

Laboratório Nacional de Computação Científica
Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional
Curso de Mestrado em Modelagem Computacional

ANÁLISE POR MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DA INTERAÇÃO ENTRE A
INTEGRINA $\alpha6\beta1$ E A LAMININA 111 HUMANA

Aline Rossi da Silveira

Orientação
Profa. Dra. Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos, D. Sc.
Co-orientação
Prof. Dr. Jorge Hernandez Fernandez, D. Sc.

Maio de 2007
Petrópolis, RJ - Brasil

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANÁLISE POR MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DA INTERAÇÃO ENTRE A
INTEGRINA $\alpha6\beta1$ E A LAMININA 111 HUMANA

Aline Rossi da Silveira

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO LABORATÓRIO
NACIONAL DE COMPUTAÇÃO CIENTÍFICA COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MODELAGEM
COMPUTACIONAL.

Aprovada por:

Prof^a. Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos, D.Sc.
(Presidente)

Prof. Jorge Hernandez Fernandez, D.Sc.

Prof. Ernesto Raúl Caffarena, D. Sc.

Prof^a. Thereza Christina Barja Fidalgo, D. Sc.

PETRÓPOLIS, RJ - BRASIL
MAIO DE 2007

SILVEIRA, ALINE ROSSI DA

Análise por modelagem e dinâmica molecular da interação entre a integrina $\alpha6\beta1$ e a laminina 111 humana [Rio de Janeiro] 2007

XI, 75 p. 29,7 cm (MCT/LNCC, M.Sc., Modelagem Computacional, 2007)

Dissertação – Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC

1. Modelagem molecular
2. Integrina
3. Laminina
4. Dinâmica molecular

I. MCT/LNCC II. Título (série).

*Tu te tornas eternamente responsável por
aquilo que cativas.*

Antoine de Saint Exupéry

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Profa. Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos e Prof. Jorge Hernandez Fernandez, que abriram as portas que rapidamente me encaminhariam ao tema tratado nesta dissertação e tornaram este trabalho possível. Pela orientação profissional, paciência, dedicação e gentileza, bem como pela disponibilidade e amizade demonstrada.

Aos Drs. Darcy Fontoura de Almeida e Wilson Savino, pela leitura, sugestões e críticas relevantes ao texto.

Aos colegas do LNCC, pela relação pessoal que criamos e que espero não se perca. Em especial à Cláudia Adam Ramos, pelo apoio nos momentos bons e menos bons, pela sua amizade.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

À minha família, avó, tios e primos, pelo apoio que sempre me deram.

Ao querido tio Alexander (muitas saudades), pelo incentivo para progredir. Tenho certeza que ele estaria muito feliz em partilhar mais esta vitória.

Ao Franklin, pelo apoio nos bons e maus momentos, incentivo a cumprir mais esta etapa, me ajudando no que lhe era possível. Por todo o amor e carinho, e toda a confiança depositada em mim; Pela ajuda e motivação; Pela companhia.

Agradeço acima de tudo às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, pelo amor, apoio e compreensão. Mesmo distantes, eles estiveram dentro do meu coração e constantemente presentes no meu pensamento. Sei que estão orgulhosos de mim por ter concluído mais esta fase, e este trabalho é em parte dedicado a vocês. O meu vocabulário se torna curto para expressar-lhes o meu amor.

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

ANÁLISE POR MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DA INTERAÇÃO ENTRE A INTEGRINA $\alpha6\beta1$ E A LAMININA 111 HUMANA

Aline Rossi da Silveira

Maio/2007

Orientadores: Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos
Jorge Hernandez Fernandez

Modelagem Computacional

A matriz extracelular (ECM) é definida como um complexo de proteínas e glicoproteínas que envolve as células nos mais diversos tecidos. A laminina é uma glicoproteína que é formada por três cadeias polipeptídicas dispostas em cruz. Sua função é a de ancorar as células epiteliais à ECM, da qual faz parte, através de associações a outras proteínas como as integrinas, o colágeno, a elastina e a fibronectina. As integrinas são receptores de adesão localizadas na superfície celular, que medeiam a interação célula-ECM. Estas interações são cruciais para diversos processos biológicos, tais como a diferenciação celular, a transdução de sinais, a resposta imunológica, a cicatrização de ferimentos e a formação de metástases. Porém a forma estrutural com que a interação entre a integrina e a laminina ocorre ainda não foi esclarecida. Neste contexto este trabalho visa analisar, em escala molecular, a forma com que a integrina $\alpha6\beta1$ e a laminina 111 humanas interagem. Assim, foram conduzidos vários estudos, entre eles: i) alinhamentos estruturais e seqüenciais das regiões β -*propeller* e βA de integrinas não-possuidoras de domínio I; ii) construção do modelo das regiões β -*propeller* e βA da integrina $\alpha6\beta1$ em complexo com pequenos inibidores peptídicos do tipo ECD ou RGD; iii) alinhamento entre os domínios LG de lamininas; iv) construção do modelo do domínio LG1 da laminina 111; e v) construção do primeiro modelo descrito do complexo formado pela porção N-terminal da integrina $\alpha6\beta1$ e o domínio LG1 da laminina 111. Para tanto, foram aplicadas as técnicas de modelagem por homologia e dinâmica molecular, além de alinhamentos entre as cadeias α e β de integrinas, e dos domínios LG de lamininas.

Inicialmente os resultados mostraram que o *loop* que corresponde à região entre os subdomínios D2 e D3 da cadeia $\alpha 6$ discrimina ligantes por interações eletrostáticas, e a partir disso, que a integrina $\alpha 6\beta 1$ possui interação preferencialmente com peptídeos do tipo ECDF. Foi mostrado que o domínio LG1 de laminina 111 interage com a integrina $\alpha 6\beta 1$ pelo contato da fita β “H” com o β -*propeller* de $\alpha 6$. Além disso, por seu caráter eletrostático e proximidade à fita β “H”, o resíduo Asp82 de LG1 se adere ao íon Mg^{+2} do *MIDAS* da integrina $\alpha 6\beta 1$, e que esta interação é indispensável à ligação entre as duas proteínas.

