepsina B foi resolvida por Difração de raios X em 1991 (Musil *et al*, 1991), revelando a presença de dois domínios chamados de L e R (esquerdo e direito respectivamente) conforme mostrado na figura 6 Este enovelamento é comum à papaína e a todas as outras cisteíno catepsinas (Turk *et al*, 2002). Enquanto no domínio L destaca-se a presença de uma alfa-hélice central rodeada por hélices secundárias, no domínio R há a prevalência de folhas beta.

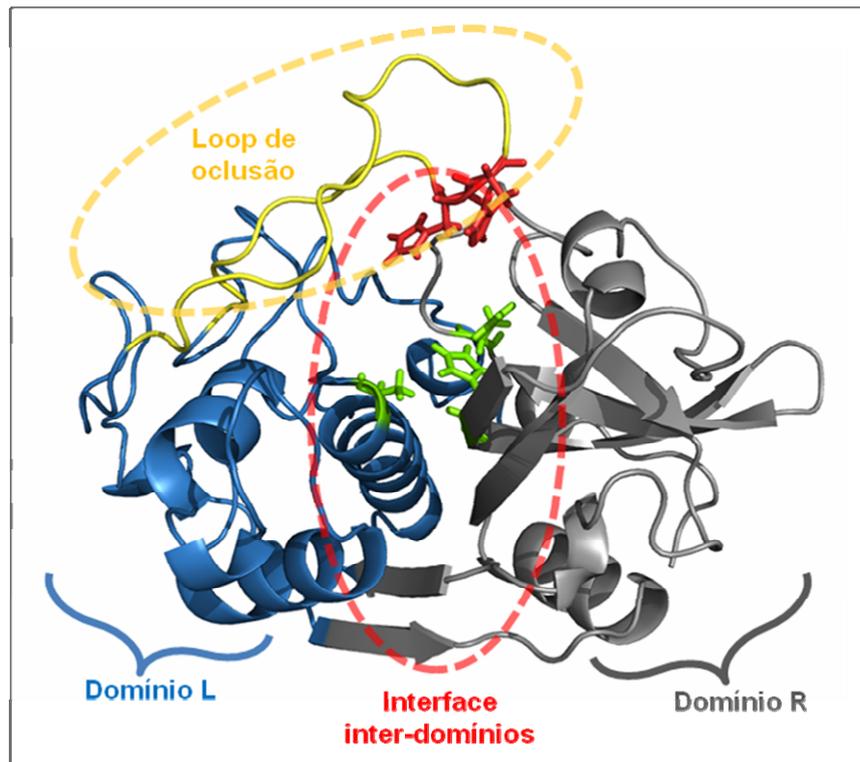


Figura 6: Representação frontal em *cartoon* da estrutura cristalográfica da catepsina B (Musil et al, 1991). Em azul: domínio L; em cinza: domínio R. Os resíduos da tríade catalítica (Cis 29, His 199 e Asn 219) estão representados em verde. Em amarelo a alça de oclusão contendo as histidinas 110 e 111 representadas em vermelho.

Em comparação à estrutura da papaína, observou-se que 166 aminoácidos são topologicamente equivalentes e constituem as regiões centrais da proteína, sendo as inserções e deleções confinadas à superfície (Musil *et al*, 1991). Há inclusive conservação na disposição espacial dos resíduos catalíticos, já que a cisteína 29 (Cis 25 na papaína) encontra-se no domínio L, enquanto a histidina 199 (His 159 na papaína) localiza-se no domínio R.

A maior diferença que distingue a catepsina B de outras cisteíno proteases é a presença de uma alça que oclui o sítio ativo. Esta estrutura foi denominada alça (“*loop*”) de oclusão e ocupa os subsítios S’ da enzima (Musil *et al*, 1991).

Como já mencionado, a catepsina B apresenta duas atividades proteolíticas exo e endo-peptidase. Diversos autores sugerem que as atividades seriam reguladas pela alça de oclusão que, além disso, teria papel

importante na termo-proteção da enzima e também capaz de conferir resistência a inibidores endógenos como a cistatina C (Illy *et al*, 1997). Na região da alça, há a presença de dois resíduos de histidina adjacentes (110 e 111) e apontados como cruciais para a atividade exopeptidase da enzima por serem necessários para a acomodação das regiões carboxi terminais de peptídeos (Musil *et al*, 1991; Almeida *et al*, 2001; Krupa *et al*, 2002).

A hipótese mais aceita na literatura acerca da funcionalidade da enzima seria que, em pH ácido, a alça de oclusão estaria estável logo a enzima apta a acomodar substratos menores, os quais seriam favorecidos a alcançar os resíduos catalíticos com a alça “fechada”. Já em pHs neutros e alcalinos, a região da alça estaria desestabilizada e, portanto, o subsítio formado pelas histidinas 110 e 111 estaria desestabilizado, não acomodando bem as regiões carboxi-terminais e impossibilitando a atividade exo-peptidase (Illy *et al*, 1997; Nagler *et al*, 1997). Além disso, a abertura da alça permite que substratos maiores se acomodem bem na enzima e a atividade endo-peptidase prevaleça nestas condições de pH (Nagler *et al*, 1997).

Outro aspecto fundamental é a presença de uma extensa interface interdomínios majoritariamente polar onde se encontra a fenda catalítica. Dentre os resíduos catalíticos, apenas Cis 29 localiza-se no domínio L enquanto His 199 e Asn 219 encontram-se no domínio R. Em 2000 um estudo apontou que a perda do contato Cis29 – His 199 seria responsável pela desestabilização da enzima em pH neutro. Tal evento ocorreria devido à desprotonação da His 199 em pH neutro, o que levaria à perda do contato com a Cis 29 por ponte salina (Song *et al*, 2000).

7 – Inibidores da catepsina B

Em 1995, Turk e colaboradores determinaram a estrutura da catepsina B complexada com o inibidor CA-030, um derivado do inibidor padrão de cisteíno proteases E64 (Turk *et al*, 1995). Estes inibidores, compostos com o grupamento epóxi-succinil são os mais estudados inibidores da enzima (Figura 7) (Barret *et al*, 1982; Gobec & Frlan, 2006).

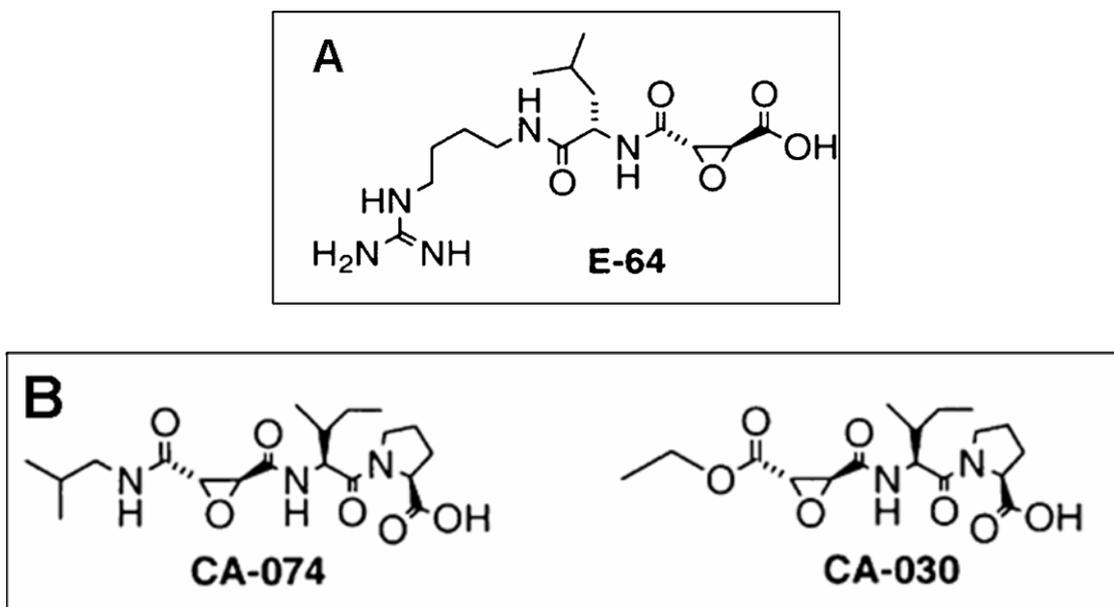


Figura 7: Inibidores do tipo epóxi-succinil. (A) Estrutura química do inibidor padrão de cisteíno proteases E-64. (B) Inibidores derivados do E-64 com maior especificidade pela catepsina B. (Adaptado de Cathers et al, 2002).

Estruturas cristalográficas desta classe de inibidores com a papaína revelaram o modo de ligação ao sítio ativo da enzima, revelando sub-sítios de interação e um vasto conhecimento que vem sendo aplicado em outras enzimas da mesma família (Varughese *et al*, 1989).

Obteve-se 0.30 Å de desvio após sobreposição dos átomos de carbono alfa desta estrutura e do cristal da proteína livre, revelando que as duas estruturas eram semelhantes e, portanto a interação com o inibidor não alterava a estrutura da proteína de forma significativa. No mesmo trabalho discutiu-se a possibilidade de inibidores mais específicos que poderiam interagir com os sub-sítios da catepsina B com maior afinidade (Turk *et al*, 1995).

Entretanto, apesar da especificidade dos inibidores do tipo epóxi-succinil, os ensaios enzimáticos utilizando estes inibidores revelaram grande dependência do pH do meio para a efetividade dos mesmos (Cathers *et al*, 2002). A explicação para estes resultados reside no insuficiente entendimento do mecanismo de abertura/fechamento da alça de oclusão (Cathers *et al*, 2002).

É postulado que em condições ácidas a alça permaneceria fechada favorecendo a atividade exo-proteolítica, enquanto em pH neutro ele estaria aberto favorecendo atividade endo-proteolítica (Illy *et al*, 1997). Logo, em condições alcalinas, com desestabilização do alça e, por conseguinte do subsítio S1' (formado por His 110 e Gln 23), devido a perda de interações entre a His 110 e Asp 22 e também entre Arg 116 e Asp 224 (Cathers *et al*, 2002; Almeida *et al*, 2001).

Recentemente, vêm sendo realizados trabalhos sistemáticos objetivando a busca de inibidores efetivos utilizando ferramentas de modelagem molecular (Lim *et al*, 2004; Zhou *et al*, 2009). Contudo, nestes trabalhos os autores não levaram em conta qualquer efeito do pH e também da interação com glicosaminoglicanos no comportamento da enzima. Como já foi experimentalmente proposto que ambos os fatores modulam significativamente a atividade e estabilidade da catepsina B, há a necessidade de uma abordagem metodológica onde tais efeitos sejam considerados.

8- Objetivos Específicos

Dados experimentais sugerem que a interação da catepsina B com heparina seria responsável pela estabilização da enzima em pHs neutros e alcalinos. Nosso grupo visa compreender este mecanismo utilizando técnicas de modelagem molecular. O trabalho é baseado na idéia de que o melhor entendimento de detalhes estruturais e dinâmicos da enzima ao interagir com heparina, em diferentes condições de pH, será de crucial importância no desenvolvimento de inibidores eficazes para a catepsina B para aplicação em casos patológicos.

Pontos abordados:

- Obter os estados mais prováveis de protonação da catepsina B em diferentes pHs.
- Obter o complexo catepsina B/heparina de mais baixa energia por ancoramento (*docking*) molecular.
- Realizar simulações de dinâmica molecular em solvente aquoso da proteína livre e do complexo em diferentes estados de protonação da enzima.
- Comparar a estabilidade dos sistemas. Analisar os contatos mais importantes durante a dinâmica. Verificar interações já mencionadas e outras ainda não descritas experimentalmente.
- Estudar o comportamento da enzima e da alça por dinâmica essencial. Relacionar movimentos principais com atividade enzimática em diferentes condições.

9 – Procedimentos

9.1 – Parâmetros para realização de ancoramento molecular

Utilizou-se um dissacarídeo de heparina extraído da estrutura do açúcar resolvida por RMN (código PDB: 1HPN) (Mulloy *et al*, 1993) como ligante com todas suas ligações com liberdade de giro livres. A estrutura da catepsina B utilizada nos cálculos foi resolvida na forma livre por Difração de Raios-x (código PDB: 1HUC) (Musil *et al*, 1991).

Aplicou-se o módulo Autogrid presente no pacote Autodock (Morris *et al*, 1998) para a geração de malhas (*grids*) de interação cobrindo toda a proteína com espaçamento de 0.498 Å. Foram realizados 100 cálculos de ancoramento em uma população inicial de 200 indivíduos. As soluções foram separadas em clusters de até 2 Å de desvio médio quadrático (RMSD). Os clusters foram então ranqueados de acordo com seus valores energéticos.

9.2 – Parâmetros utilizados na DM

As simulações foram realizadas em solvente explícito utilizando uma camada de 15Å de solvente ao redor do soluto. Utilizou-se uma caixa de água dodecaédrica em condições periódicas de contorno contendo aproximadamente 13.900 moléculas de água do tipo SPC (*Single Point Charge*) (Berendsen *et al*, 1981). Contra-íons (Na^+) foram utilizados para neutralizar os sistemas.

Para minimização de energia foi utilizado um protocolo de três etapas: inicialmente utilizou-se o método do máximo declive em duas etapas, sendo a primeira com os átomos pesados do soluto com posições restringidas e na segunda com todos os átomos livres. A seguir aplicou-se o método do gradiente conjugado para uma melhor otimização das geometrias antes da dinâmica molecular.

O protocolo de DM se iniciava com a simulação de 500 picosegundos a 310K em cada sistema, mantendo os átomos pesados com posições restringidas. Nesta etapa utilizou-se uma distribuição randômica de Boltzmann para a geração das velocidades iniciais. Em seguida, 3 nanosegundos de DM

com todos os átomos livres foram simulados para a termalização e equilíbrio do sistema. Após todas estas etapas foram realizadas simulações de 40 nanosegundos para a aquisição de dados.

Utilizaram-se 2 femtosegundos como tempo de integração. Utilizaram-se os métodos de vínculo LINCS (Hess *et al*, 1997) e SETTLE (Myamoto & Kollman, 1992) para correção das ligações do soluto e da água respectivamente. Temperatura e pressão foram mantidas constantes a 310K e 1 atm respectivamente utilizando-se acoplamento de Berendsen (Berendsen *et al*, 1984). Interações eletrostáticas foram calculadas utilizando-se o método PME (Particle Mesh Ewald) (Darden *et al*, 1993) com raio de corte de 10 Å. Interações de Van der Waals foram tratadas utilizando raio de corte simples de 10Å.

9.3 – Análise de Componentes Principais

Foram selecionados os 20ns finais das trajetórias dos carbonos alfa (C_{α}) para as análises de dinâmica essencial. Para a obtenção da matriz de covariância das posições atômicas utilizou-se o módulo *g_covar* do pacote GROMACS. Os três resíduos terminais (primeiros e últimos) foram removidos da análise para que suas altas flutuações não gerassem artefatos (Tai *et al*, 2001). Movimentos de rotação e translação foram removidos previamente. Todas as análises foram realizadas com o uso do módulo *g_anaeig* do pacote GROMACS.

10 – Resultados e Discussão

10.1 – Determinação dos estados de protonação em diferentes pH

A partir dos valores de pK_a dos resíduos da proteína é possível a correta predição dos estados de protonação de cada resíduo. Vale lembrar que o servidor utilizado leva em conta no cálculo três fatores: efeitos de desolvatação (resíduo presente no interior da estrutura); ligações hidrogênio além de interações eletrostáticas. O cálculo dos estados de protonação dos resíduos da catepsina B foi realizado visando a representação de um ambiente alcalino (pH 8) e o interior ácido do lisossomo (pH 5,5).

Observou-se que seis resíduos apresentaram diferentes estados de protonação ao se comparar os resultados para o pH ácido com o alcalino. De forma geral, as diferenças residem no fato que em pH ácido, dependendo do grau de acidez, os resíduos Glu36, His97, His110, Glu171, His190 e His199 encontram-se na forma protonada, enquanto em ambiente alcalino eles estariam desprotonados. Dessa forma, a carga total da proteína no ambiente ácido estudado seria de -5 e no alcalino de -11. Dos resíduos citados, os três primeiros localizam-se no domínio L, estando os restantes localizados no domínio R da proteína (figura 8).

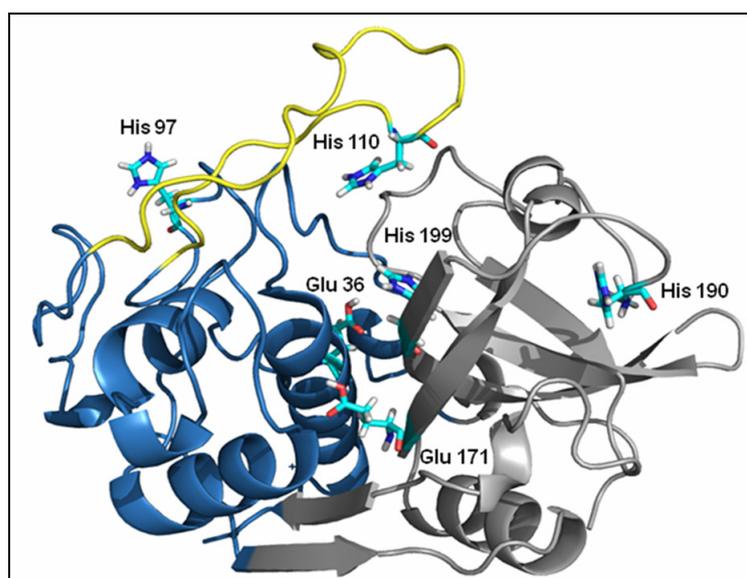


Figura 8: Disposição na estrutura tridimensional da catepsina B dos resíduos diferencialmente protonados em condições ácida e alcalina.

Os dados obtidos a partir do servidor PROPKA confirmaram predições experimentais nas quais as protonações dos resíduos His110, Glu171 e His199 foram sugeridas (Musil *et al*, 1991). Estes três resíduos localizam-se na interface inter-domínios e são relatados em diversos trabalhos como cruciais na manutenção da estabilidade da enzima (Musil *et al*, 1991; Almeida *et al*, 2001).

A protonação em pH ácido da histidina 110, localizada na alça de oclusão, é sugerida como determinante na estabilização desta estrutura e, portanto interfere diretamente na atividade exo-peptidase. Já a protonação da histidina 199 (domínio R), a qual é parte da tríade catalítica, foi sugerida a partir de experimentos de RMN que apontaram este resíduo como essencial na estabilização da enzima devido à formação de um par iônico com Cis29 (domínio L) apenas se protonada (Song *et al*, 2000).

Com relação a este último contato vale ressaltar que esta cisteína, nas enzimas similares à papaína, apresenta um pK_a muito mais baixo que o usual. Enquanto o valor de pK_a da cisteína em água é de 8,3, na papaína os valores giram em torno de 2,5 a 3,5 (Pinitglang *et al*, 1997). Logo, pode-se dizer que nas faixas de pH tanto do lisossomo quanto no fisiológico a cisteína estará ionizada, apresentando carga negativa. Dessa forma, o resíduo tem a capacidade de formação de um par iônico com His199. O pK_a predito na análise da catepsina B foi de 2,14. Como há forte correlação entre o sítio ativo da papaína e da catepsina B, pode-se dizer que a predição foi satisfatória.

Além disso, dados cristalográficos sugerem que a protonação do resíduo glutamato (Glu) 171, o qual se localiza no interior da enzima, seria importante para as interações inter-domínios. Sugeriu-se que a interação entre Glu171 e o triptofano (Trp) 30 por ligação hidrogênio ocorreria somente com a protonação da carboxila do glutamato, permitindo então a formação do contato (Musil *et al*, 1991). Ressalta-se que o servidor PROPKA foi robusto o suficiente para informar o exato oxigênio da carboxila que receberia o próton, estando em total acordo com a previsão experimental (figura 9) (Musil *et al*, 1991).

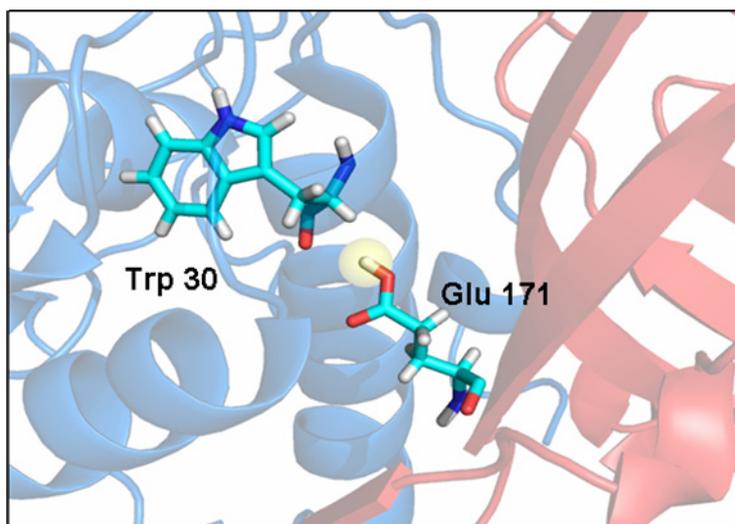


Figura 9: Representação do contato entre o triptofano (Trp) 80 e o glutamato (Glu) 171. Estes resíduos pertencem a domínios diferentes (domínio L em azul e domínio R em vermelho). Destacou-se o próton predito na carboxila de Glu171 predito pelo servidor PROPKA para este resíduo em pH 5,5, o que permite o mesmo desempenhar o papel de doador de próton na ligação hidrogênio. O oxigênio da cadeia principal de Trp30 funcionaria como aceitador nesta interação.

Entre os demais resíduos diferencialmente protonados em pHs ácido e alcalino, apenas Glu36 poderia participar da estabilização inter-domínios da enzima. O fato de este resíduo estar inserido na alfa-hélice principal da enzima (resíduos 28-45) e constituir a interface polar entre os domínios L e R levanta a hipótese da importância da protonação para a estabilidade da catepsina B. Já His97 e His190 por estarem expostos na superfície em regiões distantes da interface inter-domínios parecem não ter uma função clara na estabilização da enzima.

10.2 – Análise da superfície eletrostática da catepsina B em diferentes estados de protonação

A superfície eletrostática da catepsina B foi analisada nos dois estados de protonação obtidos anteriormente após o cálculo de pK_a . Dessa forma, seria possível obter-se a influência do pH sobre a distribuição de carga na superfície da enzima.

Lembrando que a variação de carga entre os estados alcalino e ácido foi de -11 para -5, eram esperadas então mudanças significativas no perfil de

cargas da proteína. A figura 10 mostra que em pH 8 a catepsina B apresenta a maior parte de sua superfície negativamente carregada, enquanto em pH 5,5 há menos regiões negativas. Observou-se também que as cargas não são distribuídas de forma homogênea na superfície (figura 10).

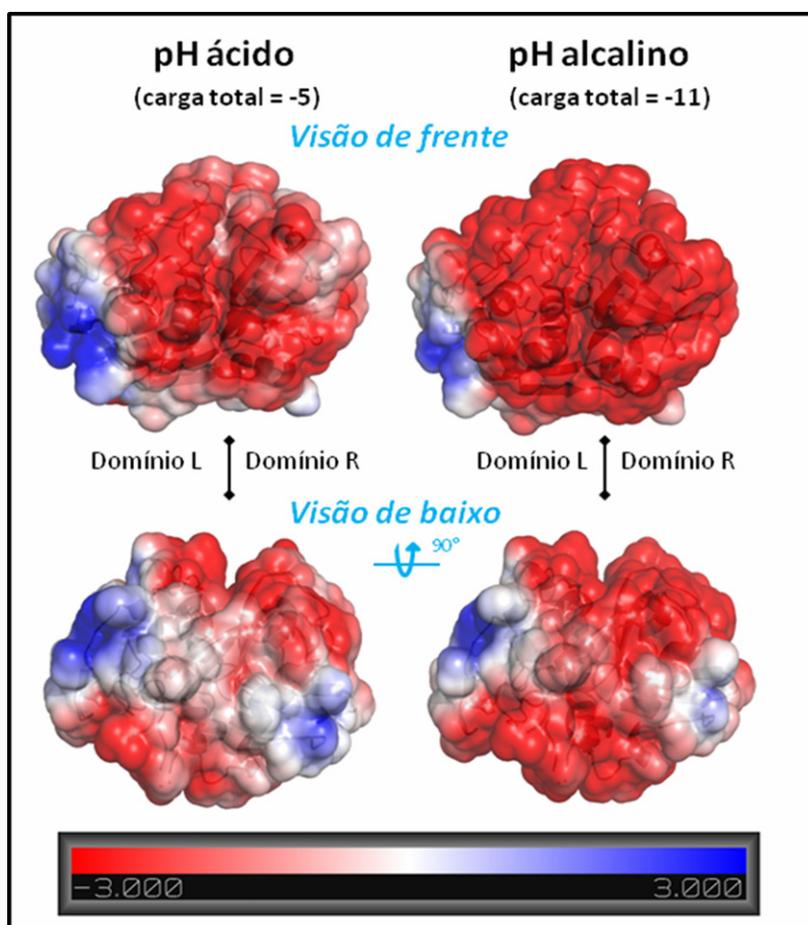


Figura 10: Superfície eletrostática da catepsina B em diferentes condições. Regiões vermelhas representam áreas onde o potencial eletrostático é negativo; regiões brancas áreas representam áreas neutras; regiões azuis representam áreas positivas.