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

MOLECULAR MODELLING AND DYNAMICS ANALISYS OF HUMAN $\alpha6\beta1$
INTEGRIN AND LAMININ 111 INTERACTION

Aline Rossi da Silveira

May/2007

Advisors: Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos
Jorge Hernandez Fernandez

Computational Modelling

The extracelullar matrix (ECM) is formed by an assembly of proteins and glycoproteins which surrounds the cells, in various tissues. The laminin is a glycoprotein localized in the ECM that consists of three polypeptidic chains cross-shaped. It functions by anchoring epithelial cells to basal lamin, through associations with integrins, collagen, elastin and fibronectin. Integrins are adhesion receptors localized on cellular surface, that mediate interactions between cells and ECM. The interactions between proteins of ECM and cellular proteins are crucial for many normal biological processes such as cell differentiation, signal transduction, immune responses, wound healing and metastasis formation. The nature of interactions between laminin and integrin has not been fully identified yet. The present work aims to analyze, in an molecular scale, the interaction between human $\alpha6\beta1$ integrin and laminin 111. In this work we conducted many studies, including: i) structural and sequential alignments of β -*propeller* and β A regions in lacking I-domain integrins; ii) model building of β -*propeller* e β A regions of $\alpha6\beta1$ integrin complexed with small ECD or RGD peptide antagonists; iii) sequential alignment of various laminin LG domains; iv) model building of laminin 111 LG1 domain; and v) model building of the first described complex between the N-terminal portion of $\alpha6\beta1$ integrin and laminin 111 LG1 domain. In order to do this, homology modeling and molecular dynamics techniques were applied, together with alignments between integrins α and β chains,

and laminin LG domains. Our initial results show that the loop between blades 3 and 4 of $\alpha 6$ integrin subunit discriminates ligands by electrostatic interactions. Therefore we assumed that $\alpha 6\beta 1$ integrin preferentially interacts with ECDF based peptides. It was demonstrated that the laminin 111 LG1 domain interacts with $\alpha 6\beta 1$ integrin by the contact of this “H” β strand and $\alpha 6$ β -*propeller*. Further, by its electrostatic function and proximity to “H” β strand, LG1 residue Asp82 adheres to Mg^{+2} containing *MIDAS* in $\alpha 6\beta 1$ integrin. This interaction appears to be indispensable for $\alpha 6\beta 1$ and laminin 111 binding.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MOLÉCULAS DE ADESÃO	1
1.2. INTEGRINAS	1
1.2.1. <i>Classificação das integrinas</i>	2
1.2.2. <i>Caracterização estrutural dos domínios α e β de integrinas</i>	4
1.2.3. <i>Sítios de ligação nas integrinas</i>	6
1.2.4. <i>Interação entre as integrinas e pequenos peptídeos</i>	7
1.3. LAMININAS	7
1.3.1. <i>Caracterização estrutural das lamininas</i>	8
1.3.2. <i>Integração laminina-receptor</i>	11
1.3.3. <i>Biologia da laminina</i>	12
1.3.3 <i>Laminina 111</i>	14
1.4. MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR	14
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. MODELAGEM DA INTEGRINA $\alpha 6\beta 1$	19
3.1.1. <i>Seleção do template</i>	19
3.1.2. <i>Alinhamento entre as seqüências dos domínios β-propeller e βA das integrinas</i>	19
3.1.3. <i>Modelagem por homologia da integrina $\alpha 6\beta 1$</i>	20
3.1.4. <i>Validação e análise estrutural do modelo de $\alpha 6\beta 1$</i>	21
3.1.5. <i>Refinamento do modelo de $\alpha 6\beta 1$</i>	23
3.2. MODELAGEM DE $\alpha 6\beta 1$ EM COMPLEXO COM PEQUENOS LIGANTES PEPTÍDICOS	23
3.2.1. <i>Refinamento do modelo de $\alpha 6\beta 1$ em complexo com pequenos ligantes peptídicos</i>	24
3.3. MODELAGEM DO DOMÍNIO LG1 DA LAMININA 111	24
3.3.1. <i>Seleção do template</i>	24
3.3.2. <i>Alinhamento entre as seqüências dos domínios LG de laminina</i>	25
3.3.3. <i>Modelagem por homologia do domínio LG1 de laminina 111</i>	25
3.3.4. <i>Validação e análise estrutural do modelo do domínio LG1 da laminina 111</i>	25
3.4. CONSTRUÇÃO DO MODELO DO COMPLEXO FORMADO PELA INTEGRINA $\alpha 6\beta 1$ E O DOMÍNIO LG1 DE LAMININA 111	26
3.4.1. <i>Refinamento do complexo de $\alpha 6\beta 1$ e LG1</i>	27
3.4.2. <i>Validação e análise estrutural do modelo do complexo da integrina $\alpha 6\beta 1$ e LG1 da laminina 111</i>	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. INTRODUÇÃO	28
4.2. MODELAGEM DA INTEGRINA $\alpha 6\beta 1$	28
4.2.1. <i>Seleção do template</i>	28
4.2.2. <i>Alinhamento das seqüências dos domínios β-propeller e βA das integrinas</i>	29
4.2.3. <i>Avaliação do modelo obtido para os domínios β-propeller e βA da integrina $\alpha 6\beta 1$</i>	33
4.2.4. <i>Análise da interação integrina $\alpha 6\beta 1$ a pequenos ligantes peptídicos</i>	38
4.2.5. <i>Seletividade da integrina $\alpha 6\beta 1$ a pequenos ligantes peptídicos do tipo ECD ou RGD</i>	41
4.2.6. <i>Estudo da interação de $\alpha 6\beta 1$ a pequenos ligantes peptídicos do tipo ECD</i>	42
4.2. <i>Modelagem da laminina 111</i>	46
4.2.1. <i>Seleção do template</i>	46
4.2.2. <i>Alinhamento das seqüências dos domínios LG de laminina</i>	46
4.2.3. <i>Avaliação do modelo do domínio LG1 da laminina 111 humana</i>	48
4.3. MODELAGEM DO COMPLEXO INTEGRINA-LAMININA	51
4.3.1. <i>Construção do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e o domínio LG1 da laminina 111</i>	51
4.3.2. <i>Avaliação do modelo do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e LG1 da laminina 111</i>	54

4.3.3.	<i>Comparação entre o modelo do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e LG1 de laminina 111 e controles negativos</i>	56
4.3.3.1.	Controle negativo “fita β “F””	57
4.3.3.2.	Controle negativo “fita β “H” 2”	58
4.3.4.	<i>Análise comparativa do modelo do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e o domínio LG1 de laminina 111 e controles negativos</i>	59
4.3.5.	<i>Análise do sítio de ligação do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e o domínio LG1 da laminina 111</i>	60
5.	CONCLUSÕES	63
6.	PERSPECTIVAS	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. Introdução

1.1. Moléculas de adesão

Interações célula-célula ou célula-matriz extracelular (ECM) adjacente estão presentes em numerosos processos biológicos. É o caso por exemplo da diferenciação e migração celular, desenvolvimento embrionário, cicatrização, apoptose e metástase, para citar apenas alguns exemplos.