Qualitativamente, notou-se a presença de dois sítios positivos em extremidades opostas da proteína. O sítio positivo localizado no domínio L é constituído pelos resíduos Lis130, Lis141 e Arg250, já o sítio do domínio R é formado pela região amino terminal da proteína e por Lis154 e Arg231. Em pH 8, estes sítios estariam separados por uma pequena região negativa, a qual não foi observada em pH 5,5. Além disso, a área dos sítios positivos aumenta consideravelmente neste último valor de pH.

É dado conhecido que geralmente interações entre proteínas e glicosaminoglicanos são governadas por interações eletrostáticas. Sabendo que a heparina é repleta de grupos sulfato em sua estrutura, conclui-se que a interação entre a catepsina e a heparina se daria preferencialmente nos sítios positivos da proteína.

10.3 – Obtenção dos complexos por ancoramento molecular

A análise dos resultados obtidos após ancoramento molecular com AUTODOCK 3.0 (Morris et al, 1998) revelou padrões bem definidos de interação entre a catepsina B e o dissacarídeo de heparina. Os cálculos de ancoramento foram realizados utilizando a catepsina B com estado de protonação referente ao pH neutro/alcalino. A escolha da faixa de pH foi para simular a formação do complexo na membrana plasmática ou no meio extracelular. Como o pH destas regiões é predominantemente neutro, as análises visaram a melhor representação possível das condições fisiológicas.

Como esperado após a análise de superfície eletrostática, nos complexos de mais baixa energia obtidos, o dissacarídeo de heparina interagiu com um dos sítios positivos da proteína (figura 11).

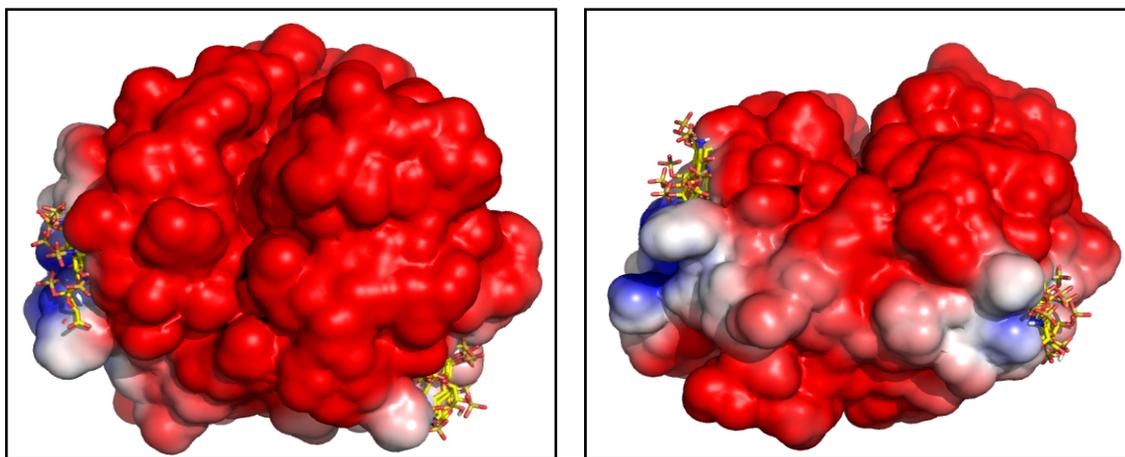


Figura 11: Resultado do cálculo de ancoramento molecular mostrando as regiões preferenciais de interação da heparina com a catepsina B. Na figura estão mostradas algumas das conformações de mais baixa energia nos dois *clusters* (domínio L / R) de mais baixa energia. Os desvios entre cada estrutura do mesmo sítio vão até 2 Å.

Apesar de a região de potencial positivo localizada no domínio L ser maior do que o sítio do domínio R, os complexos mais favoráveis se deram

com a heparina interagindo com este último sítio. Uma possível explicação para este fato seria pela melhor acomodação do dissacarídeo nessa região, provavelmente satisfazendo de forma mais favorável contatos de Van der Waals, se comparado com os complexos onde a heparina estaria no domínio L. Baseado no critério energético, o complexo de mais baixa energia foi selecionado para ser submetido às simulações de DM.

10.4 – Sistemas simulados

Quatro sistemas foram submetidos às simulações de dinâmica molecular, realizadas seguindo o protocolo descrito na seção apêndices. Os sistemas simulados foram os seguintes:

| Sistema simulado | Abreviatura/cor |
|--|-------------------|
| Catepsina B com protonação referente à pH 8 | catB/pH 8 |
| Catepsina B com protonação referente à pH 5,5 | catB/pH 5,5 |
| Catepsina B com protonação referente à pH 8 + heparina | catB/pH 8 + hep |
| Catepsina B com protonação referente à pH 5,5 + heparina | catB/pH 5,5 + hep |

Tabela 2: Sistemas submetidos às simulações de DM.

Estes sistemas serão citados conforme as abreviaturas apresentadas na tabela 2, já nas figuras o código de cores será sempre mantido.

10.5 – Medidas de controle das simulações

Foram inspecionadas a temperatura, energia potencial e a cinética durante a simulação de 40 ns para cada sistema. Estas medidas serviram como controle da estabilidade das trajetórias para assegurar a validade dos dados obtidos das dinâmicas. Verificou-se também o raio de giro da proteína durante a simulação com o intuito do monitoramento de quaisquer mudanças significativas na forma globular da catepsina B.

As análises mostraram que independente do sistema simulado todas estas medidas permaneceram estáveis (dados não mostrados). Logo, pode-se afirmar que os resultados obtidos e a seguir apresentados não se originaram de eventuais artefatos de simulação.

10.6 – Análises das flutuações dos sistemas durante a DM

Inicialmente, foi analisada a evolução temporal da raiz do desvio quadrático médio (RMSD) da cadeia principal da catepsina B durante os 40ns de DM. Esta análise é importante na checagem da estabilidade das estruturas, pois menores valores de RMSD indicam menores desvios globais da enzima durante a dinâmica em relação à estrutura inicial e, portanto, maior estabilidade da estrutura (figura 12).

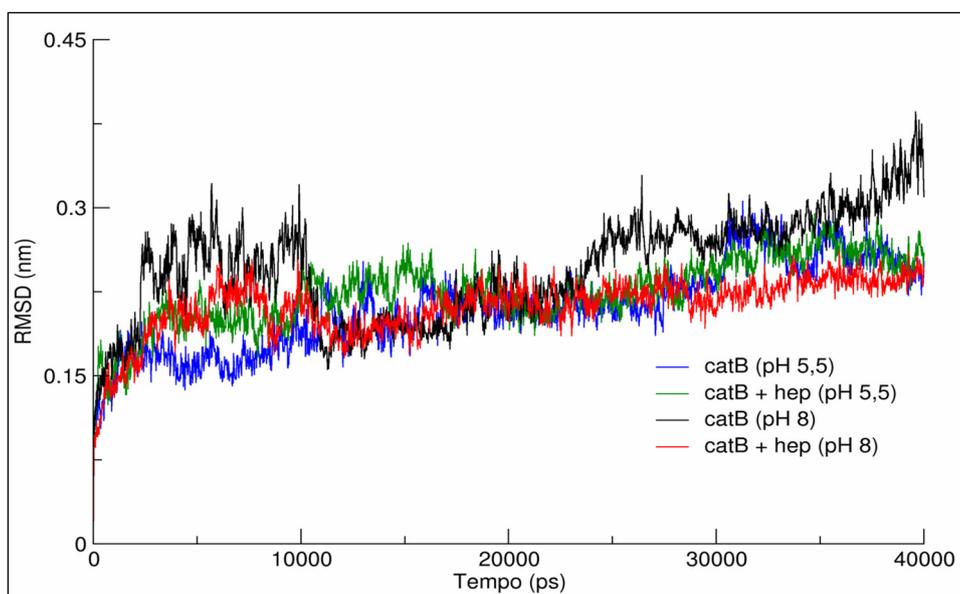


Figura 12: Evolução temporal da raiz do desvio médio quadrático dos átomos da cadeia principal da catepsina B nos quatro sistemas simulados.

Nota-se claramente que nas simulações com a catepsina B em pH 5,5 atingiu-se a estabilidade em torno de 0,2nm durante a dinâmica (em azul e verde). Já no pH alcalino, no qual a enzima experimentalmente é inativada, observou-se estabilidade apenas na simulação do complexo com heparina (em vermelho), o que corrobora dados experimentais relatando tal efeito (Almeida *et al*, 2001). No sistema em pH alcalino sem heparina (em preto) além dos desvios mais altos ultrapassando 0,3nm, o valor de RMSD apresenta uma tendência a aumentar sugerindo que neste sistema a enzima se desestabilizou durante a DM.

Em seguida, analisou-se a flutuação média por resíduo (RMSF), onde as flutuações são obtidas tomando como referência a estrutura média da

dinâmica. Logo, de forma qualitativa, puderam-se identificar regiões com variados padrões de flutuações ao se comparar os diferentes sistemas simulados. Na figura 14 os desvios são mostrados, destacando-se algumas regiões de interesse biológico. Esta mesma análise é mostrada de forma tridimensional, onde a cadeia principal da proteína é representada em tubos, sendo o gradiente de cores correspondente aos desvios observados (figura 13).

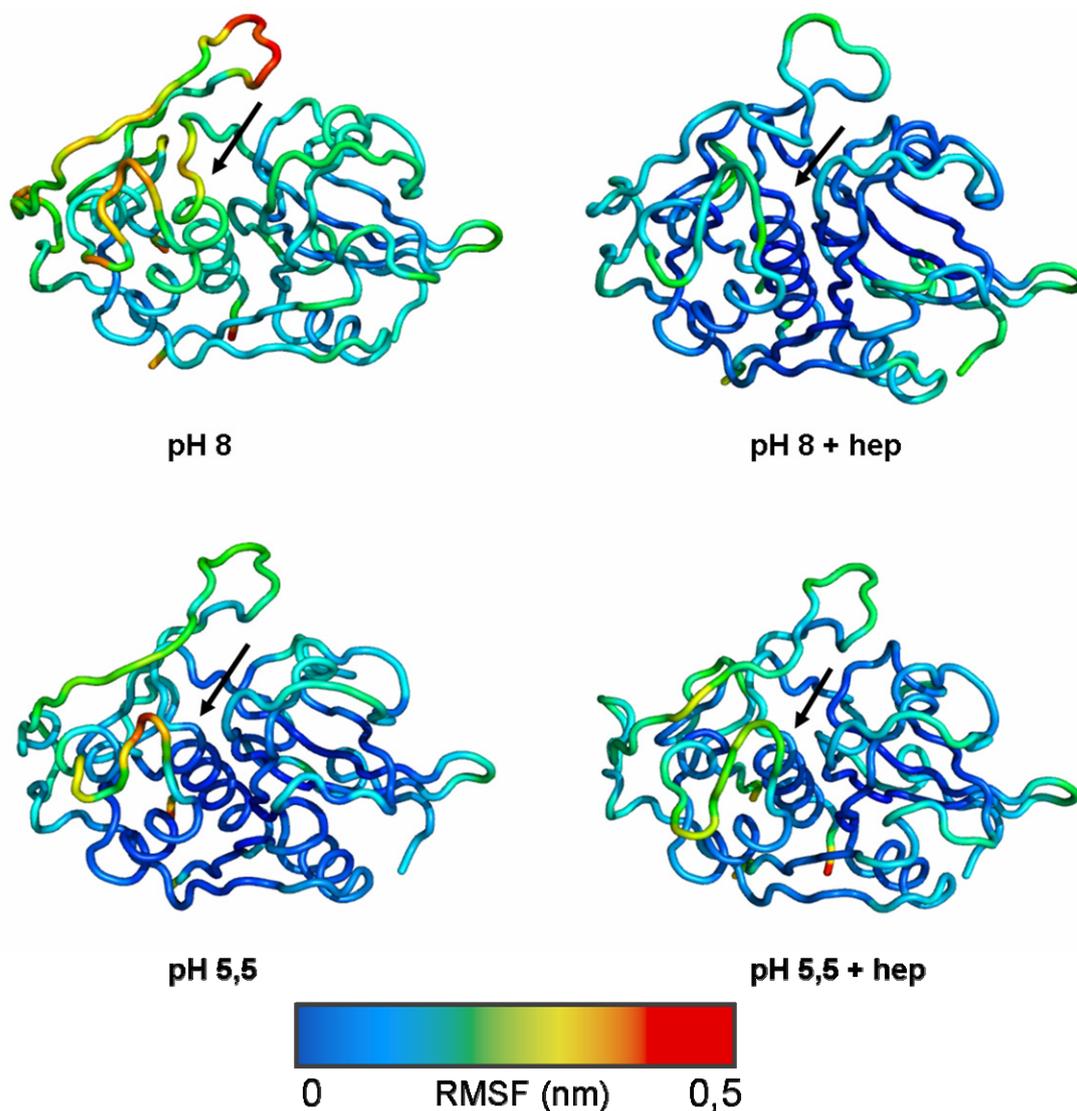


Figura 13: Representação tridimensional das flutuações do esqueleto protéico da catepsina B durante as simulações de 40 ns. O ponto de vista frontal foi utilizado conforme a figura 6 e as estruturas representadas correspondem às estruturas médias de cada simulação. O gradiente de cores corresponde às flutuações em nm. A seta indica a região da cisteína (Cis) 29 a qual é um dos resíduos catalíticos.

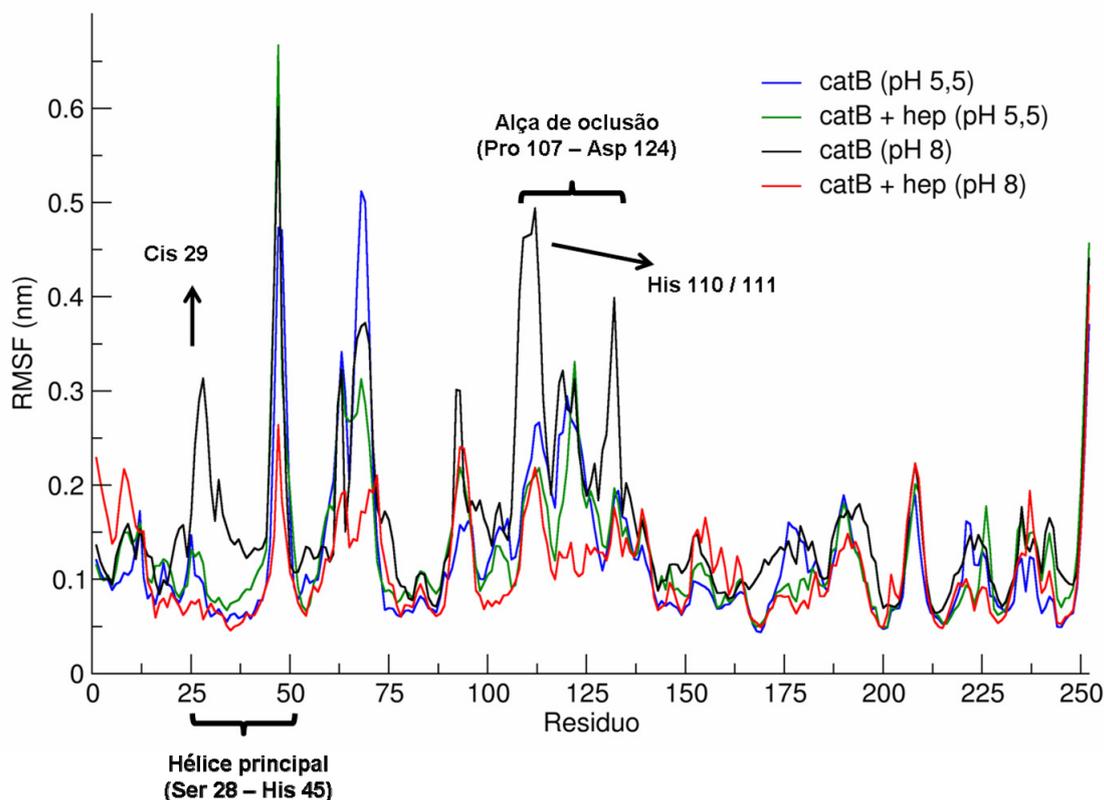


Figura 14: Desvio médio por resíduo durante as simulações de 40 ns.

Uma região destacada no gráfico é a que compreende as flutuações da denominada alfa-hélice principal (resíduos 28-45). Claramente, pode-se ver que no sistema catB/pH 8 (em preto) os desvios durante a DM foram significativamente maiores do que nos outros sistemas. Além de esta região formar parte da interface inter-domínios, a mesma contém a cisteína 29, resíduo participante da tríade catalítica.

Conforme quantificado no gráfico acima (figura 14) e representado na figura 13, a região da alça de oclusão (resíduos 107-124) apresentou flutuações no sistema catB/pH8 (em preto) maiores do que nos demais, que por sua vez apresentaram comportamento similar.

Relembrando que a interface inter-domínios é majoritariamente polar (Musil *et al*, 1991), e que a análise de pK_a revelou diferenças na protonação de resíduos inseridos na região, o próximo passo foi avaliar a estabilidade da interface, comparando o comportamento de cada sistema.

10.7 – Análises da estabilidade da interface inter-domínios

A perda de contatos na interface inter-domínios é um evento crucial na inativação da catepsina B por pH alcalino. Sabe-se que a interface entre os domínios L e R da proteína é fundamental tanto na estabilização da estrutura terciária quanto na atividade catalítica da enzima.

Inicialmente verificou-se a evolução temporal da distância entre os centros de massa de cada domínio (figura 15). Nas simulações correspondentes ao pH ácido (em azul e verde) observou-se que a distância entre os centros de massa permaneceu estável durante toda a simulação. Já no sistema correspondente ao pH alcalino com heparina (em vermelho) observou-se uma ligeira aproximação entre os domínios. Em contraste, nesse mesmo pH, porém sem heparina (em preto) foi observado aumento da distância inter-domínios (figura 15).

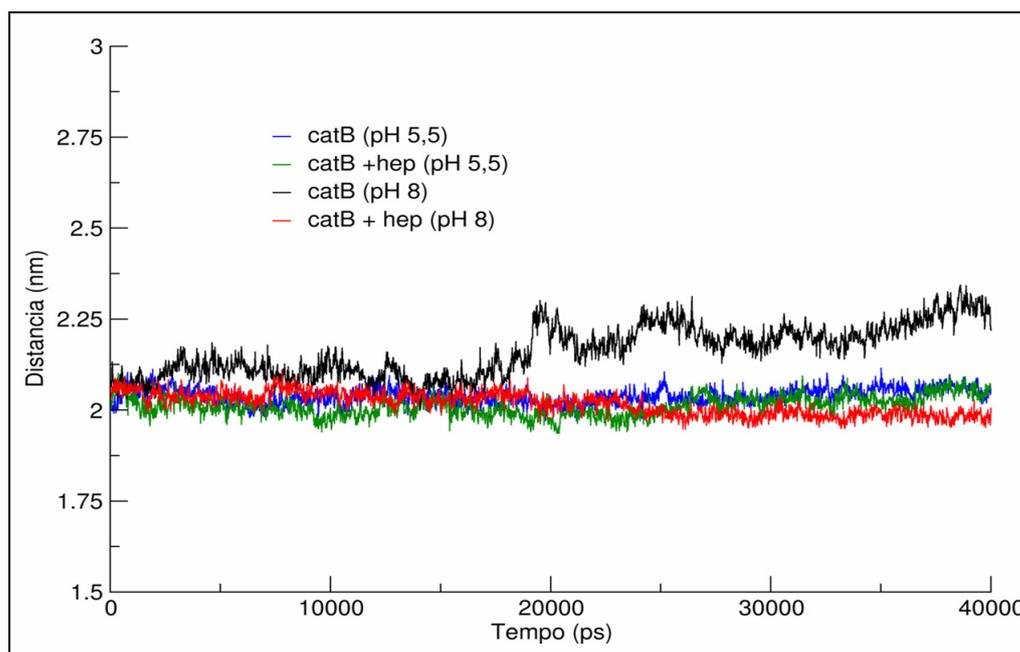


Figura 15: Evolução temporal da distância entre os centros de massa dos domínios L e R.

O distanciamento entre os domínios L e R da catepsina B em pH alcalino constitui um fator importante no entendimento da perda da funcionalidade da proteína nesta condição. Este mecanismo molecular é uma provável consequência da perda de contatos na interface, envolvendo inclusive os aminoácidos catalíticos.

10.8 – Análise do comportamento do sítio ativo

Acredita-se que a atividade catalítica da catepsina B é dependente da formação de um par iônico entre Cis29 e His199, o qual seria desestabilizado com aumento do pH (figura 16) (Turk et al, 1994; Song et al, 2000).

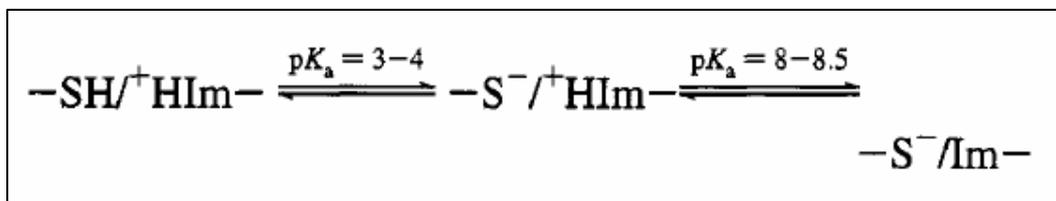


Figura 16: Esquema ilustrando a formação e perda do par iônico Cis 29 – His 199 em diferentes pHs. No esquema S representa o grupo tiolato da cisteína 29 e Im equivale ao grupo imidazol da histidina. Adaptado de Turk et al, 1994.

Lembrando que a análise dos estados de protonação (figura 8) revelou que a mudança de pH de 5,5 para 8 leva à perda do próton da histidina 199, conclui-se que tal predição está em acordo com a hipótese descrita na literatura (Turk et al, 1994; Song et al, 2000). Logo, durante as simulações esperava-se que o contato fosse completamente desfeito em pH 8, porém permanecendo estável em pH 5,5. A figura 17 mostra a evolução temporal das distâncias entre os centros de massa destes resíduos durante a DM.

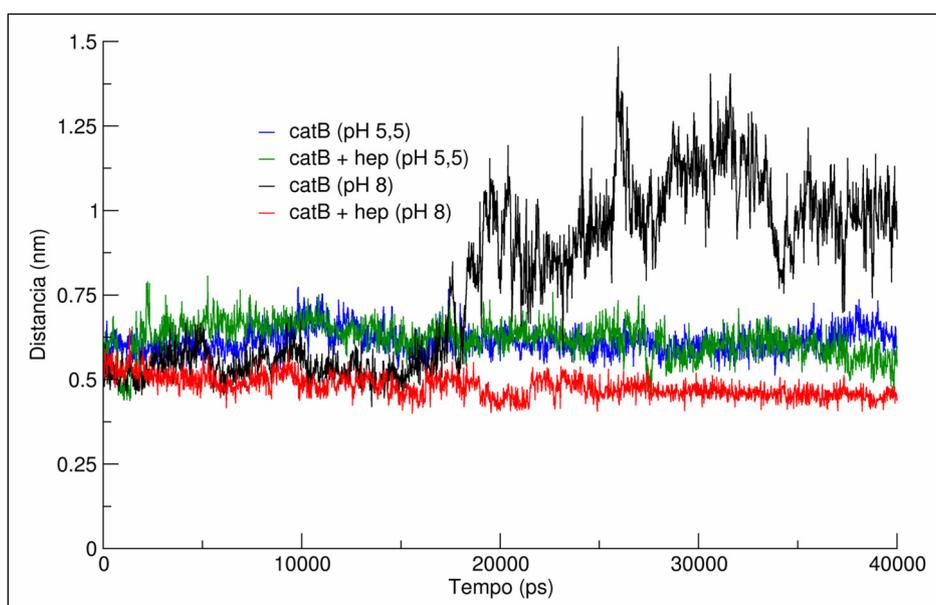


Figura 17: Acompanhamento da distância entre os centros de massa da cisteína 29 (Domínio L) e a histidina 199 (Domínio R). Ambos resíduos pertencem à tríade catalítica da catepsina B.

O perfil do gráfico de distâncias entre os resíduos mostrou-se semelhante ao obtido na análise das distâncias entre os domínios. Dessa forma, apenas no sistema em pH alcalino sem heparina (em preto) notou-se aumento das distâncias entre os resíduos. Inicialmente em todas as simulações a distância era de 0.5 nm e neste sistema a partir da metade da simulação os valores chegaram a flutuar em torno de 1 nm.

A estabilidade do contato no sistema catB/pH 8 + hep foi inesperada, já que a ausência do par iônico devido à perda do próton de His199 é relatada como determinante no afastamento dos resíduos (Turk et al, 1994; Song et al, 2000). Logo, um dos mecanismos de prevenção da perda de atividade da enzima, mediado pela heparina, se daria pela manutenção da proximidade entre os resíduos catalíticos.

10.9 – Acompanhamento da estrutura secundária na região catalítica

É relatado que a perda do contato Cis 29 – His 199 acarreta não apenas na perda da atividade, mas também da estabilidade da enzima em condições alcalinas (Turk et al, 1994; Song et al, 2000). Devido ao fato de Cis29 encontrar-se inserido na alfa-hélice principal da proteína (resíduos 28-45), hipotetizou-se que em pH alcalino uma consequência direta do afastamento dos resíduos catalíticos seria a desestabilização da hélice (figura 18) (Turk et al, 1994).

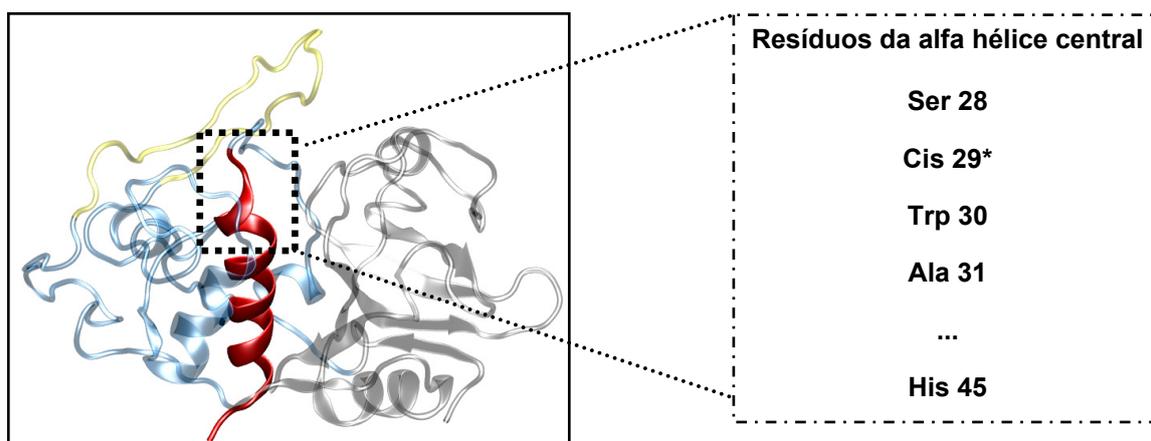


Figura 18: Representação em *cartoon* da catepsina B destacando a região inicial da alfa hélice principal (em vermelho) presente no domínio L (em azul) da proteína. O domínio R foi representado em cinza e a alça de oclusão e amarelo.

Acompanhou-se então a distribuição temporal dos mapas phi x psi [Φ x Ψ] (diagrama de Ramachandran) dos resíduos da hélice adjacentes à cisteína 29. A partir desta análise é possível se identificar houve uma desestabilização local relacionada à perda do contato em pH alcalino. A figura 19 mostra os mapas referente aos sistemas em pH 8, já que em pH ácido não ocorreu a perda do contato. O sistema cat:B/ pH8 + heparina é mostrado para a comparação direta com o sistema da enzima livre (figura 19).

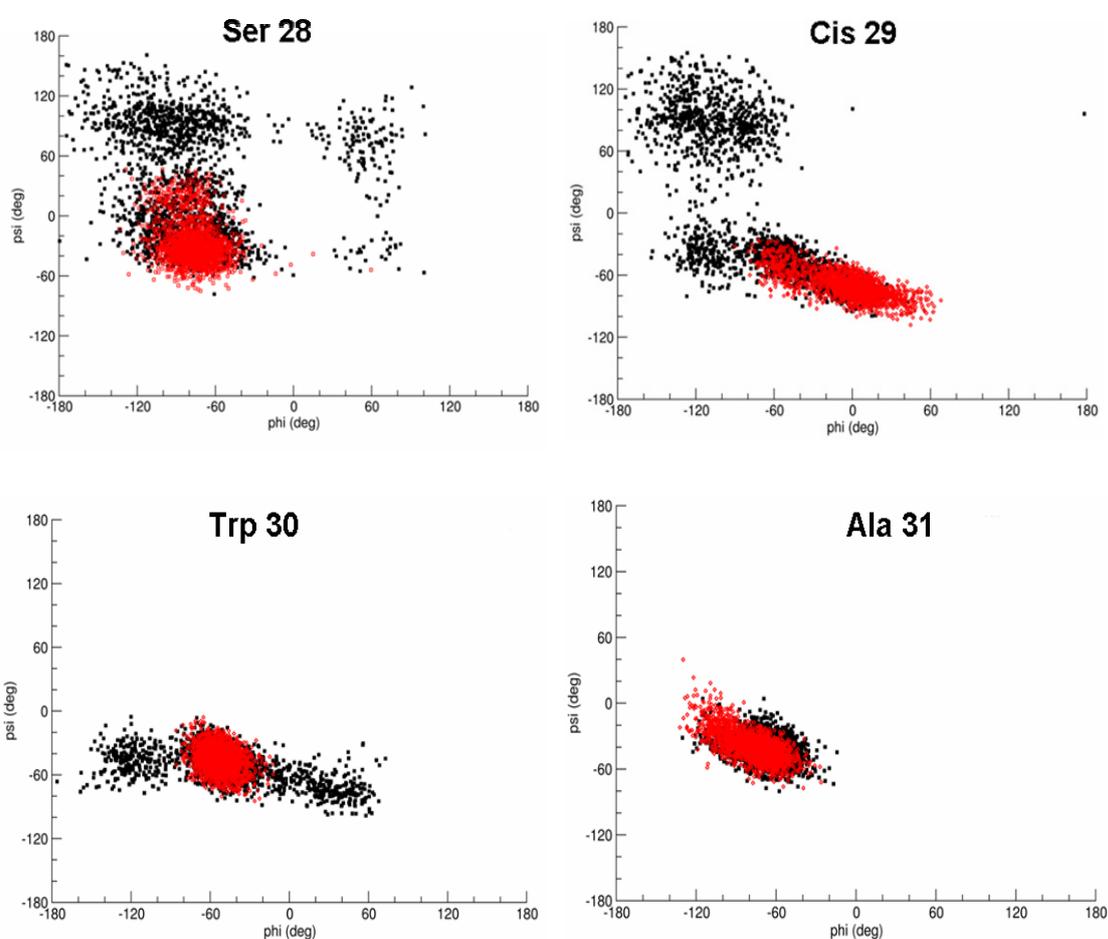


Figura 19: Gráficos phi x psi (Diagrama de Ramachandran) temporais para os primeiros resíduos da alfa hélice principal (Ser 28 – His 45). Em preto: catB / pH 8 ; em vermelho: catB / pH 8 + heparina.

Observando-se os mapas de Ramachandran temporais, claramente nota-se que nos três primeiros resíduos da hélice houve grandes diferenças entre os sistemas comparados. Enquanto com a enzima livre ocorre a perda do

padrão alfa-hélice de acordo com os mapas Φ e Ψ , no sistema com heparina os valores permaneceram na região referente a tal estruturação (figura 19). Apenas no quarto resíduo da hélice (Ala31) os diagramas se igualaram entre os dois sistemas mantendo-se nos resíduos seguintes (dados não mostrados). Este resultado confirma que a perda do contato acarreta na desestabilização da primeira volta da hélice (Ser28 – Ala31). Entretanto, o tempo de simulação utilizado não permite avaliar se o efeito se prolongaria por toda a estrutura ou realmente trata-se de uma desestabilização local.

Entre os principais achados a partir destas análises, vale destacar que as simulações de MD confirmaram a predição na qual a perda do contato Cis29 – His199 e a desestabilização da hélice em pH alcalino são eventos diretamente relacionados. Ademais, merece destaque o efeito de prevenção à perda tanto do contato quanto da estabilidade da hélice mediado por heparina, como já relatado experimentalmente (Almeida *et al*, 2001). Entretanto, na ocasião não foram especificadas as regiões onde tal mecanismo se daria de forma mais marcante.

Apesar de este trabalho não avaliar a interação da catepsina B com inibidores, pode-se sugerir que estes efeitos apresentados corroboram as observações experimentais da perda da atividade da enzima em condições alcalinas e o efeito protetor da heparina.

10.10 – Outros contatos da interface

Em seguida, foram verificados os demais contatos presentes na região inter-domínios. Como já relatado, a interface é majoritariamente polar e estabilizada principalmente por ligações hidrogênio e pontes salinas (Musil *et al*, 1991; Turk *et al*, 1994; Almeida *et al*, 2001). Comparou-se a prevalência (tempo percentual de existência) das ligações hidrogênio dos resíduos da interface durante a DM. A tabela 3 mostra tais resíduos e realça também se a ligação formada é entre cadeias laterais ou pelo esqueleto protéico.

| Prevalência (%) das ligações hidrogênio durante a DM | | | | | | |
|--|------------------|---------|----------|----------------|-------------|-------------------|
| Região | Interação | Tipo | catB/pH8 | catB/pH8 + hep | catB/pH 5.5 | catB/pH 5.5 + hep |
| Interface (Domínio L – Domínio R) | Trp 30 – Glu 171 | MC / SC | ---- | ---- | 87% | 85% |
| | Trp 80 - Glu 171 | SC / SC | 37% | 68% | 88% | 87% |
| | Asn 81 - Ser 150 | SC / SC | 6% | 62% | 48% | 55% |
| | Arg 41 - Pro 169 | SC / MC | 42% | 91% | 83% | 70% |
| | Gln 23 - Ser 220 | MC / MC | 6% | 29% | 65% | 82% |
| | | SC / SC | ---- | ---- | 96% | 90% |
| Glu 36 - Ser 220 | SC / SC | 38% | 72% | ---- | ---- | |
| alça | Asp22 - His 110 | SC / SC | 6% | 67% | 80% | 79% |

Tabela 3: Prevalência (tempo percentual de existência) das ligações hidrogênio durante a DM. Quanto ao tipo, há a discriminação entre as interações com átomos da cadeia principal (MC) e também às que envolvem as cadeias laterais (SC).

Inicialmente foram inspecionados contatos na interface já relatados experimentalmente. Na tabela 3 é mostrado que para a interação Trp30 – Glu171 o efeito do pH é determinante, já que a ligação hidrogênio apenas ocorre em condições ácidas. Tal fato pode ser explicado devido à presença do próton na carboxila de Glu171 apenas em pH ácido (ver análise de protonação – figura 8).

A interação entre Trp80 (domínio L) e Glu 171 (domínio R) é apontada como crucial na manutenção da estabilidade da interface devido a uma ligação hidrogênio entre NE1 (doador) presente no anel do triptofano e a carboxila do ácido glutâmico (aceitador). Observou-se que em pH 5,5 as prevalências foram mais altas (em torno de 87%) sendo independente a interação com heparina. Já em pH alcalino, a complexação com o GAG acarretou no aumento da prevalência de 37% para 68%, sendo mais um indicativo da importância da interação catepsina B e heparina na estabilização da enzima. Verificou-se também a distância entre os centros de massa destes resíduos durante a simulação (figura 20).

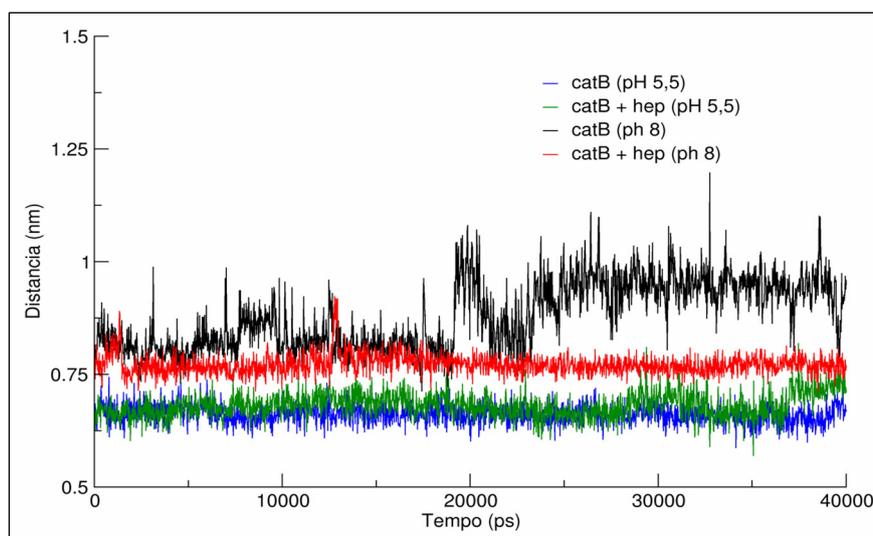


Figura 20: Acompanhamento da distância entre os centros de massa do triptofano 80 (Domínio L) e o glutamato 171 (Domínio R). Ambos resíduos pertencem à interface interdomínios.

Conforme mostrado na figura 20, as distâncias entre os resíduos em pH ácido (em azul e verde) flutuaram em torno de 0,7nm, sendo desprezível a interferência da interação com heparina neste pH no que concerne este contato. Já em pH alcalino (preto e vermelho) observou-se que a interação com heparina (em vermelho) tem grande influência na manutenção da proximidade dos resíduos em torno de 0,8 nm durante toda a simulação. No sistema sem heparina (em preto) as distâncias chegaram até 1 nm após metade da simulação.

A influência do pH nesta interação pode ser explicada pela protonação de Glu171 apenas em pH ácido, o que facilita o correto posicionamento da carboxila para tanto interagir doando o próton para Trp30 quanto funcionar como aceptor do próton doado por Trp 80 (figura 9). Este dado está em acordo com outros autores que sugeriram um papel central da protonação de Glu 171 na estabilização da interface (Musil *et al*, 1991; Turk *et al*, 1994).

Em condições alcalinas, notou-se aumento da prevalência da ligação hidrogênio (37% → 68%) ao se comparar o sistema da enzima livre com o complexo catB – heparina. A maior proximidade entre os resíduos neste último sistema parece ser consequência direta da maior estabilidade da ligação hidrogênio. O papel da estabilização mediada por heparina neste caso parece ser devido ao favorecimento de outras interações que de forma global

permitem maior proximidade e possibilidade do estabelecimento de contatos entre os átomos da interface, tornando-a mais resistente aos efeitos do pH.

A interação entre a glutamina (Gln23) e a serina (Ser220) apresentou um padrão diferenciado de ligações hidrogênio. Em condições ácidas foram observadas duas interações deste tipo entre os dois resíduos, uma entre as cadeias principais e a outra envolvendo as cadeias laterais dos mesmos. Em contrapartida, nas simulações em pH alcalino apenas observou-se a interação entre os esqueletos protéicos.

Comparando-se as prevalências das ligações hidrogênio envolvendo os átomos da cadeia principal, observou-se que em pH ácido os valores observados foram significativamente mais altos (65% enzima livre / 82% complexo) do que os valores em condições alcalinas (6% enzima livre / 29% complexo). Ressalta-se que em condições alcalinas apenas na presença de heparina houve a formação por um tempo significativo da interação, caracterizando a perda do contato nesta condição sem o GAG.

Já a interação entre as cadeias laterais dos resíduos, a qual ocorre apenas em pH ácido, teve prevalências em torno de 90%, o que juntamente com a ligação hidrogênio entre os esqueletos protéicos caracteriza nestes resíduos um contato de grande importância na estabilização da interface.

Entretanto, em pH alcalino, notou-se uma interação que não ocorre em pH ácido: Glu36 – Ser220. Nesta interação, a carboxila (desprotonada nesta condição de pH) pode funcionar como acceptor do próton doado pela serina 220. Em condições ácidas, o oxigênio da cadeia lateral da glutamina exercia este papel de acceptor. Vale destacar que a prevalência da interação no complexo catB/pH 8 + heparina (72%) foi aproximadamente o dobro do sistema com a enzima livre (38%).

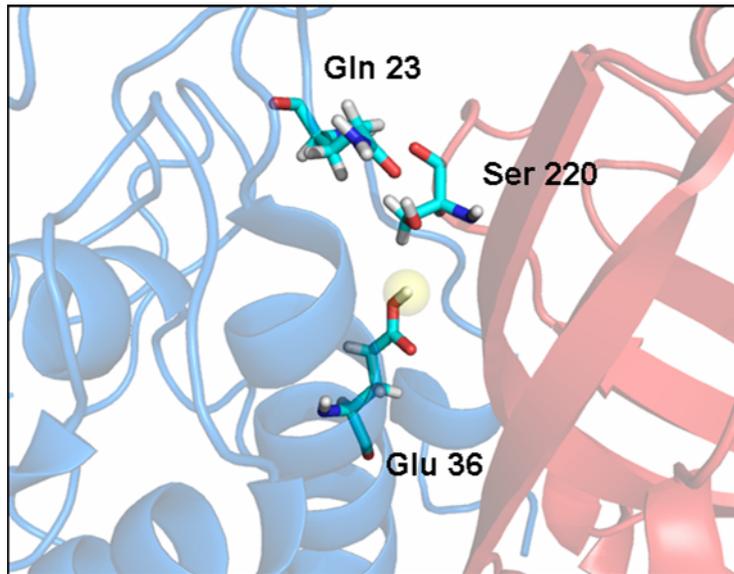


Figura 21: Disposição tridimensional do arranjo de interações entre Gln 23, Ser 220 e Glu 36. Em azul: domínio L; em vermelho: domínio R. Na figura está representada a condição de pH igual a 5,5, na qual ocorre a protonação da carboxila de Glu 36 (na esfera amarela), o qual perde a capacidade de aceitar o próton doado por Ser 220. Em pH alcalino a carboxila desprotonada realiza interações iônicas e a ligação hidrogênio com a serina.

Portanto, a mudança do pH ácido para alcalino, responsável pela desprotonação de Glu36, acarretou em um rearranjo local das ligações hidrogênio na interface. Este efeito foi previamente hipotetizado e na ocasião os autores não dispunham de subsídios para compreender a importância do resíduo Glu 36 na interface (Turk et al, 1994). Os resultados obtidos permitiram a visualização deste rearranjo e mostraram também que a interação com heparina acarreta em maior número e também em ligações mais fortes entre os resíduos da interface.

Entre as demais ligações hidrogênio inter-domínios, destaca-se que a interação Asn81 – Ser150 teve prevalência em torno de 50% em pH ácido independente da interação com heparina. Já na condição alcalina, sem o GAG, a prevalência ficou em torno de 6%. Na simulação do complexo obteve-se o maior valor de prevalência chegando a 62%. Finalmente, na interação Arg41 – Pro169 observou-se o mesmo padrão do contato Asn81 – Ser150.

De forma geral, tais mudanças no padrão de contatos em diferentes pH podem ser explicadas por dois fatores: (1) a mudança na capacidade dos resíduos diferencialmente protonados em formar ligações hidrogênio e pares

iônicos. (2) decorrente das diferentes disposições das cargas, fato este que tem influência direta na estabilidade da interface polar. A influência da heparina se mostra de forma clara no pH alcalino, já que a interação com o GAG possibilitou interações mais prevalentes entre os domínios. Entretanto, este efeito parece decorrer de um processo global de estabilização, já que a heparina interage com um sítio distante da interface.

10.11 – Dinâmica da alça de oclusão

A região da alça de oclusão é determinante para a atividade e estabilidade da catepsina B. Dessa forma, realizaram-se análises dos contatos responsáveis pela estabilidade da região e foram checados os movimentos estatisticamente mais relevantes da região e da enzima através da análise de dinâmica essencial.

Relembrando que a hipótese mais aceita atualmente sobre a funcionalidade do loop é de que em pH ácido ele estaria estável e, portanto, fechado. Dessa forma a atividade favorecida seria a exo-proteolítica, devido à boa acomodação de substratos carboxi-terminal na região das histidinas 110 e 111 presentes na região (Illy *et al*, 1997; Nagler *et al*, 1997). Por outro lado, em pH alcalino a alça estaria desestabilizada e, portanto aberto, favorecendo então a entrada de substratos maiores para atividade endo-peptidase. Logo, analisou-se o contato aspartato (Asp) 22 e His110 que é descrito na literatura como fundamental na regulação do mecanismo de abertura/fechamento da alça (Krupa *et al*, 2002; Almeida *et al*, 2001). A figura 22 mostra a evolução das distâncias entre os resíduos.

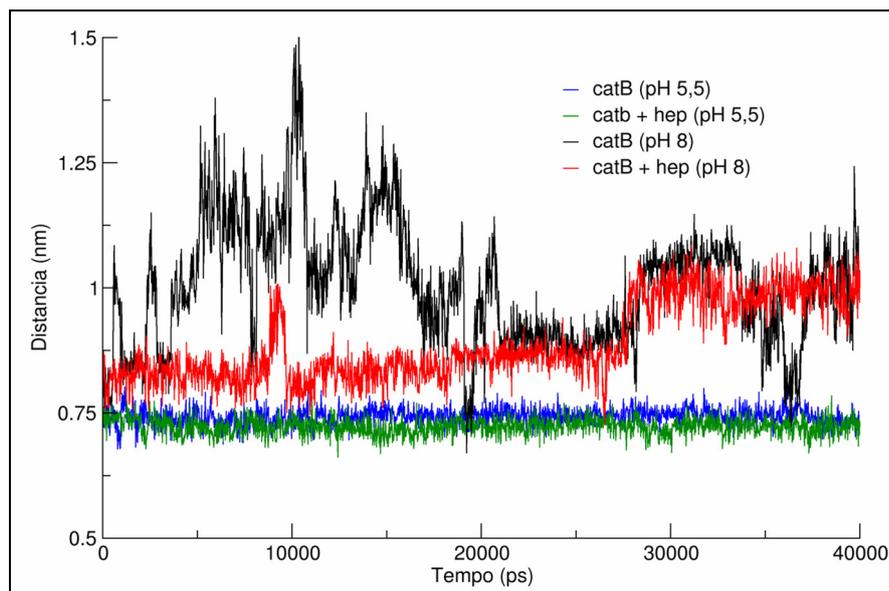


Figura 22: Evolução temporal da distância entre Asp 22 e His 110. Nota-se que no sistema catB/ pH 8 há completa desestabilização da interação, que se revelou mais estável no complexo com heparina (em vermelho). Porém a maior proximidade se dá apenas em condições ácidas (azul e verde).

A análise do gráfico aponta claramente a completa desestabilização da interação entre os resíduos no sistema em pH alcalino sem heparina (preto). Além das altas flutuações das distâncias observadas (chegando até 1.5 nm), a prevalência da ligação hidrogênio entre os resíduos foi desprezível atingindo apenas aproximadamente 5%. No sistema com heparina nas mesmas condições de pH observou-se menor flutuação das distâncias e uma maior proximidade dos resíduos (em torno de 1nm). A prevalência da ligação hidrogênio também aumentou para aproximadamente 42%.

Já na condição de pH ácido observou-se um comportamento ainda mais estável, já que nos dois sistemas simulados (verde e azul) as distâncias foram as menores observadas (0.75nm). Além disso, a prevalência da ligação hidrogênio foi significativamente maior do que nos sistemas em pH alcalino ficando em torno de 70%.

Este efeito pode ser explicado pela protonação da histidina 110 apenas em pH ácido, o que favoreceria a correta orientação deste resíduo para estabelecer a ligação hidrogênio com o aspártico 22. Destaca-se também que a adição de heparina teve efeito notável apenas na condição alcalina, onde se

obteve maior estabilidade do contato e maior prevalência da ligação hidrogênio do que no sistema livre do ligante.

É importante lembrar que em pH ácido há o favorecimento do contato Gln23 – Ser220, estando o primeiro resíduo na adjacência do aspártico 22, o qual é fundamental na estabilização da alça. Ademais, observou-se que, em pH alcalino, no complexo com heparina obtiveram-se, de forma geral, prevalências das ligações hidrogênio consideravelmente mais altas do que no sistema com a enzima livre. Dessa forma, a estabilização da interface tanto localmente (na região de Asp22) quanto globalmente possibilita que os resíduos da alça de oclusão estabeleçam melhores interações.

10.12 – Amplitude dos movimentos da alça de oclusão

Foram sobrepostas as estruturas coletadas da DM para checagem da amplitude dos movimentos da alça de oclusão nos sistemas em pH alcalino para avaliar se a ligação à heparina tem alguma influência na região. É esperado que a região de alça tenha altas flutuações durante a simulação, contudo a comparação entre as flutuações de cada sistema é importante para que se compreenda melhor a relação entre flexibilidade observada e a atividade relatada nos ensaios bioquímicos.