As moléculas de adesão são glicoproteínas ou polissacarídeos que atuam como ligantes entre o exterior e o interior da célula. Tais proteínas possuem três domínios: i) um receptor de sinalização no exterior, ii) o domínio central que atravessa a membrana, e iii) a porção interna, que intermedeia sinais de vários processos celulares [1].

As integrinas são glicoproteínas transmembranares que estão relacionadas a adesão célula-célula e célula-ECM, e serão de especial atenção neste trabalho. As Integrinas que interagem com proteínas da ECM funcionam como uma espécie de elemento transdutor bidirecional da sinalização intra e extracelular [2,3]. Processos celulares como a proliferação, a diferenciação, a apoptose, a sobrevivência e a expressão genética são influenciados pela mediação de integrinas com a ECM. Durante o desenvolvimento, as integrinas são expressas ubiquitariamente e estão envolvidas na regulação da morfogênese, movimentação celular e migração. Isto é especialmente notado durante a gastrulação, a neurulação e a histogênese [4]. A sua expressão tende a diminuir à medida que a diferenciação chega ao estágio adulto. Mais tarde funcionam como receptores na inflamação, em eventos trombóticos como a agregação plaquetária. Finalmente, as integrinas estão presentes em eventos adesivos durante a evolução do câncer (como o crescimento tumoral e a progressão, a invasão e metástase, e a malignização).

1.2. Integrinas

A nomenclatura “integrina” advém de seu posicionamento na membrana, integrando em pontos de adesão no meio extra-celular a mediação da adesão intra e extra-celulares (célula-célula e célula-ECM), além de interações patológicas. As integrinas podem ser caracterizadas do ponto de vista estrutural como sendo glicoproteínas heterodiméricas, resultantes da combinação de um componente α

(~120 a 180 kDa; >940 resíduos) e um β (~90 a 110 kDa; >640 resíduos) não covalentemente associados que constituem um complexo de aproximadamente 280 Å de comprimento quando em sua conformação estendida. São dependentes de cátions divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} ou Mn^{+2}) para exercer suas funções de adesão. A forma do domínio extracelular foi primariamente reconhecida por microscopia eletrônica [5], e mais tarde suas estruturas foram resolvidas pelas técnicas de espectroscopia por ressonância nuclear magnética (NMR), de modelagem molecular e de difração de raios X [5].

A transdução de sinal por integrinas é reconhecidamente bidirecional: ocorre seja de dentro para fora (*inside-out*) ou de fora para dentro (*outside-in*) [6]. Para iniciar o processo de adesão ECM é necessário que elas sejam ativadas. A ativação ocorre por meio de estímulos locais como mediadores solúveis (homônios, citoquinas, fatores de crescimento, entre outros) ou interfaces sólidas (ECM e outras células), e se inicia com o agrupamento dos receptores, acompanhado por modificações conformacionais nas cadeias α/β , e como resultado final a modulação de afinidade pelo o ligante [7]. No curso deste processo, há formação de placas adesivas na porção citoplasmática da membrana celular, que servem como ponto de recrutamento de proteínas (talina, veniculina, paxilina, entre outras) que promovem a cascata de ativação da actina, pequenas proteínas G, tirosina quinases e fatores de transcrição (Figura 1 e Figura 2).

1.2.1. Classificação das integrinas

A existência de múltiplas variedades α e β permite a formação de cerca de 25 heterodímeros de integrina identificados em vertebrados [5,8] (Figura 3 e Figura 4). Tal diversidade permite que uma integrina possa se associar a vários ligantes assim como um ligante possa aderir a diferentes integrinas. Desta forma a família das integrinas responde por vários tipos de atividades biológicas [9].

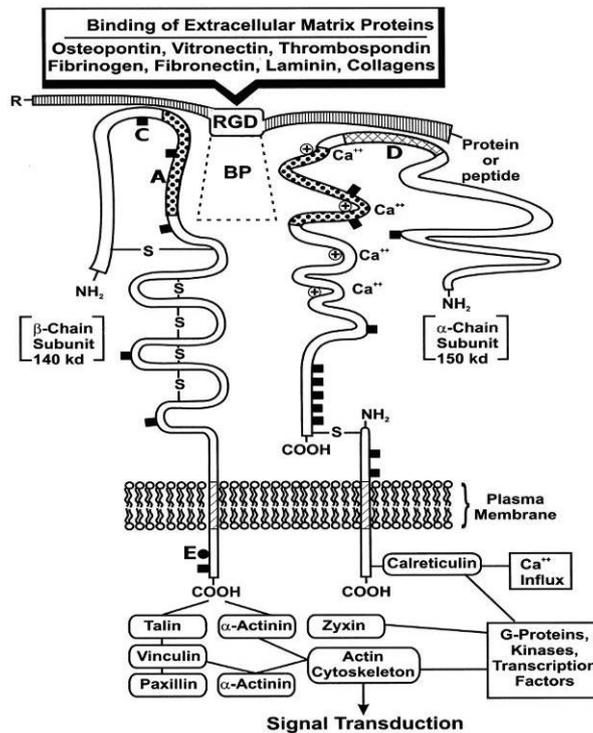


Figura 1. Representação esquemática do heterocomplexo de integrinas. As cadeias α e β estão mostradas como subunidades paralelas inseridas na membrana celular mas não-covalentemente ligadas. A proteína de ligação, BP ou *Binding Protein*, é representado por linhas pontilhadas entre as cadeias α e β . Um peptídeo de adesão RGD está entreposto entre o ligante e o sítio de ligação da integrina. Vias de transdução de sinal das cadeias α e β estão indicadas nas extremidades C-terminal intracelular do peptídeo. NH₂, N-terminal; COOH, C-terminal; A, sítio de ligação composto pelas cadeias α e β ; C, sítios de glicosilação; D, domínio I, ligante de colágeno; E, sítios de fosforilação; -S-, pontes dissulfídicas; Ca⁺⁺, íons cálcio (ou outros íons divalentes como magnésio ou manganês) (Modificada de [10]).