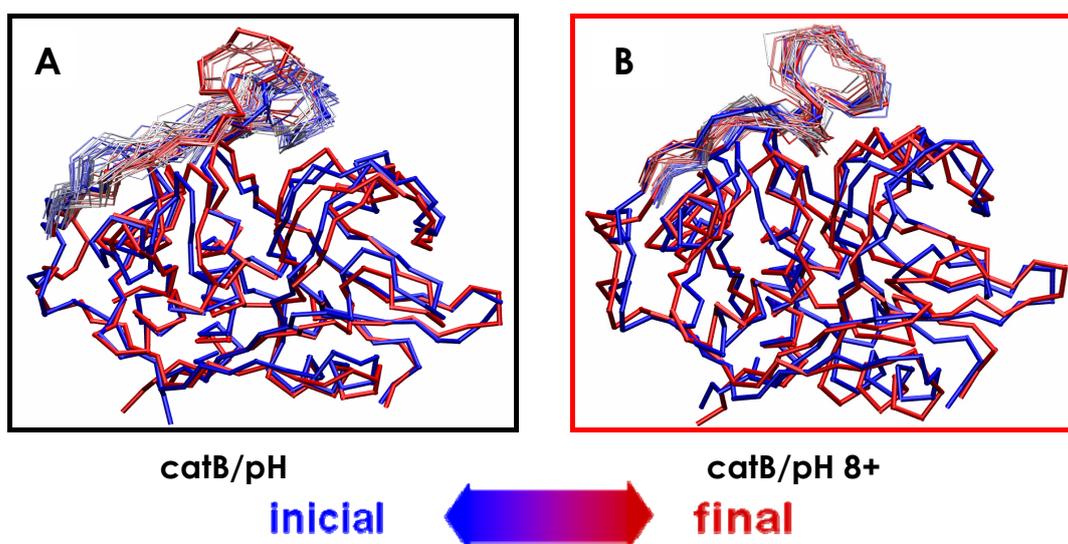


Figura 23: Sobreposição das estruturas durante as simulações em condições alcalinas. (A) enzima livre; (B) complexo catB – heparina.

Ao observar a figura 23, claramente nota-se que a flexibilidade da alça no sistema livre de heparina foi consideravelmente maior do que a observada no complexo catB – hep. Como há uma relação clara entre o tipo de atividade da enzima (exo ou endo peptidase) e a flexibilidade da alça, pode-se afirmar que a heparina tem influência direta na atividade já que a interação com o GAG modula de alguma forma os movimentos da alça, mantendo-a um pouco mais aberta, porém estável. Logo, há certo comprometimento da atividade exo-proteolítica sem perda da atividade endo-proteolítica, já que as análises mostraram estabilidade do sítio ativo no complexo catB – heparina (figura 17). Em contrapartida, no sistema sem heparina em pH alcalino a atividade da enzima é perdida tanto pelo afastamento dos resíduos catalíticos quanto pela flexibilidade exacerbada da alça.

10.13 – Dinâmica essencial da catepsina B

Como descrito na seção metodologia, utilizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) para a determinação dos movimentos estatisticamente mais relevantes da catepsina B durante as simulações. A partir desta análise foi possível a separação e ordenação dos componentes de movimento (PC) que aditivamente representam a dinâmica da enzima. Analisaram-se profundamente os sistemas em pH alcalino visando entender se a interação com heparina tem efeito na movimentação da enzima nesta condição desfavorável de pH. A tabela 4 mostra a porcentagem cumulativa da dinâmica total da enzima fornecida pelos componentes de maiores amplitudes.

| Componente (PC) | Porcentagem cumulativa dos primeiros componentes de movimento | | | |
|-----------------|---|------------|-----------------|------------|
| | catB / pH8 | | catB/ pH8 + hep | |
| | percentual | cumulativo | percentual | cumulativo |
| 1 | 23,30% | 23,30% | 19,20% | 19,20% |
| 2 | 15,20% | 38,50% | 12% | 31,20% |
| 3 | 6,90% | 45,40% | 6% | 37,20% |
| 4 | 6,40% | 51,80% | 4,60% | 41,80% |
| 5 | 5,70% | 57,50% | 4,30% | 46,10% |
| 6 | 3,10% | 60,60% | 3,10% | 49,20% |
| 10 | 1,40% | 68,80% | 1,90% | 59% |
| 20 | 0,70% | 79,80% | 0,85% | 71,30% |

Tabela 4: Porcentagem dos movimentos totais da enzima obtidos pela análise dos primeiros componentes (PC) nos sistemas em pH alcalino.

Ao observar a tabela 4, pode-se facilmente notar que os primeiros componentes de movimento representam a maior parte da dinâmica da catepsina B em ambos os sistemas. No entanto observa-se também que os movimentos principais no sistema com heparina foram mais restritos em comparação à simulação com a enzima livre. O gráfico abaixo representa os dados da tabela 4 mostrando a percentagem cumulativa a todos os componentes de movimento (figura 24).

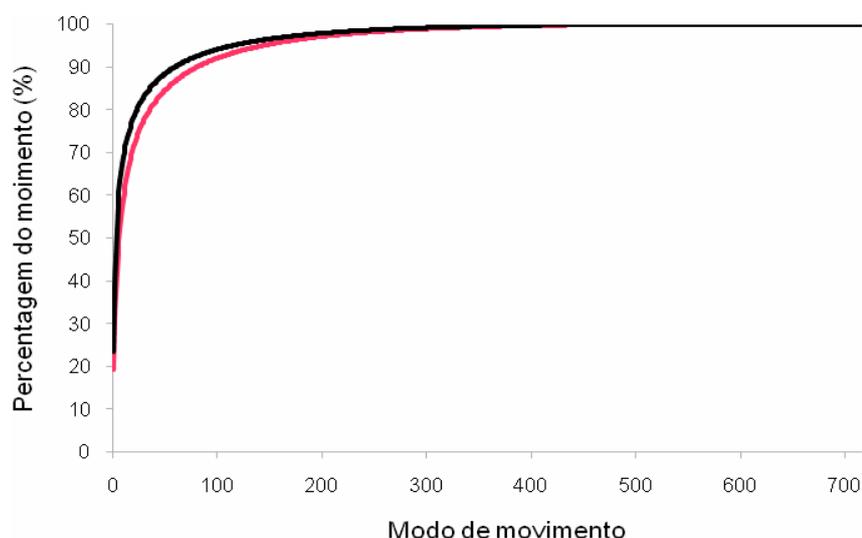


Figura 24: Percentagem cumulativa do movimento da catepsina B acumulada ao longo dos PCs. Em preto: catB/pH8 ; em vermelho : catB/pH8 + heparina.

É dado bem conhecido na literatura que movimentos de maior amplitude (mais baixa frequência) de proteínas estão geralmente associados à funções biológicas (Amadei *et al*, 1993). Dessa forma um procedimento de análise utilizado frequentemente é a análise das flutuações atômicas sobre as trajetórias geradas pelos primeiros componentes principais. O gráfico mostrado a seguir é a comparação entre a flutuação por resíduo (RMSF) em cada sistema sobre as trajetórias geradas pelos cinco primeiros modos de movimento (figura 25).

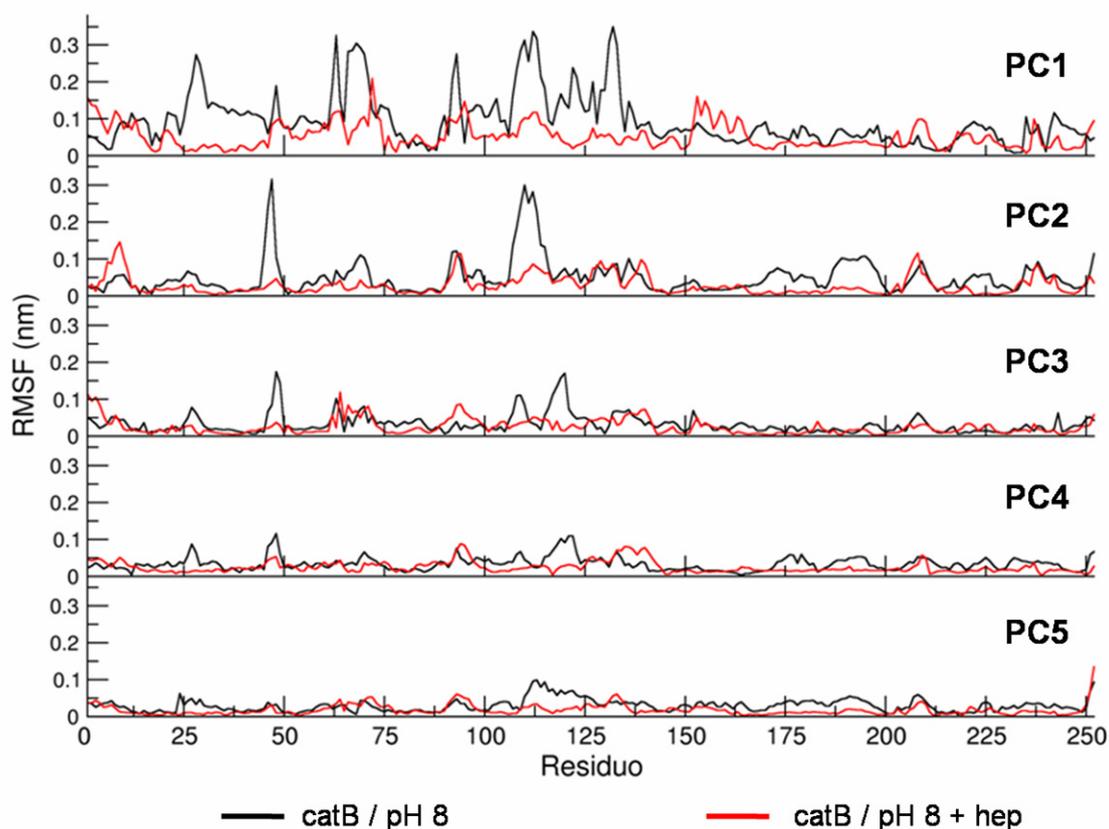


Figura 25: Desvio médio por resíduo (RMSF) obtido a partir da projeção das trajetórias nos cinco primeiros componentes principais do movimento (PC 1-5).

Atentando para a igualdade das escalas dos diferentes gráficos, claramente nota-se que as amplitudes dos movimentos do primeiro e segundo componentes são consideravelmente maiores que a dos restantes. Lembrando que estes componentes representam somados aproximadamente 40% (enzima livre) e 32% (enzima + heparina) dos movimentos totais da proteína, identificaram-se primeiramente regiões de interesse nos dois primeiros gráficos.

Observando-se o primeiro gráfico, claramente puderam-se notar diferenças consideráveis nos desvios na região do resíduo catalítico Cis 29. Enquanto no sistema com heparina as flutuações foram baixas, notaram-se altos desvios nesta região na simulação da enzima livre. Tal dado foi analisado criteriosamente para a identificação precisa da direção do movimento deste resíduo catalítico (figura 26).

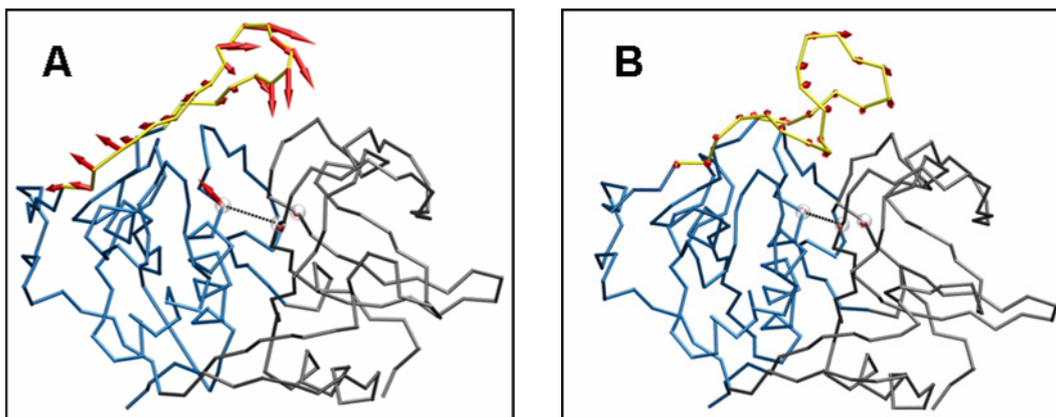


Figura 26: Representação dos movimentos principais extraídos a partir do primeiro componente (PC1). (A) catB / pH 8 ; (B) catB / pH 8 + hep. Os sentidos e o comprimento das setas relacionam-se com os sentidos e amplitudes respectivamente. Mostraram-se apenas os movimentos da alça de oclusão e dos resíduos catalíticos (esferas brancas).

Como mostrado, a cisteína 29 afasta-se consideravelmente dos outros resíduos catalíticos. Ressalta-se também que a análise do gráfico permite a observação que os movimentos de maiores frequências se deram na região do domínio L (resíduos 11-148 e os últimos quatro resíduos). Dessa forma, pode-se sugerir que a perda da eficiência catalítica da enzima se origina de um movimento coletivo onde a movimentação dos domínios, principalmente a região esquerda (onde se encontram Cis29 e a alça de oclusão) determina o afastamento dos resíduos.

Outra região com diferenciado padrão de flutuações observadas no PC1 foi a região da alça de oclusão. Como mostrado na figura 26, o primeiro componente do movimento descreve, no sistema livre de heparina, o afastamento do sítio ativo e a abertura/fechamento da alça de oclusão. Curiosamente tais movimentos parecem estar correlacionados, já que a abertura da alça é concomitante à aproximação dos resíduos catalíticos. Da mesma forma, quando fechada, tais resíduos encontram-se afastados.

Já no sistema com heparina, observam-se movimentos de menor amplitude tanto da alça de oclusão quanto dos resíduos catalíticos, sendo neste último caso observa-se uma ligeira aproximação dos mesmos.

Uma terceira região com diferenciadas flutuações nos sistemas ao longo do PC1 foi a que se estende do Cis62 até Gli74, a qual constitui um segmento

de conexão entre duas hélices do domínio L. Como visto na figura 25 as flutuações do sistema com heparina foram consideravelmente menores, o que é mais um indicativo da restrição de movimentos propiciada pela interação com o GAG.

Analisando-se os desvios fornecidos pelos componentes seguintes, destaca-se que no PC2 notaram-se diferenças com respeito à movimentação da alça de oclusão. Mais uma vez a interação com heparina restringiu os movimentos da região, comportamento não observado na enzima livre. Neste último sistema observou-se a movimentação de abertura/fechamento, porém nesse caso sem aparente ligação com os movimentos do sítio ativo tal como mostrado para o primeiro modo.

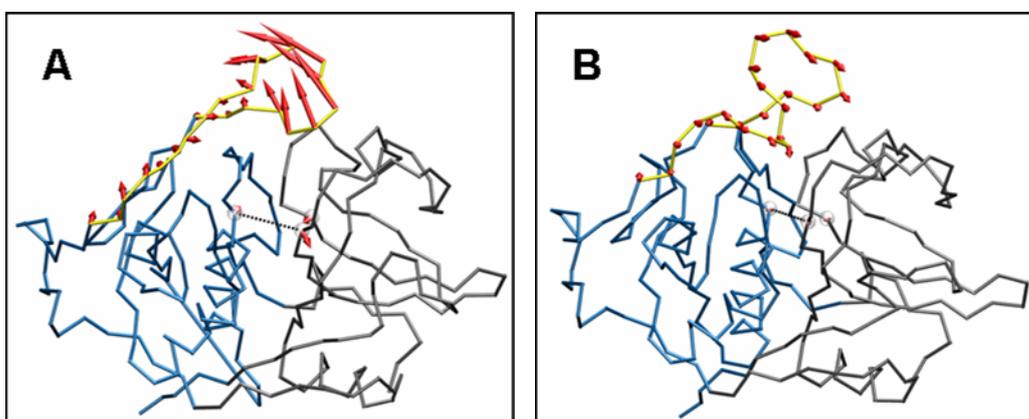


Figura 27: Representação dos movimentos referentes ao segundo componente principal (PC2). (A) catB / pH 8; (B) catB / pH 8 + hep. . Os sentidos e o comprimento das setas relacionam-se com os sentidos e amplitudes respectivamente. Mostraram-se apenas os movimentos da alça de oclusão e dos resíduos catalíticos (esferas brancas).

Ao inspecionar as flutuações do PC3 e PC4 notaram-se desvios na região da cisteína 29 no sistema catB/pH 8. Conforme obtido no PC1, observou-se afastamento deste resíduo, presente no domínio L, em relação aos outros catalíticos (His 199 e Asn219) localizados no domínio R. Apesar de os movimentos oriundos destes modos apresentarem menor amplitude, os mesmos contribuem juntos com aproximadamente 10% da movimentação total da proteína. Dessa forma, esta contribuição de forma aditiva reforça a observação de que o afastamento dos resíduos, apontado anteriormente pelas análises da DM, constitui um movimento de grande relevância estatística.

A comparação destes movimentos nos dois sistemas é fundamental pelo fato dos mesmos mostrarem diferenças consideráveis na dinâmica de regiões importantes biologicamente da proteína. Estes movimentos de baixa frequência por ocorrerem em escalas de tempo maiores sugerem que a estabilidade da alça e do sítio ativo se manteriam até mesmo em simulações de DM maiores. Logo, os resultados sugerem que a interação com heparina altera significativamente os movimentos do sítio ativo e da alça tornando tais regiões mais estáveis e, portanto menos suscetíveis à desestabilização induzida pelo pH.

11 – Conclusões parciais

Atualmente é bem claro o conceito de que as funções biológicas das cisteíno catepsinas vão além da degradação final de proteínas nos lisossomos. A catepsina B, a enzima mais estudada desta classe, é reconhecidamente um personagem fundamental no desenvolvimento de tumores metastáticos. Entretanto, o papel exato da catepsina B nos processos tumorais ainda não é totalmente compreendido.

Dada a complexidade dos processos tumorais e metastáticos, é esperado que a participação da catepsina B no câncer se dê em diversas etapas, estando a enzima inserida em uma grande variedade de mecanismos regulatórios (Joyce & Hannaham, 2004). Contudo, três funções primordiais dessa enzima no câncer são bem claras: (1) na proteólise de componentes da matriz extracelular criando caminhos para a migração de células tumorais; (2) na ativação de outras enzimas proteolíticas e (3) na participação no processo angiogênico tumoral, seja ativando fatores, ou pela abertura de espaços para o crescimento dos novos vasos (Joyce & Hannaham, 2004; Gocheva & Joyce, 2007).

Dessa forma, a catepsina B revela-se um promissor alvo farmacológico na tentativa do controle de tumores metastáticos. Porém, a enzima tem seu comportamento fortemente regulado pelo pH do meio (Illy et al, 1997; Almeida et al, 2001). Somado a este fato, acrescenta-se que a catepsina B promove sua ação proteolítica em diversos ambientes (intracelular, extracelular, ancorada na membrana) (Mohamed & Sloane, 2006). Dessa forma, postula-se que as funções da enzima são dependentes da localização da mesma, o que acarreta uma grande dificuldade na elaboração de inibidores eficazes para a enzima.

A atividade da catepsina B é modulada a partir da interação com glicosaminoglicanos de heparan sulfato, para os quais é atribuída a capacidade de estabilizar a enzima em pH alcalino (Almeida et al, 2001). É plausível afirmar então que na busca de novos inibidores para a enzima seja necessário o entendimento dos efeitos tanto do pH quanto da interação com glicosaminoglicanos no comportamento dinâmico da enzima.

A biologia estrutural dispõe de diversas ferramentas no processo de busca de inibidores, sendo uma metodologia eficaz o acoplamento de dados estruturais experimentais com análises teóricas da dinâmica das moléculas envolvidas. Para tal, neste trabalho utilizou-se a dinâmica molecular na avaliação do comportamento de complexos entre a catepsina B e a heparina, obtidos por ancoramento molecular, em diferentes condições de pH. Ressalta-se que pela dificuldade da representação do efeito do pH em uma simulação de DM, utilizaram-se os estados de protonação mais prováveis calculados nas condições ácida e alcalina.

Primariamente, as análises do pK_a dos resíduos da catepsina B nas diferentes condições revelaram a protonação diferencial de seis resíduos, influenciando em uma considerável mudança da carga líquida da proteína. Este resultado tem grande importância já que se altera a capacidade de formação de ligações hidrogênio dos resíduos envolvidos. Como exemplo deste caso há o ácido glutâmico (Glu) que protonado pode funcionar como doador ou receptor de próton, porém na forma desprotonada (glutamato), este resíduo funciona apenas como receptor. Além disso, se altera também o padrão de interações por pares iônicos, devido à alteração da carga líquida dos resíduos envolvidos.

Entre os resíduos diferencialmente protonados destaca-se que alguns como His199 e His110 são fundamentais na atividade da enzima e suas protonações apenas em pH ácido foram sugeridas experimentalmente (Musil et al, 1991; Song et al, 2000; Almeida *et al*, 2001). Além disso, o pK_a predito para a cisteína 29 apresentou-se em acordo com o relatado para a papaína (Pinitglang et al, 1997). Ademais, Glu171 presente na interface dos domínios da enzima já foi apontado como crucial na estabilização (Musil *et al*, 1991; Turk et al, 1994).

Estas mudanças na protonação resultaram em mudanças significativas da superfície eletrostática da proteína. O aumento dos sítios positivos e o caráter menos negativo do potencial eletrostático na superfície da catepsina B foram revelados nesta análise. Como esperado, os complexos com heparina se deram com o GAG interagindo com um dos sítios positivos, devido à presença de grupamentos sulfato na molécula de heparina. Entretanto, as análises

revelaram que não apenas o componente eletrostático governa a interação, destacando a importância do componente de Van der Waals na interação entre a enzima e o GAG.

As simulações de DM revelaram claramente que, como esperado, a enzima tem comportamento estável na condição de pH ácido, independentemente da interação com heparina. Já em condições alcalinas as simulações confirmaram os dados bioquímicos experimentais e revelaram que apenas ao interagir com heparina a enzima tem comportamento estável durante a simulação (figura 12 - 15). A análise da flutuação por resíduo revelou que a região da alfa hélice principal e a alça de oclusão flutuaram de forma marcante no sistema em pH alcalino sem heparina. Em todos os outros sistemas tais regiões se mostraram mais estáveis.

Enquanto a alfa hélice principal, que se encontra na interface interdomínios tem papel estrutural importante na manutenção da estabilidade do sítio ativo, a alça de oclusão é fundamental para atividade exo-proteolítica da enzima. A desestabilização destas estruturas está em acordo com previsões a partir de dados cristalográficos e também de ensaios bioquímicos de atividade (Musil *et al*, 1991; Turk *et al*, 1994; Illy *et al*, 1997).

Uma vantagem da abordagem computacional em escala atômico-molecular é a possibilidade da identificação exata do mecanismo de desestabilização da enzima na condição alcalina. Dessa forma, analisou-se o comportamento dos domínios da catepsina B durante a simulação. Claramente notou-se que apenas na condição alcalina sem heparina (em preto) houve afastamento dos domínios. Uma consequência deste afastamento é a perda da atividade devido ao afastamento dos resíduos catalíticos presentes.

Os resultados obtidos seguiram o mesmo padrão observado na avaliação da distância entre os domínios. Dessa forma, a partir de dados da DM pôde-se entender um dos motivos da perda de atividade da enzima em pH alcalino: o afastamento dos resíduos catalíticos. Relembrando que em pH alcalino há a perda de um próton na histidina 199, as análises confirmaram que este fato é determinante na desestabilização da ponte salina constituindo um fator importante na estabilização da interface (Turk *et al*, 1994; Song *et al*,

2000). Porém, na presença de heparina, a proximidade entre os resíduos se mantém mesmo em pH alcalino, fato este que pode ser um dos fatores que explicam a prevenção da perda de atividade da enzima mediada pelo GAG.

A perda do contato Cis 29 – His 199 acarreta na desestabilização local da alfa hélice principal da proteína. Analisou-se tal efeito a partir do mapeamento temporal dos ângulos da cadeia principal (figura 19). Os resultados mostraram que o efeito se estende por toda a primeira volta da hélice (Ser 28 – Trp 30). Dessa forma, confirma-se a hipótese experimental de que a desestabilização do sítio ativo implicaria na perda da estrutura da alfa hélice principal (Turk et al, 1994).

Além das análises do comportamento do sítio ativo, verificaram-se também a estabilidade de outros contatos da interface inter-domínios (tabela 3). De forma geral, os resultados mostraram que em pH ácido há maior formação de ligações hidrogênio. Como já discutido, ocorreu uma mudança na potencialidade de formação de ligações hidrogênio e pontes salinas devido ao fato de seis resíduos apresentarem-se nas formas protonadas em pH 5,5 em comparação ao pH 8. Além disso, os efeitos repulsivos na interface diminuem com a diminuição da carga líquida geral da proteína.

Outro dado relevante extraído da análise de ligações hidrogênio foi o rearranjo de interações ocorrido em pH alcalino. Comparando-se os sistemas da enzima livre com o complexo catB – hep, observaram-se prevalências das ligações hidrogênio consideravelmente maiores na presença do açúcar. Apesar do sítio de interação com a heparina ser distante da interface, a manutenção da proximidade dos domínios favorece a formação de contatos mais intensos. Dessa forma, pode-se explicar os efeitos de estabilização local, induzidos pelo GAG, a partir da estabilização global da proteína.