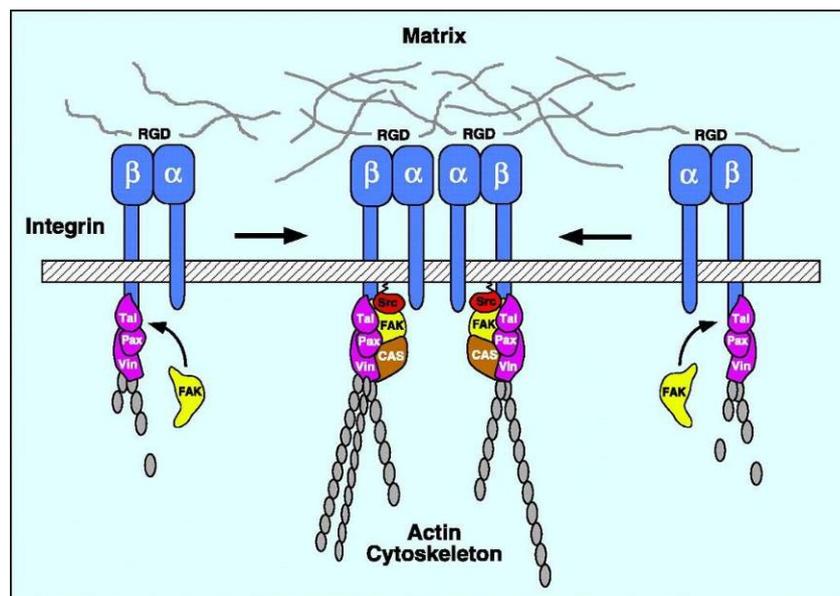


Figura 2. Esquema do agrupamento de integrinas e sua associação ao citoesqueleto para promover a integração dos meios intra e extracelular. RGD: peptídeo de ligação Arg-Gly-Asp; Tal: talina. Vin: vinculina; Pax: paxilina; CAS: proteína de adesão focal; FAK: quinase de adesão focal; SRC: proteína da família das tirosina quinases (Extraído de [11]).

Dentre os diversos ligantes da ECM às integrinas receptoras (as sindecanas, as α -dístroglicanas, o fibrinogênio, a fibronectina, entre outros) é de interesse neste trabalho a laminina, que considera-se como ligante principal à integrina $\alpha6\beta1$ [12]. Ela é constituinte normal de diversos tipos de células [13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24].

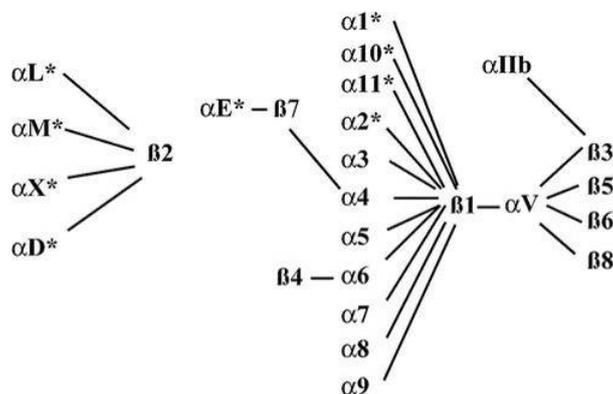


Figura 3. α e β -subunidades de diversos heterodímeros de integrinas. Proteínas possuidoras de domínio I estão identificadas por asteriscos (Extraída de [5]).

Tabela 1. Nomenclatura CD, nome do gene e da proteína das cadeias α e β das integrinas (Modificada de [25]).

NÚMERO CD	NOME DO GENE	NOME DA PROTEINA
CD18	ITGB2	INTEGRIN B-2
CD29	ITGB1	INTEGRIN B-1; VLA
CD41	ITGAB	INTEGRIN A-IIB; GPIIb
CD49a	ITGA1	INTEGRIN A-1; VLA 1a
CD49b	ITGA2	INTEGRIN A-2; VLA 2
CD49c	ITGA3	INTEGRIN A-3; VLA 3
CD49d	ITGA4	INTEGRIN A-4; VLA 4
CD49e	ITGA5	INTEGRIN A-5; VLA 5
CD49f	ITGA6	INTEGRIN A-6; VLA 6
CD51	ITGAV	INTEGRIN A-V
CD61	ITGB3	INTEGRIN B-3; Glycoprotein IIIa

1.2.2. Caracterização estrutural dos domínios α e β de integrinas

A partir da estrutura cristalizada do fragmento extracelular da integrina $\alpha v\beta 3$

com resolução de 3.2Å, Xiong *et al.* [26] descreveram a presença de uma “cabeça” ovóide e duas “caudas”, onde regiões importantes para a adesão ao ligante estão localizadas nas porções N-terminal das subunidades α e β [27] (Figura 4).

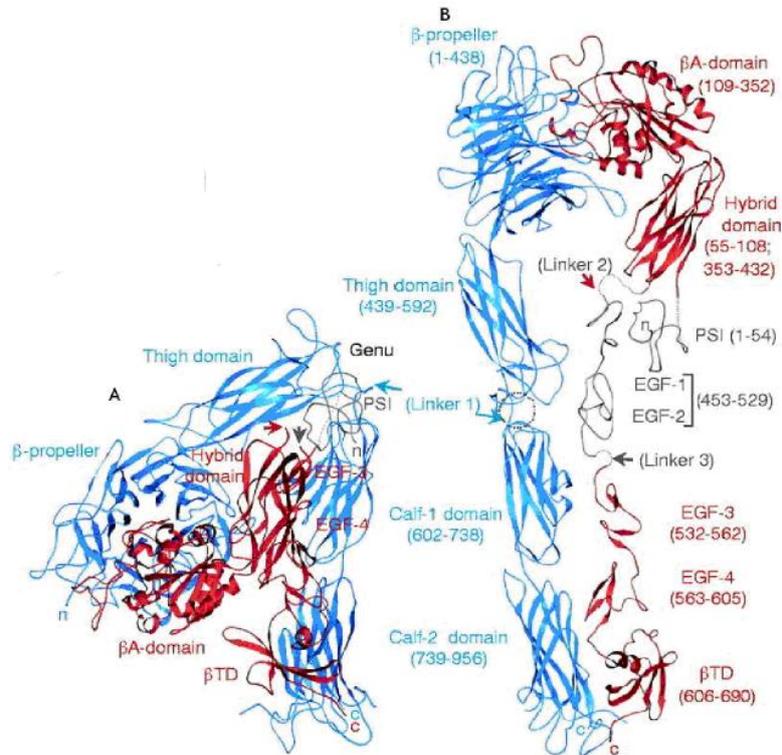


Figura 4. Estrutura da integrina $\alpha v \beta 3$. A subunidade αv é representada em azul e a subunidade $\beta 3$ em vermelho. A) Representação em fitas de acordo com dados experimentais de Xiong *et al.* [26]. B) Modelo da forma estendida da integrina. (Extraída de [26]).