Analisou-se também a dinâmica da alça de oclusão, região de fundamental importância na atividade da cathepsina B. Os resultados obtidos nas condições ácidas confirmaram previsões experimentais onde esta estrutura estaria estável e, portanto apto a acomodar satisfatoriamente substratos pequenos (Illy *et al*, 1997; Nagler *et al*, 1997).

A análise do comportamento do contato His 110-Asp 22, postulado como fundamental na estabilidade da alça, apontou que em condição alcalina sem heparina há perda da ligação hidrogênio entre os resíduos e um aumento considerável da distancia entre os resíduos. Já no complexo com heparina, observa-se uma estabilidade parcial do contato e, por conseguinte da alça de oclusão. A análise da amplitude dos movimentos revelou que a desestruturação é prevenida com a adição de heparina. Contudo, a estabilidade só foi alcançada na condição ácida e pode ser atribuída (1) à protonação de His 110 nessa condição, possibilitando a correta orientação do resíduo para interação com Asp 22; (2) a estabilização do contato Gln 23 – Ser 220 apenas na condição ácida, mantendo a região estável.

Finalmente, as análises de dinâmica essencial possibilitaram a identificação dos movimentos de maiores amplitudes e estatisticamente mais relevantes. O afastamento dos resíduos do sítio ativo na condição alcalina foi mostrado como um dos movimentos principais identificados no primeiro componente de movimento (PC1), o qual corresponde aos movimentos de maior relevância. Este movimento se repetiu no terceiro e quarto componentes (PC3 e PC4). A interação com heparina mostrou-se capaz de prevenir completamente este afastamento, justificando então a manutenção da atividade da enzima mesmo em condições alcalinas.

Outros movimentos de grande importância observados foram a abertura e fechamento da alça de oclusão. No primeiro e segundo componentes, este movimento apareceu de forma clara no sistema da enzima livre. Já na simulação com heparina, observou-se clara redução da amplitude do mesmo. Dessa forma, pode-se sugerir que a interação com heparina restringe os movimentos de grande amplitude da catepsina B, os quais no sistema da enzima livre caracterizaram a desestabilização dos domínios e a flexibilidade da alça de oclusão.

Dessa forma, as análises possibilitaram a identificação clara de que a perda da atividade da enzima em pH alcalino está diretamente relacionada à perda de contatos na interface inter-domínios. Como os resíduos catalíticos localizam-se nessa região, o afastamento geral dos domínios e a

desestabilização da hélice principal geraria uma perda completa da eficiência catalítica. A interação com heparina estabilizaria a enzima devido à um efeito global: a restrição dos movimentos de grande amplitude dos domínios. Logo, favorece-se a manutenção e o rearranjo de contatos na interface, os quais são perdidos no sistema sem heparina.

Logo, os resultados mostraram a boa calibração das análises estruturais, sobretudo o cálculo de pK_a e da DM em representar corretamente dados experimentais. Possibilitou-se então o entendimento do mecanismo de desestabilização da catepsina B a partir dos movimentos da enzima durante as simulações, resultados estes inalcançáveis a partir de experimentos de Difração de Raios X. O acoplamento de ancoramento molecular/DM é de fundamental importância na aplicação prática do trinômio estrutura-função-movimento, possibilitando análises que revelaram detalhes importantes sobre a dinâmica da catepsina B e sua variada flexibilidade intrínseca em diferentes condições. Em futuros trabalhos com inibidores, tais dados serão valiosos para que se obtenham melhores resultados do que os já relatados na literatura.

Capítulo 2: Interação entre diferentes formas da endostatina e heparina: um novo modelo de interação.

1 – A antiangiogênese e a endostatina

Devido à importância da angiogênese para o estabelecimento dos tumores sólidos, diversos grupos de pesquisa vêm se empenhando em estudar uma estratégia de combate aos tumores visando inibir o processo angiogênico promovida pelos mesmos. Dessa forma surgiu então a estratégia antiangiogênica que se destaca pelo ataque indireto ao tumor. Esta abordagem apresenta-se como uma alternativa complementar aos tratamentos convencionais que são largamente utilizados.

A principal vantagem da antiangiogênese é justamente o alvo celular visado: as células endoteliais constituintes dos vasos. O fato de serem células normais, logo geneticamente estáveis, as taxa de mutações observadas são consideravelmente mais baixas que as das células tumorais. Logo, torna-se mais fácil se desenvolver uma terapia voltada para este tipo celular, em comparação ao se focar nas populações tumorais heterogêneas (Folkman, 2006).

Em 1997 foi descoberta a proteína endostatina (O'Reily *et al*, 1997), apontada na época da descoberta como a possível cura do câncer. Os primeiros experimentos utilizando a proteína como fator antiangiogênico em modelos de tumores em camundongos apresentaram resultados impressionantes, visto a capacidade da proteína de reverter alguns tipos de tumores e mantê-los em estado dormente (O'Reily *et al*, 1997; figura 28).

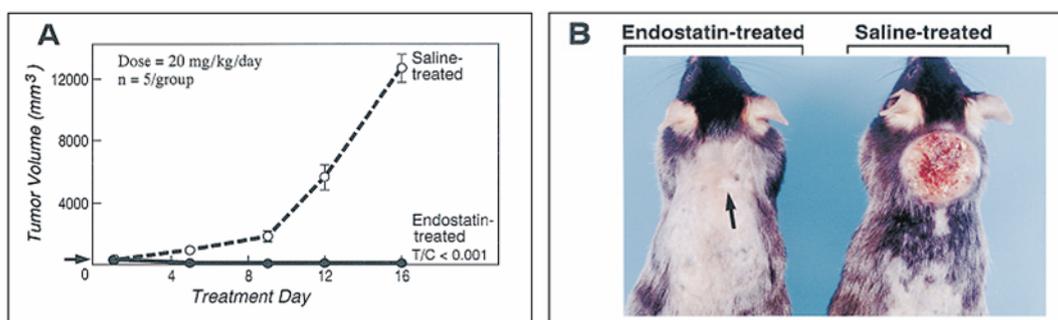


Figura 28. Resultados dos primeiros experimentos utilizando a endostatina, mostrando reversão do tumor (O'Reily *et al*, 1997) (A). É mostrado que o tratamento com a proteína é capaz de manter o tumor em volumes microscópicos (B).

Outro trabalho publicado no mesmo ano analisou a capacidade de o tratamento cíclico com endostatina reverter alguns tipos de tumores agressivos e resistentes a tratamento por terapias convencionais. Observou-se que o tratamento com endostatina além de reduzir o volume tumoral, era capaz de manter os diversos tipos de tumores dormentes após determinado número de ciclos. Portanto, o tratamento com endostatina mostrava-se eficiente e principalmente não levava à resistência adquirida (Boehm *et al*, 1997).

Outra vantagem apresentada pelo uso da endostatina era o fato da terapia com a proteína inibir apenas os vasos sanguíneos derivados do processo angiogênico induzido pelo tumor. Dessa forma não ocorreria prejuízo à angiogênese fisiológica. A explicação para este dado reside no fato de que os vasos neo-formados no câncer sofrem estimulação contínua do tumor, não sofrendo o processo de maturação normal. Logo, estes vasos não apresentam a hierarquia normal de vasos sanguíneos normalmente formados (Artérias, capilares, vênulas), apresentando uma rede vascular desorganizada (McDonald & Choyke, 2003).

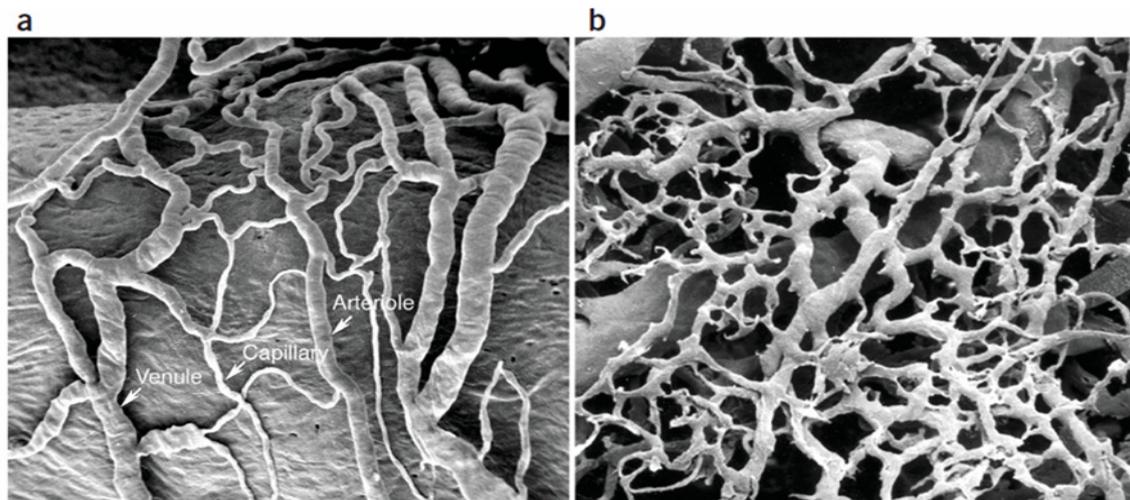


Figura 29: Imagem de microscopia de escaneamento de elétrons (SEM) mostrando a microvasculatura normal (a) e tumoral (b). Adaptado de McDonald & Choyke, 1993.

Além disso, na periferia desses vasos nota-se grande extravasamento de sangue, fato não observado na vasculatura normal. A ocorrência deste extravasamento deve-se ao fato dos vasos neo-formados não apresentarem estruturas como: membrana basal e pericitos (células murais), os quais são encontrados nos vasos normais (McDonald & Choyke, 2003). Logo, há claras

diferenças entre a vasculatura tumoral e os vasos normalmente formados, o que facilita o entendimento da seletividade da endostatina em bloquear apenas o processo angiogênico tumoral sem prejuízo às células normais.

A terapia com endostatina foi apresentada então como uma opção de tratamento que unia a eficácia no combate a tumores com baixa ou nenhuma toxicidade nos modelos murinos. Discute-se que um dos motivos principais do sucesso obtido com a endostatina deve-se ao seu amplo espectro de ação, já que experimentos utilizando micro-arranjos de DNA mostraram que a endostatina é capaz de regular 12% do genoma (Abdollahi *et al*, 2004).

Em 2000, foram realizados os primeiros testes clínicos com a proteína em pacientes resistentes a terapias convencionais. Contudo, em comparação ao que se observou no tratamento de tumores em camundongos, não foi observada a redução dos tumores humanos com o tratamento com endostatina (Eder *et al*, 2002; Herbst *et al*, 2002; Kullke *et al*, 2005). Concluiu-se então que o uso de um tratamento experimental do qual o mecanismo de ação não é bem conhecido pode acarretar em complicações na transposição do uso da proteína de camundongos para humanos.

Portanto, o maior foco de pesquisa na área gira em torno do esclarecimento do mecanismo de ação da proteína, o que requer um conhecimento de sua estrutura e de seus possíveis ligantes fisiológicos. Assim, faz-se importante uma investigação sobre o modo de ação preciso da proteína em humanos para que se possa desenvolver uma forma de potencializar sua ação.

2 – Detalhes estruturais

No trabalho em que a endostatina humana foi resolvida por Difração de Raios-X, foi apontada a necessidade do íon zinco (Zn^{+2}) na formação de dímeros (Ding *et al*, 1998). A figura 30 mostra a estrutura cristalográfica da endostatina humana e sua organização em dímeros, contrastando com a forma monomérica mostrada para a proteína murina (Hohenester *et al*, 1998; Hohenester *et al*, 2000).

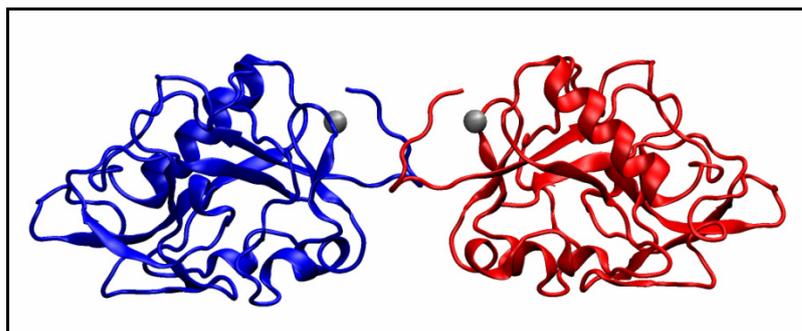


Figura 30: Representação em *cartoon* com programa VMD (Humphrey et al, 1996) do dímero de endostatina resolvido por Difração de Raios-x (código PDB: 1BNL) (Ding et al, 1998). As esferas em cinza correspondem aos íons zinco presentes na interface dimérica.

Como mostrado na figura 30, os íons Zn^{2+} encontram-se na região de interface dimérica, especificamente nas regiões N-terminal de cada monômero sendo coordenados por His 1, His 3, His 11 e Asp 76 (Ding et al, 1998). Esta região mostrou-se conservada na estrutura da endostatina murina (Hohenester et al, 1998; Hohenester et al, 2000). Certos autores já postularam que as funções antiangiogênicas da proteína são dependentes da ligação ao cátion (Bohem et al, 1998). Há autores que inclusive propuseram que a adição de um fragmento ligante de Zn^{2+} tornaria a molécula mais estável e resistente ao calor, pH e outras condições desfavoráveis (Han et al, 2007).

Em 2001 foi realizado um trabalho analisando a capacidade de dímeros ligados covalentemente e de monômeros em desorganizar vasos formados em modelos *in vitro*, utilizando ensaios de matrigel (Kuo et al, 2001). Curiosamente, apenas os dímeros apresentaram o efeito desestabilizador de vasos, graças ao que foi descrito como efeito motogênico da endostatina sobre as células endoteliais. Recentemente nosso grupo demonstrou que a oligomerização ocorre quando formas recombinantes da proteína são expressas em *P. Pastoris* em pH neutro. Os resultados obtidos sugerem que a endostatina inicialmente deve atingir seu alvo sob a forma dimérica provocando a desestabilização dos vasos sanguíneos (Limaverde, 2005).

Outro dado estrutural que foi destacado na estrutura obtida por Difração de Raios-X foi a presença significativa de resíduos de arginina (aminoácidos carregados positivamente) na superfície da molécula (Hohenester et al, 1998; Ding et al, 1998). Na ocasião, foi apontado que estes resíduos formavam dois

agregados (*clusters*) bem definidos, os quais seriam determinantes para interações com glicosaminoglicanos de heparan sulfato (Hohenester *et al*, 1998).

3 – Interação com glicosaminoglicanos

A hipótese da interação da endostatina com glicosaminoglicanos de heparan sulfato surgiu a partir do processo de isolamento da endostatina a partir do meio condicionado derivado de um tumor, no qual se utilizou a metodologia de fracionamento em coluna de afinidade de heparina (O'Reily *et al*, 1997). Devido à similaridade estrutural entre a heparina e o heparan sulfato foi proposto que o GAG seria um possível ligante fisiológico da proteína.

A importância da interação com o heparan sulfato, amplamente presente na superfície das células endoteliais, seria que a endostatina competiria com fatores de crescimento que necessitam se ligar aos GAGs para que cheguem aos seus receptores (Reis *et al*, 2005). Outro trabalho apontou a competição entre a endostatina e o VEGF por um dos tipos de receptor (KDR / Flk-1) do fator angiogênico (Kim *et al*, 2002).

Já foi mostrado inclusive a ligação da endostatina a glicoproteínas, os quais são proteoglicanos de heparan sulfato encontrados na superfície celular (Karumanchi *et al*, 2001). Neste trabalho mostrou-se que a presença deste proteoglicano é fundamental para que a endostatina exerça seu efeito antimigratório em células estimuladas com VEGF₁₂₁. Apontou-se na ocasião que a interação com o GAG seria importante para a apresentação da proteína ao possível receptor da proteína (Karumanchi *et al*, 2001).

A possível região de interação com GAGs foi caracterizada em um estudo publicado em 1999, onde foi utilizada a técnica de mutação sítio-dirigido (Sasaki *et al*, 1999). Nesta ocasião mostrou-se a necessidade de heparina/heparan sulfato para que a endostatina fosse capaz de inibir a formação de vasos em ensaios de angiogênese em membrana cório-alantóica (Sasaki *et al*, 1999).

A informação gerada por este estudo serviu como base para que anos depois Kreuger e colaboradores propusessem um modelo de interação entre a

endostatina e seqüências de heparan sulfato, contudo foi proposta apenas a interação entre monômeros e o GAG (Kreuger *et al*, 2002). Na ocasião discutiu-se que a homogeneidade de cargas da heparina levaria a presença de interações não específicas com a região compreendida entre os “clusters” de argininas expostas (Kreuger *et al*, 2002).

O presente trabalho visa estudar computacionalmente a interação entre a proteína e um polímero de heparina. Tomaram-se como base duas hipóteses recorrentes na literatura: (1) qual das formas (monomérica ou dimérica apresentaria os efeitos animadores observados nos primeiros experimentos (O’Reilly *et al*, 1997); (2) a interação com glicosaminoglicanos, postulada como importante na atividade da enzima, seria influenciada pela oligomerização da proteína? (Kuo *et al*, 2001; Calmpp *et al*, 2006). Logo, avaliou-se a interação entre ambas as formas e um polímero de heparina buscando compreender o mecanismo envolvido e visando definir sítios e contatos entre as moléculas.

4 - Objetivos Específicos

A partir dos dados na literatura sugerindo a importância da interação entre a endostatina e a heparina, como modelo de heparan-sulfato, decidiu-se realizar um estudo *in silico* verificando do ponto de vista atomístico/molecular a interação entre essas moléculas.

Primeiramente utilizou-se a metodologia de ancoramento molecular para entender a viabilidade e especificidade da interação. Esta metodologia visa a montagem de complexos moleculares de mais baixa energia para simulações de Dinâmica Molecular, com a qual é possível melhorar a adaptação conformacional entre ambas e avaliar o comportamento das mesmas em solução.

Foram realizadas simulações de Dinâmica Molecular para se estudar os movimentos dos átomos do sistema e, dessa forma, analisar em 3ns de simulação as flutuações estruturais e estabilidade dos complexos. Para a execução desta técnica foi necessária a parametrização da molécula de heparina para o campo de forças GROMOS96 (Van Gunsteren e Berendsen, 1997), adequado para estudos em proteínas, mas até então carecendo de dados para polissacarídeos.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Utilizando a técnica de ancoramento molecular realizar uma busca por complexos de menor energia entre a endostatina e a heparina.
- A partir dos resultados de ancoramento, realizar estudo de Dinâmica Molecular nos complexos de mais baixa energia encontrados, buscando verificar a estabilidade dos mesmos.
- Analisar detalhadamente a interação molecular verificando os principais componentes energéticos responsáveis pela estabilização dos complexos.
- Com base nas análises realizadas, discutir um novo modelo de interação entre a endostatina e glicosaminoglicanos.

5 – Procedimentos

5.1 – Parâmetros para realização de ancoramento molecular

Utilizou-se o dodessacarídeo de heparina (código PDB: 1HPN) (Mulloy *et al*, 1993) como ligante. A estrutura da endostatina humana utilizada foi a resolvida em dímeros (código PDB: 1BNL) (Ding *et al*, 1998). Para os cálculos com o monômero, uma das subunidades do dímero foi selecionada.

O programa Autodock 3.0 (Morris *et al*, 1998) limita em 32 o número de torsões a serem analisadas com liberdade de giro nos cálculos de ancoramento. Dessa forma foram escolhidas as torsões representativas das ligações glicosídicas e dos grupos sulfato para permanecerem com liberdade de giro. A escolha foi baseada no conhecimento prévio que a estrutura geral de qualquer polissacarídeo é definida pelos ângulos torisonais da ligação glicosídica (Rao, 1988). Já os grupos sulfato têm importância na interação com grupamentos carregados positivamente da proteína, logo a melhor acomodação dessas regiões é fundamental para resultados acurados de ancoramento molecular.

Utilizou-se o módulo Autogrid presente no pacote Autodock para a geração de malhas (*grids*) de interação cobrindo os campos eletrostáticos carregados positivamente obtidos nas análises de superfície eletrostática. O espaçamento utilizado foi de 498 Å. Foram realizados 100 cálculos de ancoramento em uma população inicial de 200 indivíduos. As soluções foram separadas em clusters de até 2 Å de desvio médio quadrático (RMSD). Os clusters foram então ranqueados de acordo com seus valores energéticos.

5.2 – Parâmetros utilizados na DM

As simulações foram realizadas em solvente explícito utilizando uma camada de 15Å de solvente ao redor do soluto o qual correspondia aos complexos obtidos por ancoramento molecular. Utilizou-se uma caixa de água cúbica em condições periódicas de contorno contendo aproximadamente 68.395 moléculas de água do tipo SPC (*Single Point Charge*) (Berendsen *et al*, 1981) nas simulações com o dímero. Já na simulação com o monômero de

endostatina a caixa continha aproximadamente 38.813 moléculas de água. Contra-íons (Na^+) foram utilizados para neutralizar os sistemas.

Para minimização de energia foi utilizado um protocolo de três etapas: inicialmente utilizou-se o método do máximo declive em duas etapas, sendo a primeira com os átomos pesados do soluto com posições restringidas e na segunda com todos os átomos livres. A seguir aplicou-se o método do gradiente conjugado para uma melhor otimização das geometrias antes da dinâmica molecular.

O protocolo de DM se iniciava com a simulação de 500 pico segundos a 310K em cada sistema, mantendo os átomos pesados com posições restringidas. Nesta etapa utilizou-se uma distribuição randômica de Boltzmann para a geração das velocidades iniciais. Em seguida, um nano segundo de DM com todos os átomos livres foram simulados para a termalização e equilíbrio do sistema. Após todas estas etapas foram realizadas simulações de 3 nano segundos para a aquisição de dados.

Os tempos de integração utilizados foram de dois fento segundos. Utilizaram-se os métodos de vínculo LINCS (Hess et al, 1997) e SETTLE (Miyamoto & Kollman, 1992) para correção das ligações do soluto e da água respectivamente. Temperatura e pressão foram mantidas constantes à 310K e 1 atm respectivamente utilizando acoplamento de Berendsen (Berendsen *et al*, 1984). Interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método PME (Particle Mesh Ewald) (Darden *et al*, 1993) com raio de corte de 10 Å. Interações de Van der Waals foram tratadas utilizando raio de corte simples de 10Å.

5.3 – Análise da área de interação endostatina-heparina

Utilizou-se o programa SURFINMD (Limaverde, 2005), desenvolvido por nosso grupo, para as análises de área média intermolecular. O programa realiza um cálculo eletrostático para cada ponto gerado a partir do algoritmo para geração de superfície acessível de Connolly (Connolly, 1983). Dessa forma, utiliza-se uma solução quantitativa para análise de superfícies

intermoleculares de complexos, a partir de múltiplas coordenadas dinâmicas provenientes das trajetórias da DM.

6 – Resultados

6.1 – Superfície eletrostática da endostatina

A análise da superfície eletrostática da endostatina revelou a importância dos domínios formados por argininas superficiais. Este resíduo aminoácido apresenta em sua estrutura o grupamento arginal, que lhe confere o caráter positivo em solução fisiológica (pH 7,4). Seu maior número confere à proteína a carga líquida +7, que não é distribuída homogeneamente na superfície (Figura 31), gerando sítios promissores para a interação com grupamentos de cargas opostas como os GAGs.

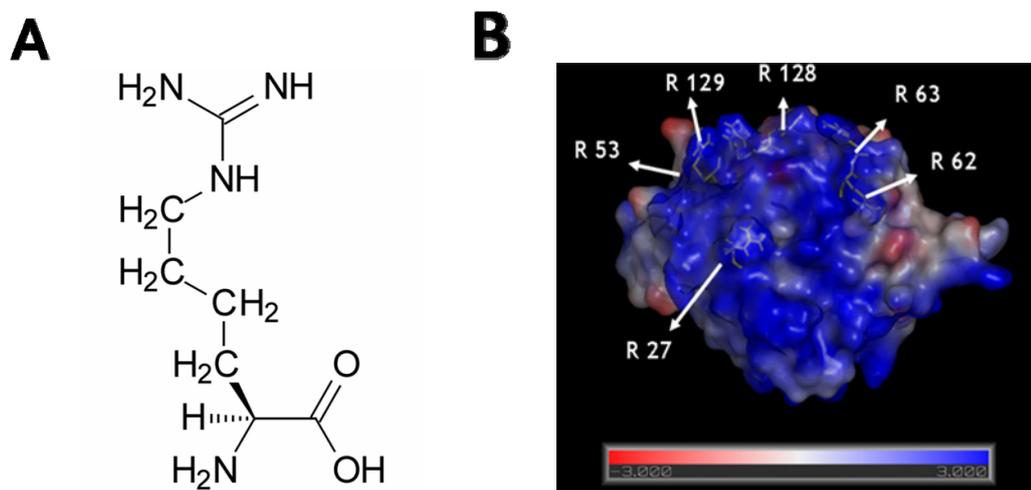
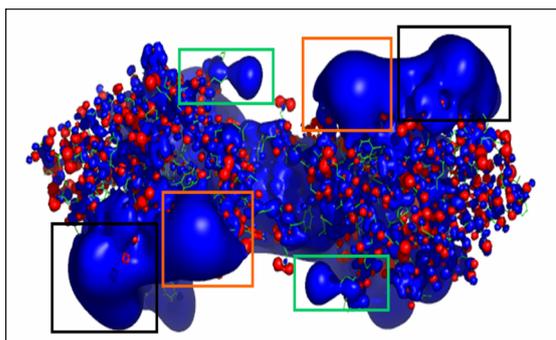


Figura 31: (A): Estrutura do aminoácido arginina. (B): Superfície eletrostática de Poisson-Boltzmann da endostatina, calculada com o programa APBS e visualizada com o programa Pymol (De Lano, 1998) (azul: positivo; vermelho: negativo; branco: neutro). As argininas representadas (R) correspondem às descritas em Sasaki *et al*, 1999 como formadoras dos “clusters” primário e secundário.