Os domínios β -*propeller* (cadeia α) e βA (cadeia β) das integrinas não possuidoras de domínio I unem-se e formam uma estrutura globular (a cabeça). O primeiro domínio citado possui sete repetições que não apresentam motivo metal-ligante. É formado por 60 resíduos arranjados radialmente, contendo 4 folhas β antiparalelas cada, assim chamado por sua semelhança com hélices de motores de barco (Figura 5). O domínio βA consiste em 6 folhas β paralelas, rodeadas por 8 α -hélices [26], topologia comum presente em várias enzimas intracelulares [28]. O motivo *MIDAS* (**M**etal **I**on-**D**ependent **A**dhesion **S**ite, o sítio de adesão ao ligante dependente de íon metal) ocupa uma cavidade localizada no topo da folha β central e é o íon que diretamente coordena a cadeia lateral de um dos resíduos ácidos em todos os ligantes de integrinas. Adjacente ao *MIDAS*, encontram-se outros dois sítios

de ligação metal divalentes, requeridos para dar firmeza à adesão de ligantes ao *MIDAS*: o *ADMIDAS* - **A**djacent **MIDAS** ou *MIDAS* adjacente e o *LIMBS* - **L**igand-**I**nduced **M**etal **B**inding **S**ite ou sítio de adesão induzido pelo ligante) [11,29,30,31]. A presença desses íons no domínio β A exerce profundos efeitos na função das integrinas. Coletivamente, eles atuam como efetores, promovendo a adesão a ligantes; como antagonistas, inibindo a adesão de ligantes; e como seletores, pela modificação da especificidade de adesão de ligantes à integrina [29].

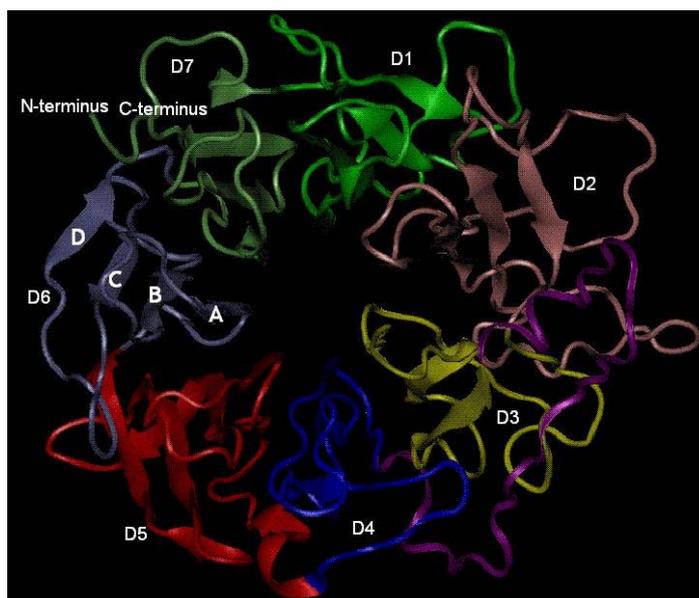


Figura 5. Representação em fitas do β -*propeller*. Os subdomínios estão numerados de D1 a D7; As fitas β estão designadas de A a D.

A cauda citoplasmática da integrina é geralmente curta e desprovida de características enzimáticas [11]. Tal porção intracelular desencadeia uma cascata enzimática associada à ativação da integrina, iniciada por estímulos locais intra (através do recrutamento de enzimas) ou extracelulares. Desta forma, as integrinas transduzem sinais através da sua associação à proteínas que as conectam ao citoesqueleto, às quinases citoplasmáticas e aos receptores transmembranares de fatores de crescimento [11].

1.2.3. Sítios de ligação nas integrinas

Aproximadamente metade das integrinas contém um domínio de

aproximadamente 200 aminoácidos, conhecido como domínio I na subunidade α , local onde se encontra o sítio de ligação nestas integrinas [5]. Nas integrinas em que este domínio está ausente, a adesão é feita pelo domínio βA na subunidade β [27], comum a todas integrinas.

Em 2002, Xiong *et al.* [27], demonstraram a presença de 4 sítios expostos ao solvente, encontrados nos *loops* entre as fitas β A-B do subdomínio 4, na interface entre os domínios α/β , e portanto, local onde forma-se o sítio de ligação a peptídeos das integrinas não possuidoras do domínio I. Cátions divalentes possuem um papel crítico a formação do sítio de ligação. Na subunidade β de $\alpha v\beta 3$ a coordenação ao metal divalente é feita pelos resíduos Asp119, Ser121, Ser123, Glu220 e Asp251 [27].

A comparação das estruturas da integrina $\alpha v\beta 3$ na ausência [26] ou presença [27] de um peptídeo cíclico RGDFV permitiu a constatação de que a adesão de ligantes à integrina é dependente da presença do *MIDAS*. O sítio *MIDAS* é ocupado pelo íon divalente apenas quando encontra-se ligado ao RGD, pois o íon não é visto na estrutura cristalográfica da integrina $\alpha v\beta 3$ sem contato com o peptídeo [26,31].

1.2.4. Interação entre as integrinas e pequenos peptídeos

As integrinas reconhecem pequenas seqüências de aminoácidos presentes nas proteínas de seus ligantes da matriz extracelular, sendo que o primeiro motivo a ser caracterizado foi a seqüência Arg-Gly-Asp, peptídeo do tipo RGD [27]. Este peptídeo é reconhecido por diversas integrinas, como $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$ e $\alpha v\beta 3$. Outras integrinas reconhecem seqüências alternativas, como seqüências de reconhecimento em colágenos e lamininas e pequenos peptídeos do tipo ECD, a exemplo da $\alpha 6\beta 1$ [10,32].

1.3. Lamininas

As lamininas fazem parte de uma família de glicoproteínas que formam uma porção integral da rede de suporte da membrana basal em quase todos os tecidos animais, e de matrizes extracelulares encontradas entre camadas celulares, classicamente conhecida como interveniente na migração celular. Além das lamininas, a membrana basal contém colágeno do tipo IV, nidógenos e proteoglicanas, como as perclaranas, agrinas e bamacanas [33,34,35].

No sistema imune a laminina esta envolvida na diferenciação, migração e

ativação de linfócitos [36]. Várias interações do sistema linfo-hematopoiético responsáveis pelos eventos citados são mediadas por receptores de superfície celular da família das integrinas, por distroglicanas, por um receptor da tirosina fosfatase, por sulfatos de heparana, e por vários outros [36,37,38,39].