Foi realizada a análise da isosuperfície eletrostática da proteína, para checar o alcance dos campos eletrostáticos com a mesma intensidade (figura 32). A importância da análise se dá pela possibilidade do mapeamento das possíveis regiões de interação com GAGs, já que se espera que as regiões mais positivas da proteína exerçam forte atração aos grupos sulfato presentes nos açúcares.



- **No quadro preto:** Campo eletrostático primário (Arg 27,53,128 e 129)
- **No quadro laranja:** Campo eletrostático secundário (Arg 62,63)
- **No quadro verde:** Campo eletrostático terciário (Arg 99, lis 95).

Figura 32. Isosuperfície eletrostática do dímero de endostatina. A convenção de cargas/cores segue a mesma regra da figura 31.

Nota-se a presença de três campos eletrostáticos principais com carga positiva. Os campos definidos como primário (em preto), constituído pelas argininas 27.53.128 e 129, e o secundário, formado pelas argininas 62 e 63 já se encontram caracterizados na literatura (Sasaki et al, 1999). O terceiro campo (em verde), na face oposta da molécula, é formado pela arginina 99 e lisina 95 e foi definido por nosso grupo como campo terciário. Como a molécula se organiza na forma de um homodímero, os campos eletrostáticos dispõem-se em pares sendo exatamente iguais em cada monômero.

6.2 – Obtenção dos complexos endostatina – heparina

Como descrito na seção metodologia, foi utilizado o programa Autodock 3.0 para as simulações de ancoramento molecular. O programa limita em 32 o número máximo de torções representadas para os cálculos, fato este que impediu a representação de todas as torções no dodessacarídeo de heparina utilizado, ficando a proteína ainda completamente rígida. Foram escolhidas as torções que representavam os ângulos diedrais Φ e ψ das ligações glicosídicas, além das torções nos ângulos dos grupos sulfato (Limaverde, 2005).

Nos complexos com o monômero de endostatina, o polissacarídeo de heparina interagiu preferencialmente com os agregados de argininas primário e secundário. Já para o dímero, observaram-se dois padrões de interação: transversal e longitudinal (figura 33). No primeiro a heparina interage principalmente com os campos primário e secundário de argininas de monômeros diferentes cruzando transversalmente a interface dimérica. Já nos

complexos longitudinais a heparina faz contato com os campos primário e secundário de um mesmo monômero além de interagir com o campo terciário do outro monômero (Limaverde, 2005).

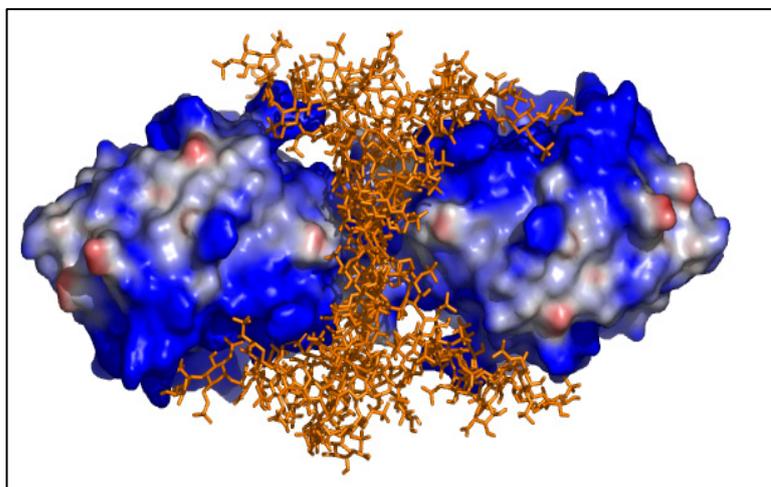


Figura 33: Complexos entre o dímero e a heparina de menor energia obtidos após ancoramento molecular com AUTODOCK. Nota-se a preferência pela interação nas formas transversal e longitudinal.

Os complexos de mais baixa energia foram selecionados de acordo com o critério energético. Entretanto obtiveram-se valores positivos de energia para ambas as formas (223 ± 36 para o monômero / 48 ± 3 para o dímero). A simples análise dos valores energéticos positivos obtidos indicaria que os complexos obtidos não seriam favoráveis. Porém analisando-se os componentes energéticos da energia de ancoramento foi possível observar-se que a energia positiva era proveniente do termo responsável pelas torções do ligante. Como a heparina se dobra consideravelmente para satisfazer as interações com os campos energéticos a energia torsional do ligante aumenta consideravelmente. Para verificar essa hipótese realizou-se um experimento controle de ancoramento molecular com a heparina rígida. Obtiveram-se energias negativas de ancoramento além do total acordo com os resultados obtidos utilizando a heparina flexível (dados não mostrados). Logo, os complexos obtidos seriam favoráveis e foram selecionados os de menores energias para simulações de DM.

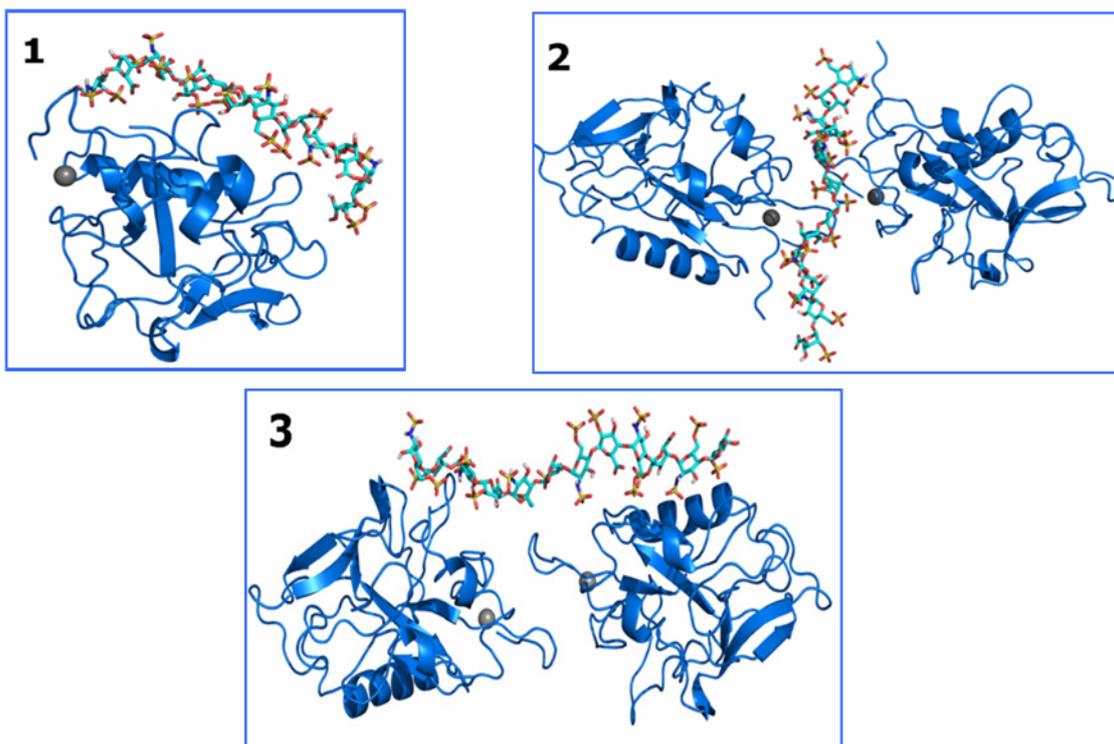


Figura 34: Complexos de mais baixa energia selecionados para simulações de DM.

6.3 – Sistemas simulados

Três sistemas foram submetidos às simulações de dinâmica molecular, realizadas seguindo o protocolo descrito na seção apêndices. Os sistemas simulados foram os seguintes:

| Sistema simulado | Abreviatura/cor |
|--------------------------------|-------------------|
| monômero + heparina | Complexo 1 |
| dímero + heparina transversal | Complexo 2 |
| dímero + heparina longitudinal | Complexo 3 |

Tabela 5: Sistemas submetidos às simulações de DM.

Estes sistemas serão citados conforme as abreviaturas apresentadas na tabela 5, já nas figuras o código de cores será sempre mantido.

6.4 – Análises das flutuações dos complexos

Os complexos obtidos por ancoramento molecular foram submetidos à simulações de 3ns de DM após todas as etapas prévias de termalização e equilíbrio. Primeiramente analisou-se a evolução temporal do desvio da raiz quadrática média (RMSD) durante a simulação. As estruturas escolhidas como referências foram os complexos obtidos por ancoramento molecular

Os desvios observados oscilaram em torno de 0.3 – 0.5 nm indicando pouca variação em relação às estruturas de referência. A flexibilização total da heparina, das cadeias laterais e do esqueleto da proteína possibilitou uma maior complementaridade estrutural e eletrostática no complexo, causando os desvios observados em relação às estruturas iniciais. No dímero com a heparina na posição transversal o desvio chegou a superar 0,5 nm, enquanto que com a heparina longitudinal houve uma tendência à estabilização em torno de 0,4 nm (figura 35).

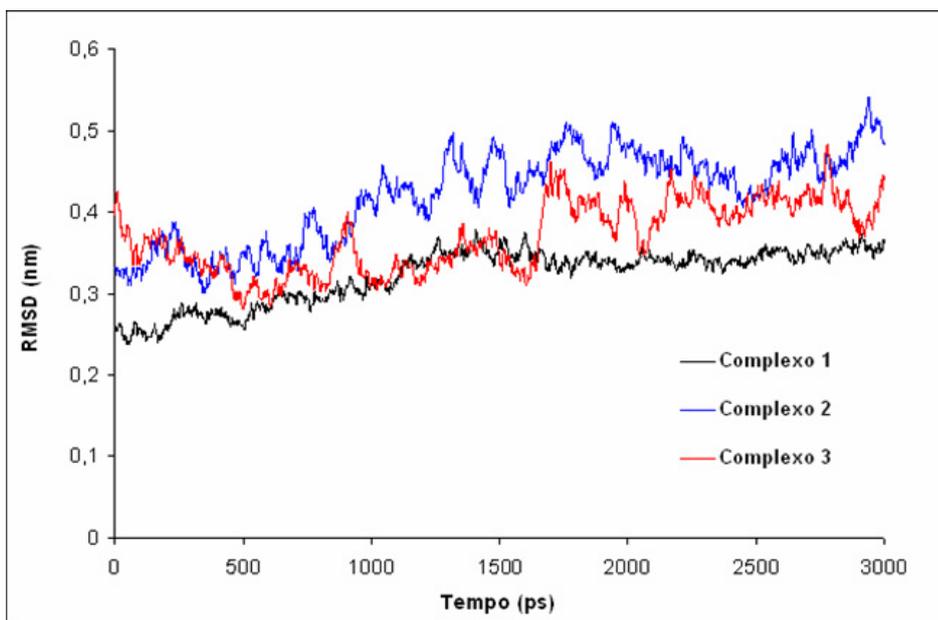


Figura 35: Análise das flutuações dos complexos mostrando baixos desvios (RMSD) para todos os sistemas simulados.

6.5 – Análise das energias de interação endostatina – heparina

A análise da energia de interação é de suma importância para avaliar a interação entre as moléculas. A análise é realizada considerando-se os termos de van der Waals e Coulomb somando-se as contribuições de todos os átomos, em cada unidade do complexo, para a obtenção do valor da energia de interação endostatina-heparina.

Energias mais baixas obtidas representam complexos mais estáveis. Dessa forma, pode-se avaliar durante a Dinâmica Molecular se houve maior adequação entre as estruturas dos complexos e melhores interações entre as moléculas. Como mostra o gráfico a seguir (figura 36), para todas as estruturas simuladas, notou-se uma diminuição da energia total de interação entre a proteína e o polissacarídeo. Isto vem de encontro à estabilização dos desvios globais (RMSD) observados na figura 35, os quais correspondem às alterações conformacionais que permitiram maior adaptação entre as estruturas.

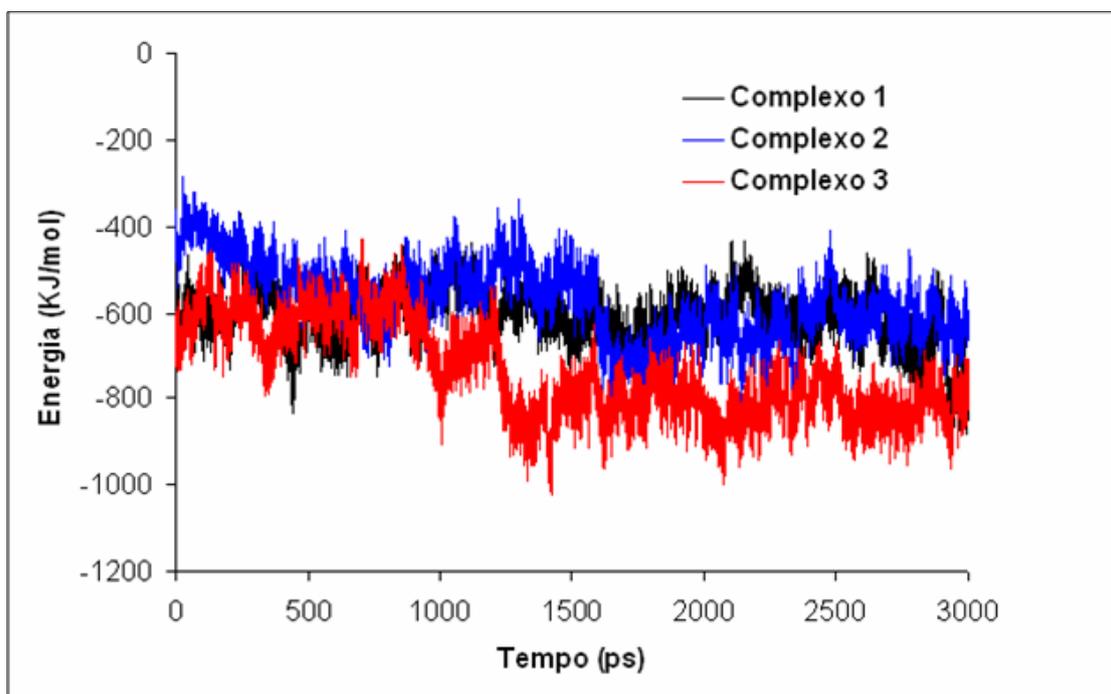


Figura 36: Energias de interação endostatina – heparina mostrando melhor acomodação das estruturas dos dímeros (diminuição das energias) durante a MD. Para o monômero notou-se uma tendência à estabilidade das energias (em preto).

6.6 – Análise da área de interação endostatina – heparina

A partir das trajetórias das dinâmicas foi possível a verificação, sob o ponto de vista atomístico, da área de contato intermolecular entre endostatina e heparina. Esta análise foi utilizada para se definir as principais regiões de contato entre as moléculas, a qual já foi caracterizada experimentalmente para o monômero de endostatina (Sasaki *et al*, 1999). A simulação com o monômero foi utilizada para comparação com tais resultados visando checar a robustez do cálculo para que o mesmo pudesse ser aplicado ao dímero.

A análise da superfície de interação entre a proteína monomérica e o açúcar mostrou as argininas superficiais como resíduos de maior interação com o polímero de heparina. O resultado obtido (figura 37) reforça um dado experimental onde foi relatada a predominância destes resíduos na interação, sugerido com o uso de mutação sítio dirigido (Sasaki *et al*, 1999). As argininas 53, 62, 63 e 129, descritas como cruciais para a interação com heparina pelo grupo de Sasaki, deram importantes contribuições para a interface intermolecular com a heparina na simulação com o monômero. Observou-se ainda que outros resíduos também apresentaram área significativa de interação (acima de 20 Å²): histidina 1, arginina 38, alanina 43, glicina 44, treonina 45 e leucina 54.

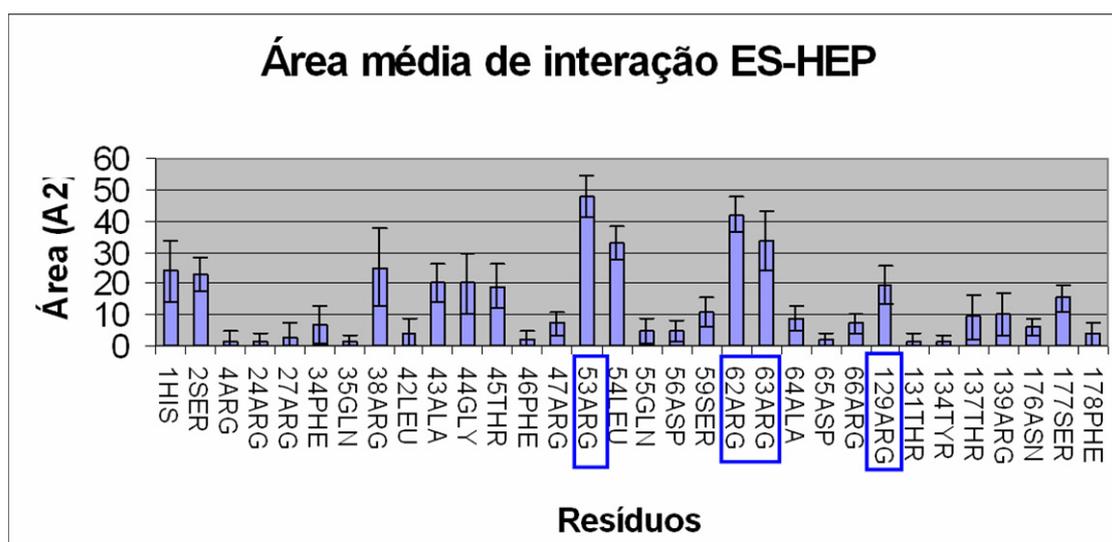


Figura 37. Análise da área de interação dos resíduos do monômero com a heparina. Destacadas em azul estão as argininas (ARG) superficiais, as quais apresentam maiores áreas de interação.

Ao analisar os resultados com o dímero separou-se a seqüência em 2 cadeias, cada uma correspondente a um monômero. No complexo dímero transversal - heparina notou-se majoritariamente interações com os resíduos presentes na interface dimérica: metionina 179, treonina 180, serina 182- pertencentes a cadeia A , além do contato com as argininas do campo eletrostático secundário (62 e 63) (figura 38).

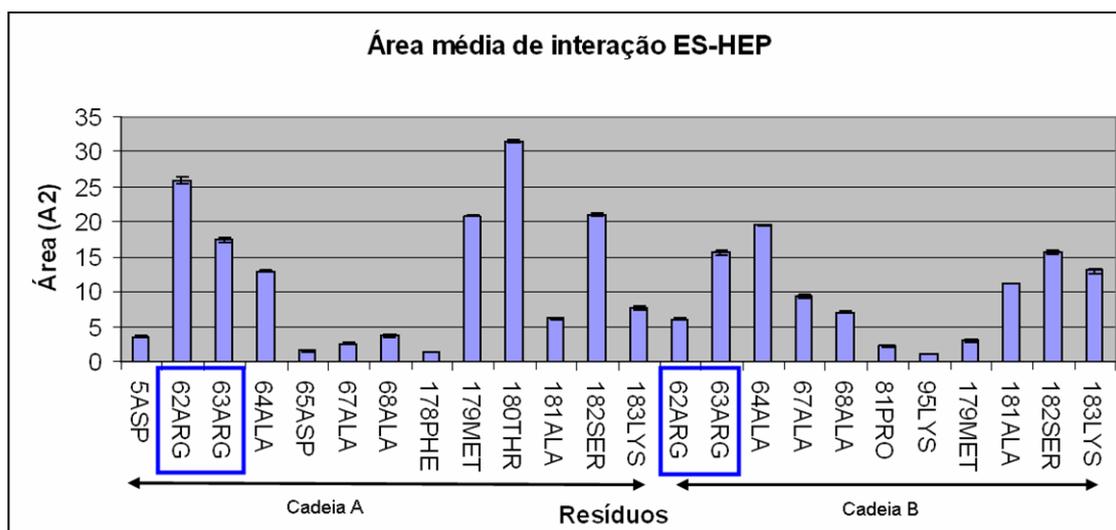


Figura 38: Área média de interação para o complexo dímero – heparina transversal. As argininas presentes em um dos campos eletrostáticos primários do dímero com interação significativa estão destacadas em azul.

Analisando-se o complexo dímero – heparina longitudinal notou-se interações com as argininas 62 e 63 (figura 39), assim como visto anteriormente. Estas argininas são formadoras de um agregado secundário fundamental para interação entre o monômero e a heparina. Além destes resíduos, contribuem significativamente na interação: lisina 95, prolina 96, argininas 156 (cadeia A) e argininas 53 e 129, leucina 54, serina 59, lisina 183 (cadeia B).

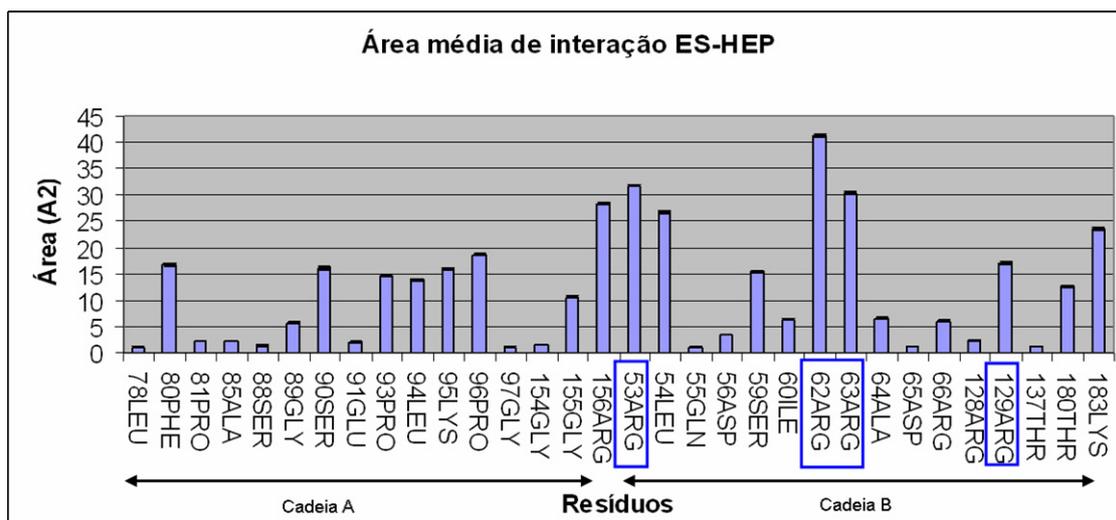


Figura 39: Área média de interação para o complexo dímero – heparina longitudinal. A convenção de cores segue a mesma das figuras 37 e 38 destacando a interação com as argininas superficiais.

Os resultados obtidos para o monômero indicaram a interação com o campo eletrostático primário e secundário conforme esperado. Já para o dímero, destaca-se também a interação significativa de resíduos não carregados com o polissacarídeo, o que indica baixa especificidade da interação. Devido ao fato da heparina ser repleta de grupos sulfato, espera-se que os contatos sejam majoritários nas regiões carregadas positivamente da endostatina. Apesar de os sítios positivos da proteína constituírem boa parte da superfície, os mesmos são bem definidos e espaçados por regiões sem carga. Logo, a endostatina apesar de ser majoritariamente positiva em sua superfície é também marcadamente heterogênea. Dessa forma, a homogeneidade de cargas da heparina levou à presença de regiões de interação não específicas com a proteína.

6.7 - Análise de ligações hidrogênio durante a dinâmica molecular

A análise de ligações hidrogênio formadas durante a dinâmica fornece um dado importante na avaliação das interações entre a proteína e o polissacarídeo e da possível especificidade nessas interações, que pode ser caracterizada pelas ligações de hidrogênio mais prevalentes. Já que este tipo de interação não covalente representa uma contribuição energética significativa na estabilização de estruturas e complexos moleculares, o número médio de

ligações durante a dinâmica pode representa um dado importante no estudo da interação entre as moléculas – heparina e endostatina.

Para o complexo monômero – heparina, o número médio de ligações hidrogênio permaneceu estável durante toda a simulação, em torno de 15 ligações-H. Para o complexo dímero transversal – heparina a análise revelou certa flutuação, com uma média de cerca de 10 ligações-H, mas flutuações entre 5 e 15 ligações-H (figura 40). Nota-se um paralelo com o maior valor de RMSD para este complexo (figura 35).