1.3.1. Caracterização estrutural das lamininas

A laminina é uma proteína grande (~ 400 a ~900 kDa) formada por subunidades geneticamente distintas de cadeias α , β e γ unidas por um longo *coiled-coil*, produzindo uma molécula com um braço longo e até três outros curtos [39], em formato de cruz ou “T” (Figura 6). Os braços curtos são compostos por partes de uma das cadeias, enquanto que o longo é formado por partes de cada uma das 3 cadeias.

As subunidades distintas da laminina são constituídas por repetições de domínios em *tandem* e distribuídos em formatos globulares, cilíndricos e em *coiled-coils*. A união dos domínios *coiled-coils* é determinada de modo que cada laminina resulte de uma combinação de uma cadeia α , uma β e uma γ unidas por ligações dissulfídicas, todas contendo um certo grau de similaridade estrutural [32]. Em cada cadeia estão incluídos os domínios globulares N-terminal (LN), domínios globulares internos (L4 e IV) e no C-terminal do braço longo, o domínio globular G [32].

Vários domínios parecidos com os da laminina são encontrados em outras proteínas, porém para uma proteína ser considerada como sendo uma cadeia de laminina, a sua seqüência precisa possuir uma classificação inequívoca de uma cadeia α , β ou γ . Em particular, a presença de um domínio *coiled-coil* é essencial na definição de uma família de laminina [40].

Estudos *in vitro* permitiram que várias atividades da laminina, algumas relacionadas a determinadas seqüências e domínios, fossem identificadas. Elas podem ser classificadas em interações de matriz (polimerização, adesão a nidógenos entre outras macromoléculas da ECM) e interações da superfície celular (com glicolipídios, proteoglicanas e glicoproteínas, algumas destas com atividades receptoras). Como uma generalização, muitas interações que não estão ligadas à adesão celular (polimerização, por exemplo) encontram-se confinadas aos braços curtos de todas as três subunidades, enquanto que as interações mediadas por receptores (como integrinas) localizam-se nas porções N- e C-terminal da subunidade α (Figura 6) [41].

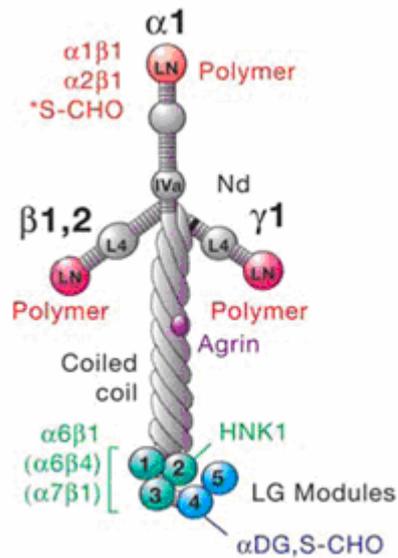


Figura 6. Organização dos domínios da laminina 111 e 121. Cada uma das cadeias colabora com a formação de um pequeno braço diferente. O braço longo consiste em todas as três cadeias formando uma estrutura helicoidal. Os braços curtos são divididos nas partes LN e L4 (onde há regiões capazes de polimerização com outras lamininas, ligação a nidógenos (Nd) e agrinas). O domínio globular G é constituído apenas pela cadeia α (LG Modules). A ancoragem à superfície celular é feita pelo contato da laminina com carboidratos sulfatados (S-CHO), α distroglicanas (α DG), heparinas (HNK-1) e algumas integrinas, como $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$. Pequena afinidade à interação está representada por asterisco. Extraída de [42].

O C-terminal da cadeia α , de especial interesse para este trabalho, é definido por um grande domínio globular (domínio G). Este domínio consiste de cinco módulos em repetição, formando β -sanduíches, denominados domínios LG1 a LG5 [40,41,43]. Cada domínio LG é formado por 180 a 200 resíduos, com moderada identidade sequencial entre si (20 a 45%). Os domínios LG1 a LG3 estão conectados a LG4-LG5 por um domínio ligante (*link*) (Figura 7). Vários sítios de ligação para receptores de superfície celular, como integrinas, estão localizados no domínio globular [44,45] e diferem significativamente em função dos variados tecidos que se encontram e/ou estágios de desenvolvimento [40].

A repetição em *tandem* de cinco domínios LG (LG1-LG5) foi inicialmente identificada no C-terminal da cadeia $\alpha 1$ de laminina [46] e subsequentemente foi demonstrada estar presente em todas as cadeias α da laminina ($\alpha 1$ a $\alpha 5$) conhecidas até hoje [47].

A primeira laminina conhecida (laminina 111), foi isolada da ECM de um camundongo portador de tumor EHS (Engelbreth-Holm-Swarm), como uma proteína de cadeias ligadas com 200 a 400 kDa [40]. A partir da clonagem molecular das três

cadeias das lamininas no final dos anos 80 vários homólogos foram isolados, revelando a grande heterogeneidade apresentada por esta proteína [45,48,49,50,51,52].

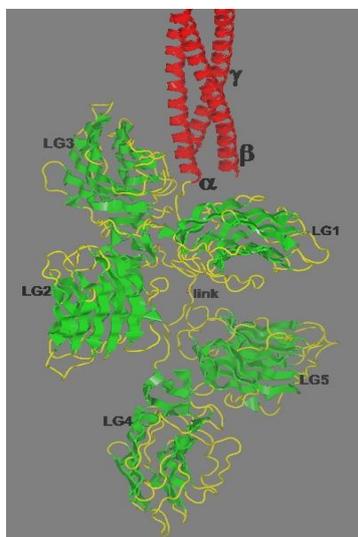


Figura 7. Modelo em fitas do domínio-G, mostrando os cinco módulos. link, domínio ligante; LG1-5, módulos de repetição. α , cadeia α ; β , cadeia β ; γ cadeia γ .

São conhecidos 16 heterotrímeros de laminina, formados pela união de cinco diferentes cadeias α , três β e três γ em humanos e camundongos [53] (Tabela 2). Algumas sofrem alterações por proteólise fisiológica ou são alternativamente processadas, resultando na produção de variados subtipos tissulares. O processamento alternativo é particularmente proeminente para as cadeias α_3 , β_3 e γ_2 [43,54], porém também foi demonstrada a sua ocorrência na cadeia α_4 da laminina [55] mas não em α_1 . A cadeia α_4 , e possivelmente a região L4 (Figura 6) das cadeias β podem ser modificadas quando aderidas à glicosaminoglicanas [54,56].