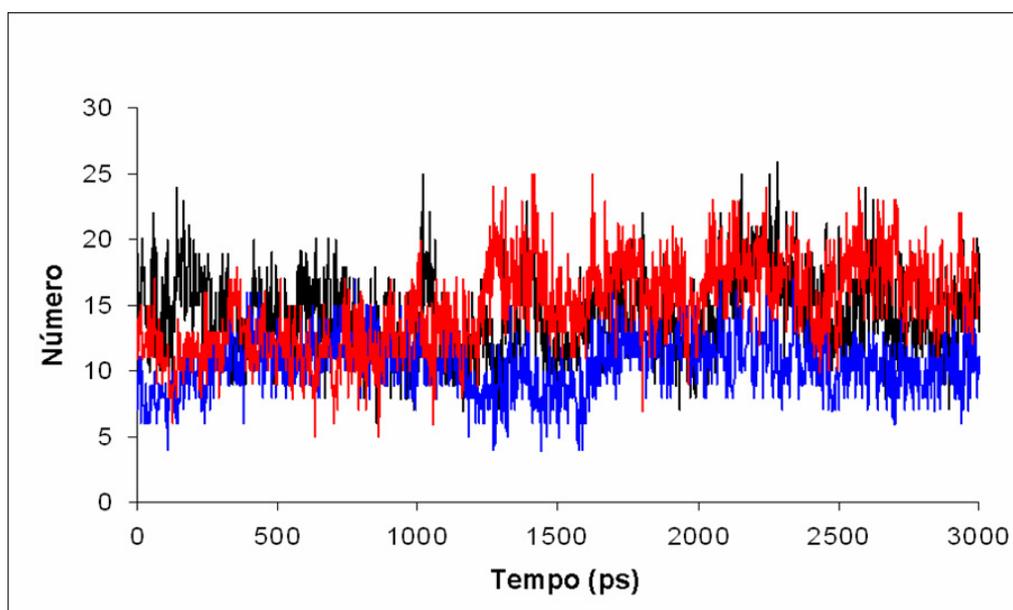


Figura 40: Número médio de ligações hidrogênio durante a DM. Em preto: complexo 1; em azul: complexo 2; em vermelho: complexo 3.

Com relação ao complexo 3, observou-se, após aproximadamente 1500 ps de simulação, um aumento do número médio de ligações para cerca de 15 ligações-H, concordando com a maior estabilidade (menor RMSD; figura 35) e menor energia de interação para este complexo em comparação ao transversal (figura 36).

Analisou-se também a prevalência das ligações hidrogênio entre a proteína e a heparina formadas durante a DM. Para tornar a análise mais clara, numerou-se cada unidade da heparina de 1 a 12 (dodessacarídeo). Dessa forma, poder-se-ia separar qualitativamente as regiões centrais das extremidades da molécula (figura 41).

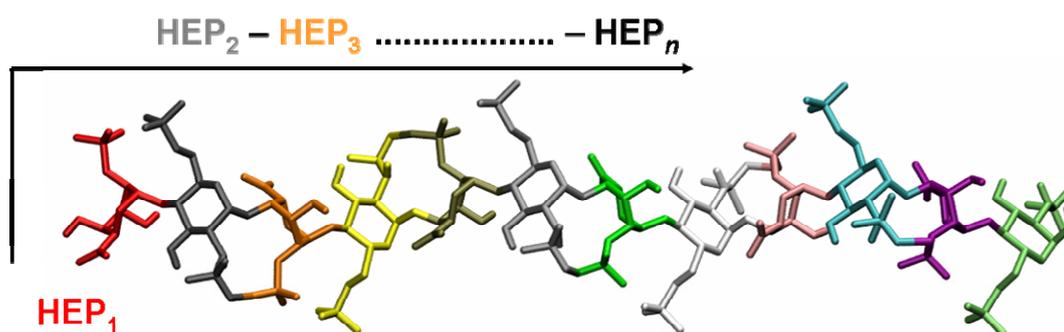


Figura 41: Esquema representativo da molécula de heparina separando o dodecassacarídeo em unidades monoméricas coloridas e numeradas sequencialmente.

A tabela 6 discrimina os resíduos com maiores prevalências durante a simulação.

| Ligações Hidrogênio no complexo 1 durante a DM | | |
|--|-----------------------|--------------|
| Interação | Tipo | Prevalências |
| His 1 – HEP 11 | SC / SO ₃ | 16 % |
| Arg 47 – HEP 10 | SC / SO ₃ | 34 % |
| Arg 53 – HEP 2 | SC / SO ₃ | 43 % |
| Arg 53 – HEP 3 | SC / COO ⁻ | 54 % |
| | SC / SO ₃ | 69 % |
| Arg 62 – HEP 7 | SC / SO ₃ | 54 % |
| Arg 63 – HEP 7 | MC / SO ₃ | 46 % |
| | SC / SO ₃ | 40 % |
| Ala 64 – HEP 8 | MC / SO ₃ | 39 % |
| Arg 129 – HEP 5 | SC / COO ⁻ | 40 % |
| | SC / SO ₃ | 70 % |
| Thr 131 – HEP 4 | SC / SO ₃ | 55 % |

Tabela 6: Ligações hidrogênio entre a endostatina monomérica e a heparina (complexo 1). A molécula de heparina foi numerada conforme a figura 41. Os átomos participantes das ligações hidrogênio são oriundos de: cadeia lateral (SC); cadeia principal (MC); grupo sulfato (SO₃); carboxila (COO⁻).

A análise das prevalências das ligações hidrogênio entre o monômero e a heparina revelou que as argininas dos campos primário (47, 53, 129) e

secundário (62, 63) foram os resíduos com maiores prevalências durante a simulação. Nota-se também a predominância da formação de ligações hidrogênio envolvendo os grupos sulfato (SO_3) da heparina em comparação às carboxilas (COO^-).

As regiões dos campos eletrostáticos principais apresentaram as maiores áreas de interação entre as moléculas conforme já mostrado, o que comprova os achados experimentais onde se caracterizou as argininas de ambos os sítios como as principais regiões de interação com a heparina (Sasaki et al, 1999). A análise de ligações hidrogênio mostrou a importância deste tipo de interação na estabilização do complexo, já que os valores de prevalência foram consideravelmente altos e o número de resíduos envolvidos foi significativo.

Já para o dímero transversal verificou-se que o campo secundário de argininas (Arg 62 e 63) interage fortemente com a heparina. Entretanto, notam-se diversos contatos entre outras regiões da endostatina com o GAG, destacando a formação de diversos contatos na região C-terminal da proteína (Ser 182 / Lis 183) (tabela 7).

| | Ligações Hidrogênio no complexo 2 durante a DM | | |
|----------------------|---|-----------------------|---------------------|
| | Interação | Tipo | Prevalências |
| CADEIA A | Arg 62 – HEP 4 | SC / SO ₃ | 40 % |
| | | SC / COO ⁻ | 33 % |
| | Arg 63 – HEP 5 | SC / SO ₃ | 33 % |
| | Ala 64 – HEP 6 | MC / SO ₃ | 45 % |
| | Thr 180 – HEP 3 | MC / SO ₃ | 60 % |
| | | SC / SO ₃ | 80 % |
| | Ser 182 – HEP 3 | MC / SO ₃ | 57 % |
| Lis 183 – HEP 2 | SC / SO ₃ | 25 % | |
| CADEIA B | Arg 62 – HEP 12 | SC / SO ₃ | 27 % |
| | | SC / SO ₃ | 38 % |
| | Arg 63 – HEP 12 | SC / SO ₃ | 30 % |
| | Ala 64 – HEP 12 | SC / SO ₃ | 34 % |
| | Ser 182 – HEP 11 | MC / SO ₃ | 71 % |
| | | SC / COO ⁻ | 65 % |
| | Lis 183 - HEP 11 | MC / SO ₃ | 35 % |
| SC / SO ₃ | | 26 % | |

Tabela 7: Ligações hidrogênio entre a endostatina dimérica e a heparina (complexo 2). A molécula de heparina foi numerada conforme a figura 41. Os átomos participantes das ligações hidrogênio são oriundos de: cadeia lateral (SC); cadeia principal (MC); grupo sulfato (SO₃); carboxila (COO⁻). Cada cadeia (A e B) corresponde a uma unidade monomérica.

A região C-terminal da proteína, localizada espacialmente próxima a interface dimérica, contém a lisina 183 que atrai os grupos sulfato do açúcar levando também à aproximação da serina 182. Dessa forma, há formação fconsiderável de ligações hidrogênio entre estes resíduos e a heparina.

Outro dado importante a ser extraído a partir da análise da tabela 7 é que a formação de ligações hidrogênio com a heparina se dá preferencialmente com as extremidades do açúcar (HEP 3-4 / 11-12). Este dado é surpreendente já que neste complexo a heparina interage diretamente com a interface dimérica (figura 34). Logo, esperava-se maiores interações com as regiões

centrais do GAG. Este efeito pode ser explicado devido ao fato de a interface dimérica ser composta majoritariamente de aminoácidos apolares (figura 42).

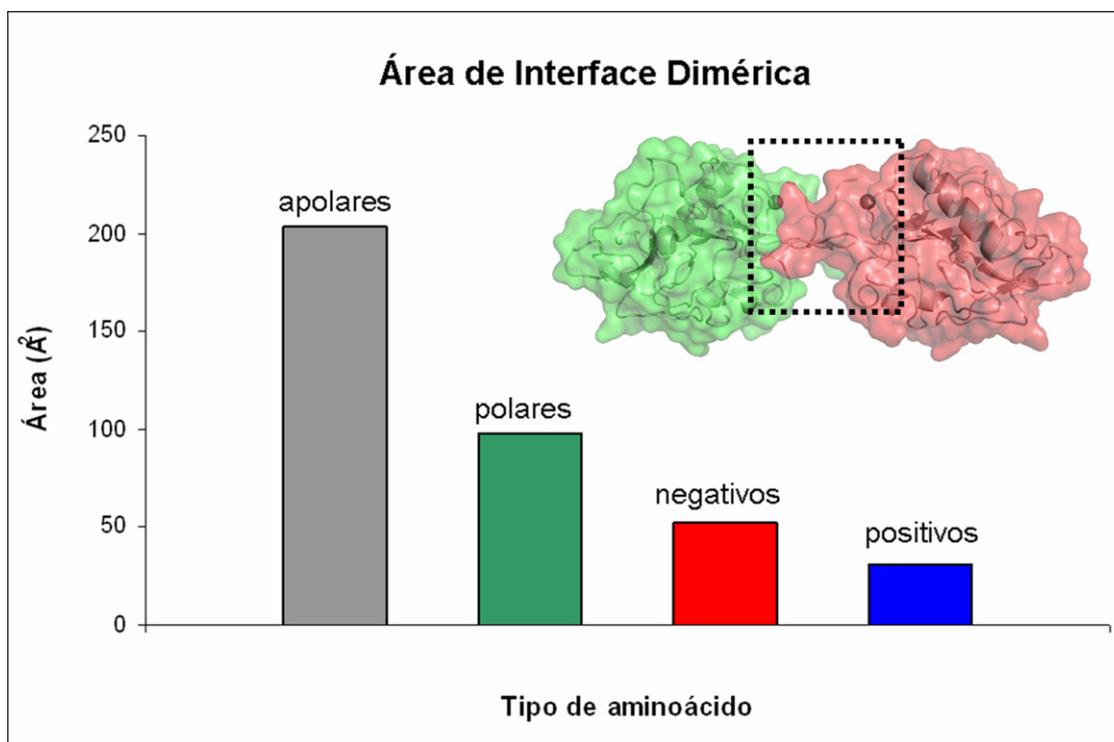


Figura 42: Área de interface dimérica discriminada por tipo de aminoácido.

Portanto, a baixa interação das regiões centrais da heparina com a endostatina aponta a inespecificidade da interação desta região do GAG com a proteína. Tal fato decorre da homogeneidade da heparina, repleta de grupos sulfato por toda sua estrutura, o que acarreta em interações favoráveis apenas com as regiões carregadas e suas adjacências. Em contrapartida, regiões apolares da proteína, tais como a da interface, não interagem bem com moléculas positivas, o que explica a análise de ligações hidrogênio para este complexo.

Em seguida analisou-se a prevalência das ligações hidrogênio presentes no complexo 3 (tabela 8).

| Ligações Hidrogênio no complexo 3 durante a DM | | | |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Interação | Tipo | Prevalências |
| | CADEIA A | Arg 27 – HEP 1 | MC / SO ₃ |
| SC / SO ₃ | | | 33 % |
| Ser 52 – HEP 2 | | SC / SO ₃ | 65 % |
| Arg 53 – HEP 2 | | SC / SO ₃ | 40 % |
| Gln 55 – HEP 3 | | MC / SO ₃ | 53 % |
| | | SC / SO ₃ | 40 % |
| Arg 62 – HEP 4 | | SC / SO ₃ | 77% |
| Arg 62 – HEP 5 | | SC / SO ₃ | 64 % |
| Arg 63 – HEP 4 | MC / SO ₃ | 74 % | |
| | SC / SO ₃ | 41 % | |
| CADEIA B | Gli 154 – HEP 10 | MC / SO ₃ | 61 % |
| | Arg 156 – HEP 12 | MC / SO ₃ | 39 % |
| | | SC / SO ₃ | 62 % |
| Arg 156 HEP 11 | SC / SO ₃ | 55 % | |

Tabela 8: Ligações hidrogênio entre a endostatina dimérica e a heparina (complexo 3). A molécula de heparina foi numerada conforme a figura 41. Os átomos participantes das ligações hidrogênio são oriundos de: cadeia lateral (SC); cadeia principal (MC); grupo sulfato (SO₃); carboxila (COO⁻). Cada cadeia (A e B) corresponde a uma unidade monomérica.

Nota-se claramente, após a observação da tabela 8, a importância das argininas dos campos primário (27, 53), secundário (62, 63) e a região da arginina 156. Como já visto nas análises anteriores, resíduos nas adjacências destas argininas (Ser 52, Gln 56, Gli 154) também interagiram de forma significativa. Além disso, observou-se novamente a interação com as regiões de extremidade do açúcar, o que pode ser explicado mais uma vez pelo fato da interface dimérica ser majoritariamente apolar (figura 41).

A partir das análises tanto globais (RMSD, energias de interação) quanto específicas (área de interface, ligações hidrogênio), torna-se possível a proposição de um novo modelo de interação – entre os dímeros de endostatina e a heparina.

7 – Conclusões parciais

Apesar de a endostatina inicialmente ter sido apontada como a possível cura do câncer graças aos resultados expressivos alcançados nos experimentos iniciais com a proteína em camundongos, os testes clínicos em pacientes humanos não alcançaram tal êxito. Hoje em dia, há uma vasta literatura na qual se encontram propostas a respeito do mecanismo de ação da proteína. A interação com integrinas da família $\alpha_5\beta_1$ parece ser fundamental para a ação da endostatina (Rehn *et al*, 2001), fato que as colocam na posição de provável receptor celular da proteína.

Os proteoglicanos de heparan sulfato têm importância reconhecida na angiogênese, sendo o FGF (fator de crescimento de fibroblastos) o exemplo mais marcante da relação entre glicosaminoglicanos e o crescimento de novos vasos. Este fator de crescimento é um potente ativador de angiogênese que para interagir com seu receptor tirosina cinase necessita da ligação com proteoglicanos de heparan sulfato, formando um complexo ternário levando a ativação de vias de sinalização que levam ao processo angiogênico (Schlessinger *et al*, 2000).

A possível interação da endostatina com proteoglicanos de heparan sulfato seria importante para a antiangiogênese por (i) os proteoglicanos seriam necessários para a apresentação da endostatina ao seu receptor celular – como proposto na hipótese de interação com integrinas $\alpha_5\beta_1$; (ii) na competição por fatores de crescimento que necessitam da ligação ao heparan sulfato para promover seus efeitos – como exemplo o FGF.

A ligação da proteína ao heparan sulfato é fundamentada pelo dado experimental de a endostatina ser facilmente purificada em colunas de afinidade por heparina – um glicosaminoglicano estruturalmente relacionado com o heparan sulfato. Outra importante evidência foi relatada no cristal da proteína (Hohenester *et al*, 1998; Ding *et al*, 1998) onde se mostrou a presença de “clusters” de argininas expostas na superfície, que conferem forte carga positiva (+7) à proteína (Sasaki *et al*, 1999). A presença destas argininas é fundamental para a interação com os grupamentos sulfato presentes no glicosaminoglicano.

Há na literatura também certa controvérsia a respeito da importância da dimerização da proteína mostrada no cristal da endostatina humana (Ding *et al*, 1998). Alguns grupos acreditam que tal estruturação não tenha relevância nos efeitos antiangiogênicos da proteína. Porém já foi mostrado a partir de ensaios *in vitro* de inibição de angiogênese em matrigel, que apenas os dímeros covalentes artificiais utilizados na ocasião eram capazes de reverter a formação de tubos (Kuo *et al*, 2001). Em nosso grupo há uma linha de pesquisa dedicada a verificar se dímeros naturais, obtidos através da expressão em leveduras sob condições de pH alcalino seriam capazes de alcançar este mesmo resultado na reversão de tubos. Os resultados obtidos mostram a capacidade apenas dos dímeros naturais na reversão de tubos, e corroboram com a hipótese de que a estrutura quaternária da proteína mostrada no cristal tem grande importância para efeitos antiangiogênicos da endostatina (Limaverde, 2005).

Para melhor entender a interação entre a proteína e os glicosaminoglicanos, recorreu-se às metodologias computacionais de *docking* e Dinâmica Molecular. Estes métodos permitem análises robustas para se avaliar a interação entre proteínas e especificamente em nosso caso a ligação da endostatina a glicosaminoglicanos.

A análise de superfície eletrostática realizada no começo do trabalho confirma o dado cristalográfico onde se mostra a formação de uma superfície majoritariamente positiva (Hohenester *et al*, 1998), fato este devido às argininas expostas. A análise da isosuperfície do potencial eletrostático realizada para se verificar o campo eletrostático gerado por estas argininas revelou três extensos campos principais: o primário formado por Arg 27, 53, 128 e 129, o secundário por Arg 62 e 63 e o terciário formado por Arg 99 e Lis 95. Ressalta-se que para a estrutura dimérica, por se tratar de um homodímero, encontram-se dois campos primários, dois secundários e dois terciários iguais, porém invertidos.

Os cálculos de ancoramento molecular revelaram que as menores energias obtidas se deram nos complexos com o dímero de endostatina. O encaixe entre a proteína e o monômero se deu conforme verificado pelo artigo

de Sasaki e colaboradores de 1999, com a interação se dando preferencialmente na região dos “clusters” de argininas. Para o dímero, foram encontradas duas formas de encaixe mais favoráveis, denominadas de forma transversal e longitudinal, devido à forma da disposição da heparina sobre a proteína. Este resultado pode ser importante para o entendimento das diferenças de efeitos observados entre o dímero e o monômero da proteína.

Os resultados de RMSD para todos os complexos simulados mostraram desvios entre 3 e 5 Å. O maior desvio (5 Å) foi observado no complexo formado entre o dímero transversal e a heparina, enquanto que nos outros complexos simulados - monômero-heparina e dímero-heparina longitudinal - observaram-se desvios de 3 e 4 Å respectivamente. Para estas duas últimas estruturas simuladas, notou-se uma tendência à estabilização das flutuações.

O resultado da análise da área média de interação mostrou a importância das argininas 53 e 129 (campo primário) além das argininas 62 e 63 (campo secundário) tal qual descrito por Sasaki e colaboradores (Sasaki *et al*, 1999) onde se postulou que estes resíduos teriam maior interação com a heparina. Destaca-se também a presença de resíduos que não foram relatados no artigo referido (leucina 54, arginina 156, treonina 180), os quais têm interação significativa com a heparina por localizarem-se na superfície espacialmente próximos aos campos eletrostáticos mais positivos, provavelmente formando ligações hidrogênio com o polissacarídeo (descritas nas tabelas 6, 7 e 8).

A análise de energia de interação é de suma importância na avaliação da interação entre as moléculas, já que menores energias representam maiores interações. Foi observada uma diminuição da energia total de interação durante a simulação para todos os complexos estudados. Tal diminuição pode ser explicada pelo maior relaxamento permitido às estruturas levando a estabilização dos complexos obtidos pelo *docking* com a proteína rígida.

Verificando a prevalência (porcentagem de permanência) das ligações hidrogênio durante a simulação do complexo dímero-heparina longitudinal, notou-se interação preferencial das extremidades do polissacarídeo com o

dímero. A interpretação para este dado é que a heparina por ser um polímero totalmente sulfatado, somente tem interação específica mediada por carga, a qual mostrou ser a principal neste sistema pelas simulações, nas regiões dos campos eletrostáticos primário e secundário. A região da interface dimérica composta na maioria por resíduos não carregados e apolares tem interação inespecífica com os grupos sulfato da heparina.

Em 2002, Kreuger e colaboradores avaliaram a interação da endostatina com seqüências de heparan sulfato utilizando colunas de afinidade. Neste trabalho foi sugerido que a endostatina teria melhor afinidade por estruturas de heparan sulfato compostas de regiões sulfatadas interrompidas por ao menos um dissacarídeo contendo GlcNAc (glucosamina – *N-acetilada*), conforme modelo a seguir (figura 43).

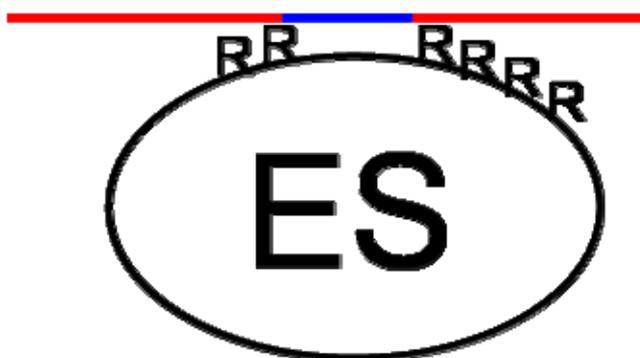


Figura 43: Modelo proposto por Kreuger em 2002 mostrando a interação entre a endostatina e seqüências sulfatadas – acetiladas - sulfatadas (SAS) de heparan sulfato. (ES): endostatina; (R) argininas; Em vermelho – regiões sulfatadas ; Em azul regiões acetiladas.

A seqüência proposta por este autor foi denominada SAS (sulfatada-acetilada-sulfatada) e teria interação com grande especificidade com monômeros de endostatina. Ressalta-se que neste trabalho o autor faz o comentário que interações com tal tipo de seqüência de heparan sulfato ocorrem normalmente envolvendo dímeros de proteínas.

No presente trabalho, se aprofundou o estudo iniciado por nosso grupo visando compreender a interação da proteína com glicosaminoglicanos tanto na forma monomérica quanto dimérica (Limaverde, 2005). Foram obtidos dados estruturais importantes que possibilitam a discussão de um modelo de interação com o heparan sulfato. A hipótese é baseada em seqüências SAS

conforme proposto experimentalmente, porém envolvendo também os dímeros de endostatina (figura 44).

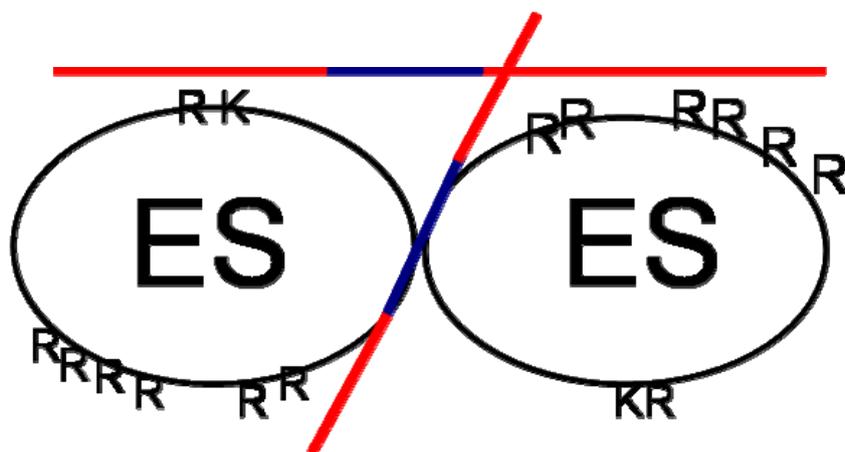


Figura 44: Novo modelo de interação mostrando a interação entre a endostatina dimérica e seqüências sulfatadas – acetiladas - sulfatadas (SAS) de heparan sulfato. (ES): endostatina; (R) argininas; (K) lisinas ; Em vermelho – regiões sulfatadas ; Em azul regiões acetiladas.

Os dados de interação obtidos por *docking* e Dinâmica Molecular somados à análise de comprimento das regiões de interesse, possibilitam a proposição de uma seqüência ideal SAS para interação com dímeros de endostatina, esboçada no modelo a seguir.

A interação com tais seqüências SAS seria mais específica em comparação com a homogeneidade da molécula de heparina. A maior especificidade do contato entre as moléculas seria devido às regiões sulfatadas estarem próximas aos campos principais e a região acetilada em contato com a interface dimérica, não carregada. A presença da região acetilada flanqueada por regiões sulfatadas, é apontada como seqüência de melhor interação com outros sistemas já conhecidos, como a proteína inflamatória 1 - alfa de macrófagos [MIP1- α](Stringer et al, 2002) ; o fator plaquetário 4 (Stringer & Gallagher, 1997) ; TGF- β (Lyon et al, 1997) e a interleucina-8 (Spilmann, 1998).

A estrutura da região acetilada do heparan sulfato, é composta de GlcA(ácido glucurônico) ao invés de IdoA(ácido idurônico). A presença de GlcA, que é menos flexível que IdoA levaria a uma interação estável com a região da interface dimérica. Além disso, sabe-se que a rotação permitida em torno da ligação glicosídica neste monossacarídeo é maior se comparada a

verificada em IdoA (Conrad, 1998). Dessa forma, as regiões sulfatadas poderiam se adequar com maior facilidade às regiões dos “clusters” de argininas, que são resíduos que apresentam grande flexibilidade em solução. Logo, há uma base estrutural que fundamenta a hipótese da interação com seqüências SAS sugerida no artigo de Kreuger baseada apenas em dados de interação.

Outro dado importante que foi sugerido na literatura aponta que a endostatina poderia ter melhor interação com seqüências maiores de glicosaminoglicanos como, por exemplo, polissacarídeos de 16 repetições (Clampp *et al.*, 2006). Além disso, as seqüências de heparan sulfato com 15 repetições aderem melhor a uma coluna de afinidade de endostatina (Kreuger *et al.*, 2002). Portanto, é fundamental que se desenvolvam programas capazes de realizar o ancoramento de ligantes maiores e que permitam que todas as torções sejam satisfeitas.

Ao dispor destas ferramentas, espera-se que se abra a possibilidade da realização de simulações de ancoramento e dinâmica molecular no sistema endostatina – heparan sulfato, buscando compreender se o dímero teria relevância na formação de complexos com este glicosaminoglicano. A utilização da heparina foi importante para se adquirir experiência no trabalho com açúcares, entretanto os resultados mostraram que a especificidade da interação só pode ser alcançada com o possível ligante fisiológico da proteína: o heparan sulfato.

Perspectivas

O estudo a partir de ferramentas computacionais da interação catepsina B e heparina revelou detalhes sobre um complexo mecanismo molecular até então desconhecido em sua totalidade. Vale destacar também que a partir da metodologia teórica empregada foi possível a melhor interpretação de fenômenos observados experimentalmente, o que mostra a importância da aplicação das ferramentas de modelagem molecular na biologia estrutural.

Porém, o real intuito do trabalho com a enzima é a futura proposição de novos inibidores que sejam desenvolvidos levando-se em conta o comportamento da catepsina B em diferentes pHs. Dessa forma, o estudo com inibidores será um dos próximos passos a serem realizados para que se contribua de forma significativa na área de desenvolvimento racional de fármacos voltados para o combate ao câncer.

Com relação à endostatina, os resultados obtidos mostram a capacidade dos dímeros, os quais são propostos como a forma da proteína eficaz no tratamento, em interagir de forma estável com um polímero de heparina. A caracterização dos sítios de interação é de grande importância para a interpretação de dados experimentais, onde se revelou a importância dos GAGs para que a endostatina dimérica exerça seus efeitos. Contudo, há a necessidade de estudos adicionais mostrando a importância da interação entre dímeros naturais estudados por nosso grupo e os GAGs no potencial desestabilizador de vasos da endostatina.

Referências Bibliográficas

Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, Grone HJ, Debus J, Ansorge W, Folkman J, Hlatky L, Huber PE. (2004) **Endostatin's antiangiogenic signaling network.** *Mol Cell.* **13** (5):649-63

Almeida, P. C.; Nantes, I. L.; Rizzi, C. C. A.; Ju' dice, W. A. S.; Chagas, J. R.; Juliano, L.; Nader, H. B.; Tersariol, I. L. S. (1999) **Cysteine proteinase activity regulation – A possible role for heparin and heparin-like glycosaminoglycans.** *J. Biol. Chem.* **274**, 30433–30438

Almeida, P. C.; Nantes, I.L.; Chagas, J.R.; Rizzi, C.C.A.; Faljoni-Alario, A.; Carmona, E.; Juliano, L.; Nader, H.; Tersariol, I.L.S. (2001) **Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation.** *J. Biol. Chem.* **276**, 944–951

Amadei, A.; Linssen, A.B.M; Berendsen, H.J.C. (1993) **Essential dynamics of proteins.** *PROTEINS: Structure, Function and Genetics.* **17**: 412-425.

Amadei, A., Ceruso, M. A. e Di Nola, A. (1999) **On the convergence of the conformational coordinates basis set obtained by the essential dynamics analysis of proteins' molecular dynamics simulations.** *Proteins: Structure Function and Genetics*, **36**:419-424.

Baker; N.A; Sept; D.; Joseph; S.; Holst; M.J; McCammon; J.A. (2001) **Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome.** *Proc Nati Acad Sci USA* **98**, 10037- 41.

Barret, A.J.; Kembhavi, A.A.; Brown, M.A.; Kirschke, H.; Knight, C.G.; Tamai, M.; Hanada, K. (1982) **L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L.** *Biochem. J.* **201**: 189-198.

Berdowska I. (2004) **Cysteine proteases as disease markers.** *Clin Chim Acta*; **342**:41-69.

Blake, C.C.F; Johnson, L.N.; Mair, G.A.; North, A.C.T.; Phillips, D.C.; Sarma, V.R.(1967) **Crystallographic Studies of Activity of Hen Egg-White Lysozyme.** *Proc. Royal Soc. of London B* **167**: 378-388.

Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Gunsteren, W. F. V., Hermans, J. (1981) **Intermolecular Forces** (Pullman, B., ed.), Reidel, Dordrecht, The Netherlands, 331–342

Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; van Gunsteren, W.F.; Dinola, A.; Haak, J.R. (1984) **Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath,** *J. Chem. Phys.* **81**: 3684-3690.

Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., O'Reilly, M.S. (1997) **Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance.** *Nature*. **390** (6658):404-7

Bohem, T., O'Reilly, M.S., Keough, K., Shiloach, J., Shapiro, R., Folkman, J. (1998) **Zinc-binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**: 190-194.

Brooks, B.R , Brucoreli, R.E, Olafson, B.D, States, D.J, Swaminathan, S, Karplus, M (1983) **CHARMM: a program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations.** *J. Comput Chem* **4** (2), 187-217.

Buck, M. R.; Karustis, D. G.; Day, N. A.; Honn, K. V.; Sloane, B. F. (1992) **Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues.** *Biochem J.* **282**, 273–278

Capila, I., Linhardt, R.J. (2002) **Heparin-protein interactions.** *Angew Chem Int Ed Engl.* **41**: 391-412.

Caglic, D.; Pungercar, J.R.; Pejler, G.; Turk, V.; Turk, B. (2007) **Glycosaminoglycans Facilitate Procathepsin B Activation through Disruption of Propeptide-Mature Enzyme Interactions.** *J. Biol. Chem* **282**: 33076-33085

Cataldo, A.M., Nixon, R.A. (1990) **Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain.** *PNAS* **87**: 3861-3865.

Cathers, B.E.; Barrett, C.; Palmer, J.T.; Rydzewski, R.M. (2002) **pH Dependence of inhibitors targeting the occluding loop of cathepsin B.** *Biorganic Chemistry* **30**: 264-275.

Cavallo-Medved, D.; Sloane, B. F. (2003) **Cell-surface cathepsin B: understanding its functional significance.** *Curr. Top. Dev. Biol.* **54**: 313–341.

Chapman, H.A., Riese, R.J., Shi, G.P. (1997) **Emerging roles for cysteine proteases in human biology.** *Annu Rev Physiol.* **59**: 63-88.

Clamp A; Blackhall FH; Henrioud A; Jayson GC; Javaherian K; Esko J; Gallagher JT; Merry CL.. (2006) **The morphogenic properties of oligomeric endostatin are dependent on cell surface heparan sulfate.** *J. Biol. Chem.* **281** (21), 14813-22.

Clark, M., Cramer, R.D, van Opdenbosch, N. (1989) **Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field.** *J. Comput Chem* **10** (8), 982-1012.

- Conrad, H.E. (1998) **Heparin binding proteins**. *Academic Press Inc., New York*
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. (1993) **Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems**, *J. Chem. Phys.* **98**: 10089- 10092.
- Davies, M.N.; Toseland, C.P.; Moss, D. S.; Flower, D.R. (2006) **Benchmarking pK_a prediction**. *BMC Biochemistry* **7** (18):
- DeClerck, Y.A.; Mercurio, A.M.; Stack, M.S.; Chapman, H.A.; Zutter, M.M.; Muschel, R.J.; Raz, A.; Matrisian, L.M.; Sloane, B.F.; Noel, A.; Hendrix, M.J.; Coussens, L.; Padarathsingh, M. (2004) **Proteases, Extracellular matrix, and cancer – A workshop of the Path B study section**. *American Journal of Pathology*. **164** (4): 1131- 1139.
- DeLano, W.L. (1998) **The PyMOL Molecular Graphics System**. *DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA*. <http://www.pymol.org>
- Ding YH, Javaherian K, Lo KM, Chopra R, Boehm T, Lanciotti J, Harris BA, Li Y, Shapiro R, Hohenester E, Timpl R, Folkman J, Wiley DC. (1998) **Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95** (18):10443-8.
- Eder JP Jr, Supko JG, Clark JW, Puchalski TA, Garcia-Carbonero R, Ryan DP, Shulman LN, Proper J, Kirvan M, Rattner B, Connors S, Keogan MT, Janicek MJ, Fogler WE, Schnipper L, Kinchla N, Sidor C, Phillips E, Folkman J, Kufe DW. (2002) **Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily**. *J Clin Oncol*. **20** (18):3772-84
- Egeblad, M.; Werb, Z.(2002). **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression**. *Nat Rev Cancer*, **2**:161-74.
- Folkman ,J. (1989) **Successful treatment of an angiogenic disease**. *N Engl J Med*. **320** (18), 1211-2.
- Folkman J. (2006) **Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action**. *Exp Cell Res*. **312** (5):594-607.
- Gobec, S.; Frlan, R. (2006) **Inhibitors of Cathepsin B**. *Current Medicinal Chemistry* **13**: 2309-2327.
- Gocheva, V. *et al.* (2006). **Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis**. *Genes Dev*. **20**, 543–556
- Gocheva, V.; Joyce, J.A. (2007) **Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion**. *Cell Cycle*. **6** (1): 60-64.

Goldmann, T.; Suter, L.; Ribbert, D.; Otto, F. (1999) **The expression of proteolytic enzymes at the dermal invading front of primary cutaneous melanoma predicts metastasis.** *Pathol Res Pract*; **195**:171-5.

Guncar, G., Podobnik, M., Pungercar, P., Trukelj, B., Turk, V., Turk, D. (1998) **Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function.** *Structure*. **6**: 51-61.

Guncar, G., Pungercic, G., Klemencic, I., Turk, V., Turk, D. (1999) **Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S.** *EMBO J*. **18**: 793-803.

Guncar, G., Klemencic, I., Turk, B., Turk, V., Karaoglanovic-Carmona, A., Juliano, L., Turk, D. (2000) **Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease.** *Structure*. **8**: 305-13.

Han, Q., Fu, Y., Zhou, H., He, Y., Luo, Y. (2007) **Contributions of Zn(II)-binding to the structural stability of endostatin.** *FEBS Letters* **581**: 3027-3032.

Hanahan, D; Folkman J, (1996) **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis,** *Cell* **86**, 353–364.

Herbst RS, Hess KR, Tran HT, Tseng JE, Mullani NA, Charnsangavej C, Madden T, Davis DW, McConkey DJ, O'Reilly MS, Ellis LM, Pluda J, Hong WK, Abbruzzese JL. (2002) **Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors.** *J Clin Oncol*. **20** (18):3792-803

Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H.J.C.; Fraaije, J.G.E.M (1997) **LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations,** *J. Comp. Chem*. **18**: 1463-1472.

Hohenester, E., Sasaki, T., Olsen, B.R., Timpl, R. (1998) **Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution.** *EMBO J*. **17**:1656-64.

Hohenester, E., Sasaki, T., Meann, K., Timpl, R. (2000) **Variable zinc coordination in endostatin.** *J. Mol. Bio*. **297**: 1-6.

Illy, C.; Qurashi, O.; Wang, J.; Purisima, E.; Vernet, T.; Mort, J.S. (1997) **Role of the Occluding Loop in Cathepsin B Activity.** *J. Biol. Chem* **272**: 1197-1202

Jedeszko, C.; Sloane, B.F. (2004) **Cysteine cathepsins in human cancer.** *Biol Chem*; **385**:1017-27.

Joyce, J.A., Hanahan, D. (2004) **Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer.** *Cell Cycle*. **3**: 1516-619.

Kandel, J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D. (1991) **Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma.** *Cell* .**66** (6):1095-104

Karumanchi, S.A, Jha, V., Ramchandran, R., Karihaloo, A., Tsiokas, L., Chan, B., Dhanabal, M., Hanai, J.I, Venkataraman, G., Shriver. Z., Keiser, N., Kalluri, R., Zeng, H., Mukhopadhyay, D., Chen, R.L., Lander, A.D., Hagihara, K., Yamaguchi, Y., Sasisekharan, R., Cantley, L., Sukhatme, V.P. (2001) **Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors.** *Mol Cell*. **7**: 811-22.

Kim, Y.M., Hwang, S., Kim, Y.M., Pyun, B.J., Kim, T.Y., Lee,S.T., Gho,Y.S., Kwon,Y.G. (2002) **Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Fik-1.** *J Biol Chem*. **277**: 27872-9.

Kobayashi, H. *et al.* (1993) **Effects of membrane-associated cathepsin B on the activation of receptor-bound prourokinase and subsequent invasion of reconstituted basement membranes.** *Biochim.Biophys. Acta* **1178**, 55–62

Koblinski, J.E., Ahram, M., Sloane, B.F. (2001) **Unraveling the role of proteases in cancer.** *Clinica Chimica Acta*. **291**: 113-135.

Kreuger J, Matsumoto T, Vanwildemeersch M, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L, Spillmann D, Lindahl U. (2002) **Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function.** *EMBO J*. **21** (23):6303-11.

Krupa, J.C.; Hasnain, S.; Nagler, D.K.; Menard, R.; Mort, J.S. (2002) **S'2 substrate specificity and the role of His110 and His111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B.** *Biochem. J*.**361**: 613-619

Kulke, M.H., Bergsland, E.K., Ryan, D.P., Enzinger, P.C., Lynch, T.J., Zhu, A.X., Meyerhardt, J.A., Heymach, J.V., Fogler, W.E., Sidor, C., Michelini, A., Kinsella, K., Venook, A.P., Fuchs, C.S. (2005) **Phase II study of recombinant human endostatin in patients with advanced neuroendocrine tumors.** *J Clin Oncol*. **24**: 3555-61.

Kuo CJ, LaMontagne KR Jr, Garcia-Cardena G, Ackley BD, Kalman D, Park S, Christofferson R, Kamihara J, Ding YH, Lo KM, Gillies S, Folkman J, Mulligan RC, Javaherian K. (2001) **Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NC1/endostatin domain.** *J Cell Biol*. **152** (6):1233-46.

Laufs, S.; Schumacher, J.; Allgayer, H. (2006) **Urokinase-receptor (u-PAR): An essential player in multiple games of cancer: A review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease.** *Cell Cycle*; **5**:1760-71.

Li, H.; Robertson, A.D.; Jensen, J.H. (2005). **Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values.** *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* **61**; 704-721.92004

Lim, I.T.; Meroueh, S.O.; Lee, M.; Heeg, M.J.; Mobashery, S.(2004) **Strategy in Inhibition of Cathepsin B, A Target in Tumor Invasion and Metastasis.** *J. Am. Chem Soc.* **126**: 10271-10277

Lima, A.P.C.A.; Almeida, P.C.; Tersariol, I. L. S.; Schmitz, V.; Schmaier, A.H.; Juliano, L.; Hirata, I.Y.; Muller-Esterl, W, Chagas, J.R.; Scharfstein, J. (2002) **Heparan Sulfate Modulates Kinin Release by *Trypanosoma cruzi* through the Activity of Cruzipain.** *J. Biol. Chem* **277**: 5875-5881.

Limaverde, G.S.C.S (2005) **Importância do íon Zn²⁺ para a estabilidade e especificidade da proteína antiangiogênica endostatina.** Dissertação de mestrado defendida no IBCCF em 2005.

Lindahl, U. (2007) **Heparan sulfate- protein interactions – A concept for drug design?** *Thromb Haemost* **98**: 109-115

Lins, R. D.; P. H. Hunenberger, P.H. (2005) **A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates.** *J. Comp. Chem.* **26** 1400- 1412.

Lutgens, S.P.M.; Cleutjens, K.B.J.M.; Daemen, M.J.A.P.; Heeneman, S. (2007) **Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease.** *FASEB J.* **21**: 3029-3041.

Mai, J.; Finley, R. L. Jr; Waisman, D. M; Sloane, B. F. (2000) **Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells.** *J. Biol. Chem.* **275**, 12806–12812

Mai, J.; Sameni, M.; Mikkelsen, T.; Sloane, B. F. (2002) **Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: an interaction involved in the progression of gliomas.** *Biol. Chem.* **383**, 1407–1413

Mc Donald , D., Choike, P. L .(2003) **Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic.** *Nature Med* **9**: 713-725.

McGrath, M.E., Klaus, J.L., Barnes, M.G., Brömme, D. (1997). **Crystal structure of human cathepsin K complexed with a potent inhibitor.** *Nat. Struct. Biol.* **4**: 105–9

McGrath, M.E., Palmer, J.T., Brömme, D., Somoza, J.R. (1998) **Crystal structure of human cathepsin S.** *Protein Sci.* **7**: 1294–1302.

McKerrow, J. H. (1999). **Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action.** *Int. J. Parasitol.* **29**, 833–837

Mohamed, M.M.; Sloane, B.F. (2006) **Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer.** *Nature Reviews Cancer* **6**: 764-775.

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. (1998), **Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function** *J. Computational Chemistry*, **19**: 1639-1662.

Mort, J. S.; Recklies, A. D.; Poole, A. R. (1984) **Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH.** *Arthritis Rheum.* **27**, 509-515.

Mulloy B, Forster MJ, Jones C, Davies DB. (1993) **N.M.R. and molecular-modeling studies of the solution conformation of heparin.** *Biochem J.* **293**: 849-58

Musil, D.; Zucic, D.; Turk, D.; Engh, R.A.; Mayr, I.; Huber, R.; Popovic, T.; Turk, V.; Towatari, T.; Katunuma, N.; Bode, W. (1991) **The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity.** *EMBO J.* **10**, 2321–2330.

Miyamoto, S.; Kollman, P.A. (1992) **SETTLE- an Analytical Version of the Shake and Rattle Algorithm for Rigid Water Models,** *J. Comp. Chem.* **13**: 952-962.

Nagler, D.K.; Storer, A.C.; Portaro, F.C.V.; Carmona, E.; Juliano, L.; Menard, R. (1997) **Major Increase in Endopeptidase Activity of Human Cathepsin B upon Removal of Occluding Loop Contacts.** *Biochemistry* **36**: 12608-12615.

O' Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, G., Vasios, W.S., Lane, E., Flynn, J.R., Birkhead, B.R., Olsen, Folkman, J. (1997) **Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth,** *Cell* **88**: 277–285.

Pascutti, P.G (2002). **Introdução à modelagem e Simulação por Dinâmica Molecular.** Apostila do material didático da disciplina.

Pellegrini, L., Burke, D.F., von Delft, F., Mulloy, B., Blundell, T.L. (2000) **Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin.** *Nature.* **407:** 1029-34.

Pinitglang, S., Watts, A.B., Patel, M., Reid, J.D., Noble, M.A., Gul, S., Bokth, A., Naeem, A., Patel, H., Thomas, E.W., Sreedharan, S.K., Verma, C., Brocklehurst, K. (1997) **A Classical Enzyme Active Center Motif Lacks Catalytic Competence until Modulated Electrostatically.** *Biochemistry,* **36:** 9968–9982.

Ramachandran, G; Ramakrishnan, C; Sasisekharna, V (1963) **Stereochemistry of polypeptide chain configurations.** *J. Mol. Biol.* **7:** 95-9.

Rao, V.S.R. (1988) **Conformation of Carbohydrates,** *Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.*

Reis RC, Schuppan D, Barreto AC, Bauer M, Bork JP, Hassler G, Coelho-Sampaio T. (2005) **Endostatin competes with bFGF for binding to heparin-like glycosaminoglycans.** *Biochem Biophys Res Commun.* **333** (3):976-83

Sasaki. T; Larsson H., J. Kreuger, M. Salmivirta, L. Claesson-Welsh, U. Lindahl, E. Hohenester, R. Timpl, (1999) **Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin** *EMBO J.* **18:** 6240–6248.

Sloane. B. F.; Rozhin. J.; Johnson. K.; Taylor. H.; Crissman. J. D.; Honn. K. V. (1986) **Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **83:** 2483-2487.

Song, J.; Xu, P.; Xiang, H.; Su, Z.; Storer, A.C.; Ni, F. (2000) **The active-site residue Cys-29 is responsible for the neutral-pH inactivation and the refolding barrier of human cathepsin B.** *FEBS Letters* **475:** 157-162.

Tai, K.; Shen, T.Y.; Borjesson, U.; Philippopolus, M.; Mc Cammon, J.A. (2001) **Analysis of a 10-ns molecular dynamics simulation of mouse acetylcholinesterase.** *Biophysical Journal* **81:** 715-724.

Turk, B., Dolenc, I., Zerovnik, E., Turk, D., Gubensek, F., Turk, V. (1994) **Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site.** *Biochemistry.* **33:** 14800-6.

Turk, D.; Podobnik, M.; Popovic, T.; Katunuma, M.; Bode, W.; Huber, R.; Turk, V. (1995) **Crystal Structure of Cathepsin B Inhibited with CA030 at 2.0-Å Resolution: A Basis for the Design of Specific Epoxysuccinyl Inhibitors.** *Biochemistry* **34:** 4791-4797.

Turk, B.; Turk, V.; Turk, D. (1997) **Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors.** *Biol Chem.* **378**:141–150

Turk, D., Janjić, V., Stern, I., Podobnik, M., Lamba, D., Dahl, S.W., Lauritzen, C., Pedersen, J., Turk, V., Turk, B. (2001a) **Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases.** *EMBO J.* **20**: 6570-82.

Turk, V.; Turk, B.; Turk, D. (2001b) **Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities.** *Embo J*; **20**:4629-33.

Turk, V., Turk, B., Guncar, G., Turk, D., Kos, J. (2002) Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation and cancer. *Adv. Enz. Reg.* **42**: 285-303.

Turk, D.; Guncar, G.; (2003) **Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): Promising drug targets.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**:203-13.

Van Aalten, D. M. F., Findlay, J. B. C., Amadei, A. e Berendsen, H. J. C.(1995) **Essential dynamics of the cellular retinol-binding protein - Evidence for ligand-induced conformational changes.** *Protein Engineering*, **8**, 1129-1135.

Van Aalten, D. M. F., Degroot, B. L., Findlay, J. B. C., Berendsen, H. J. C. e Amadei, A. (1997) **A comparison of techniques for calculating protein essential dynamics.** *Journal of Computational Chemistry*, **18**, 169-181.

Van der Spoel, D, Lindahl, E, Hess, B, van Buuren, A.R, Apol, E, Meulenhoff, P.J, Tieleman, D.P, Sijbers, a.L.T.M, Feenstra, K.A , van Drunen, R, Berendsen, H.J.C. (2004) **Gromacs User Manual version 3.2, www.gromacs.org.**

Van Gusteren.W. F & H.J.C Berendsen (1987) **Gronigen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual.** Biomos, Groningen.

Varughese, K.I.; Ahmed, F.R.; Carey, P.R.; Hasnain, S.; Huber, C.P.; Storer, A.C.(1989) **Crystal structure of a papain-E-64 complex.** *Biochemistry* **28**: 1330-1332.

Weiner, P., Kollman, P.A, Case, D.A, Singh, U.C, Ghio, C, Alagone, G, Profeta, S.J, Weiner, P. (1984) **A new force field for molecular simulation of nucleic acid and proteins.** *J Am Chem Soc* **106**, 785-84.

Weiner, P., Kollman, P.A, Nguyen, D.T, Case, D.A (1986) **An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids.** *J Comput Chem* **7**: 230 -52.

Whitaker, J. R. (1993) **Principles of Enzymology for the Food Sciences.** *Marcel Dekker.* 648.

Zhou, Z., Wang, Y., Bryant, S.H. (2009) **Computational analysis of the cathepsin B inhibitors activities through LR-MMPBSA binding affinity calculation based on docked complex.** *J. Comp. Chem.* Feb 25. [Epub ahead of print].

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](#)