A trimerização entre as cadeias de laminina ocorre devido ao grande número de repetições seqüenciais de sete resíduos, que permite interações hidrofóbicas e polares entre elas [57].

A cadeia α_1 da laminina, um componente das lamininas 111 e 121, é expressa em blastocistos e em rins no início da embriogênese [58,59]. A cadeia α_2 , um componente das lamininas 211, 213 e 221, é expressa nos músculos cardíaco e esquelético, nos nervos periféricos, no cérebro e nos capilares [60]. A cadeia α_3 , um componente das lamininas 332, 3B32, 311 e 321, é encontrada na pele e outros epitélios [61]. Componente das lamininas 411, 421 e 423, a cadeia α_4 é detectada em

capilares e na musculatura lisa [62]. Miner *et al.* [53] observaram que a cadeia $\alpha 5$, presente nas lamininas 511, 521, 522 e 523, é expressa em múltiplos tecidos durante o desenvolvimento e em capilares de diversos epitélios. Mutagêneses sítio-dirigidas demonstraram que a cadeia α da laminina é imprescindível para a perfeita organização dos tecidos e para a diferenciação embriogênica [63,64].

Tabela 2. Nomenclatura das 16 lamininas conhecidas (Extraída de [53]).

PADRÃO	ABREVIADA	ANTIGA
$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	111	1
$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	211	2
$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	121	3
$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	221	4
$\alpha 3A\beta 3\gamma 2$	332 ou 3A32	5 ou 5A
$\alpha 3B\beta 3\gamma 2$	3B32	5B
$\alpha 3A\beta 1\gamma 1$	311 ou 3A11	6 ou 6A
$\alpha 3A\beta 2\gamma 1$	321 ou 3A21	7 ou 7A
$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	411	8
$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	421	9
$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	511	10
$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	521	11
$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	213	12
$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	423	13
$\alpha 5\beta 2\gamma 2$	522	-
$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	523	15

1.3.2. Integração laminina-receptor

A interação entre os receptores e as lamininas, possibilita a formação da arquitetura dos tecidos e órgãos. Esta arquitetura é constituída de lamininas interligadas, formando um polímero semelhante a uma rede integrada também por moléculas de colágeno do tipo IV interligadas, e pelas interações individuais de lamininas, nidógenos, perclaranas, entre outros componentes (Figura 8). Tais ligações são propriedades inerentes às unidades protoméricas e são consequência da ação em

conjunto do sistema formado pelas várias proteínas encontradas na ECM [65,66,67], largamente mediadas por receptores de matriz [68].

A ancoragem da membrana basal às células e tecidos é dada através da ação mútua entre a arquitetura distinta das isoformas da laminina, interações com receptores de superfície e fenótipo celular. Uma falha ou uma desregulação nesta arquitetura pode acarretar problemas no desenvolvimento celular. Mutações em cadeias de lamininas, podem levar a doenças genéticas humanas por exemplo, várias formas de distrofia muscular resultam da mutação ou deleção dos genes codificadores das subunidades $\alpha 2$, $\beta 1$ ou $\gamma 2$; por outro lado mutações no gene codificador da laminina 332 leva à epidermólise bolhosa [1].

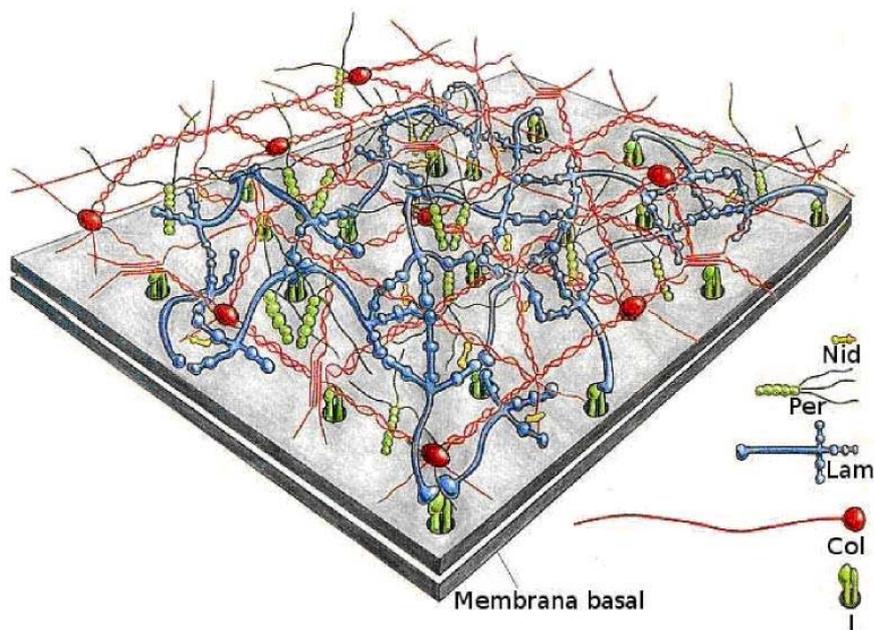


Figura 8. Rede da laminina e outros polímeros, mostrando a arquitetura das moléculas. Nid, nidógeno; Per, perclarana; Lam, laminina; Col, colágeno do tipo IV; I, integrina. (Modificada de [32])

1.3.3. Biologia da laminina

As interações adesivas entre as células e a membrana basal são fundamentais para o desenvolvimento, a diferenciação e a manutenção dos tecidos [69]. A membrana basal está presente na interface entre o epitélio e o tecido conjuntivo adjacente, em torno das fibras musculares, das células adiposas, e na bainha de mielina.

No organismo adulto, a laminina desempenha um papel não apenas estrutural, funcionando como base de sustentação e filtro molecular [70], mas também se constitui em um importante substrato em processos migratórios fisiológicos, como o deslocamento de células do sistema linfo-hematopoético.

A laminina é o primeiro componente da membrana basal a aparecer durante o desenvolvimento embrionário, com vastas funções biológicas, como a manutenção da membrana basal, a adesão celular, a progressão de tumores, a angiogênese e a metástase [71]. Algumas das funções da laminina estão relacionadas a domínios específicos da molécula, que possivelmente possuem diferentes efeitos sobre as células.

Foi demonstrado que a laminina apresenta a capacidade de se autopolimerizar *in vitro*, independentemente da presença de outros constituintes da membrana basal ou da superfície celular [72]. Estudos do processo de polimerização da laminina em pH ácido e neutro revelaram que em pH ácido o processo é instantâneo, irreversível e independente da concentração da proteína [73]. A produção no laboratório de matrizes de laminina polimerizadas abriu a possibilidade de se estudar *in vitro* as respostas celulares promovidas por esta proteína. Foi descrito por Freire *et al.* que a laminina polimerizada em pH ácido promove o crescimento neurítico 10 vezes mais eficiente que a laminina neutra [73]. Com a utilização de fragmentos específicos da molécula foi possível demonstrar que o polímero ácido era formado apenas por interações entre os braços curtos, restritas a um único plano espacial. Por outro lado, nos polímeros neutros também ocorriam interações entre os braços longos que promoviam a formação de agregados de estrutura tridimensional.

Existem evidências de que as respostas a substratos de laminina polimerizados de formas distintas possam possuir relevância fisiológica. A organização espacial das proteínas ECM modulam o sinal recebido pelas células [74,75]. Cukierman *et al.* [76] mostraram que fibroblastos aderem melhor e são largamente estimulados a proliferar em substratos tridimensionais, enquanto que em substratos previamente planarizados proliferam menos, porém aumentam seletivamente sua capacidade migratória. Células endoteliais colocadas em um substrato de tamanho restrito entram em apoptose, enquanto podem se diferenciar em estruturas tubulares ou proliferar à medida que se aumenta o espaçamento entre os depósitos de proteínas da ECM fornecidas como substrato [77,78,79]. Tanto no caso dos fibroblastos quanto no das células endoteliais fica claro que as diferentes respostas não podem ser explicadas apenas pelo reconhecimento específico ao nível molecular, uma vez que decorrem de interações mediadas pelos mesmos ligantes e receptores. Sendo assim,

as diferenças na transdução de sinal são devidas provavelmente à distribuição diferencial dos sítios de interação ligante-receptor.

1.3.3 Laminina 111

O heterotrímero de laminina 111 é uma molécula em formato de cruz (Figura 6), estrutura básica das lamininas, com pequenas modificações entre as isoformas. Uma das diferenças estruturais encontradas entre as cadeias α é a extensão de cinco módulos de domínios globulares (LG). Embora tais módulos sejam encontrados em vários outros componentes da ECM, as cadeias β e γ não os possuem, apesar de serem encontradas outras semelhanças com a cadeia α , como os domínios globulares N-terminal (LN).

As integrinas $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$ possuem sítios de ligação localizados no N-terminal da cadeia $\alpha1$ da laminina, porém é pequena sua contribuição na adesão celular, e os papéis desempenhados por esta interação *in vivo* ainda não foram bem esclarecidos. O domínio globular (G) possui adesão para a maior parte das células. Esta adesão é mediada largamente pelas integrinas $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$ e $\alpha7\beta1$ dependendo do tipo celular estudado [80].

Dentre todas as cadeias α de laminina, o domínio G da laminina 111 é a região que possui maior número de receptores de adesão celular [81]. A região compreendida pelos domínios LG1-LG3 possui potente atividade de adesão celular mediada pelas integrinas $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$ e $\alpha7\beta1$ [16,82,83]. Já o fragmento contendo os domínios LG4-LG5 também da cadeia $\alpha1$ da laminina, promovem a adesão de heparinas, sindecanas e α distroglicanas [84,85,86]. Para identificar os sítios de adesão na laminina 111, Nomizu *et al.* [87] utilizaram 673 peptídeos sintéticos cobrindo toda a proteína. O grupo encontrou por volta de 20 seqüências com atividade adesiva, incluindo as que interagem com a integrina $\alpha6\beta1$, destas todas são localizadas na porção globular e mais especificamente entre os domínios LG1-LG3 (Figura 7).

1.4. Modelagem e dinâmica molecular

Em 1956 foi determinada pela primeira vez uma seqüência protéica, a da insulina bovina. Desde então, estudar a função, estrutura e modo de ação das proteínas em processos celulares é de grande importância nas ciências biológicas

moleculares.

Métodos experimentais como a difração de raios X ou NMR, possuem um papel indispensável na correta compreensão dos mecanismos bioquímicos das proteínas, na elaboração de modelos experimentais, na construção de relações filogenéticas, no desenho de fármacos, no desenvolvimentos de vacinas, dentre vários outros.

Em 1972 foi criado o primeiro banco de dados contendo estruturas de proteínas, conhecido como banco de dados de proteínas (Protein Data Bank - PDB [88]). Este banco disponibiliza coordenadas atômicas de proteínas, oriundas de diversos organismos, descrevendo até o final de 2006 a estrutura de cerca de 40 mil proteínas, associadas aos mais diversos processos biológicos. Porém a quantidade de dados estruturais não é proporcional ao número de seqüências identificadas. A análise das coordenadas atômicas das proteínas cuja estrutura é conhecida, permitiu que fossem estimados cerca de 1000 enovelamentos protéicos, representando o conjunto básico de topologias usadas pela natureza em suas funções biológicas. Evidentemente, muitas proteínas ainda terão sua estrutura tridimensional descoberta, é possível que novos enovelamentos ainda sejam desvendados, porém aparentemente a maioria dos enovelamentos existentes na natureza são conhecidos até o momento. Ao mesmo tempo parece cada vez mais evidente a estreita relação entre estrutura e função de biomoléculas, sugerindo que dados valiosos podem ser observados por seus motivos estruturais, surgindo então a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas à resolução estrutural.

Na falta de estruturas experimentalmente determinadas, a modelagem comparativa ou modelagem por homologia pode fornecer modelos tridimensionais úteis para uma proteína relacionada a pelo menos uma estrutura conhecida. Este método prediz a estrutura tridimensional de uma dada seqüência (alvo) baseada no alinhamento seqüencial com uma ou mais proteínas cujas estruturas sejam conhecidas (*template*).

Diferentemente de outras metodologias, como *ab initio*, a modelagem comparativa pode prever a estrutura tridimensional de uma proteína com uma acurácia comparada à de uma estrutura experimentalmente determinada com boa resolução [89], baseada em duas observações:

- i) A estrutura de uma proteína é determinada por sua seqüência de aminoácidos [90], e baseado nesta teoria, em tese, seria possível obter-se a estrutura conhecendo-se a seqüência.
- ii) Durante a evolução, a estrutura é mais estável e passível de

modificações muito mais lentamente que a seqüência a ela associada, mostrando que seqüências similares adotam estruturas homólogas, e que mesmo seqüências pouco relacionadas ainda podem manter estruturas parecidas [91]. Enquanto o percentual de resíduos idênticos entre duas seqüências se encontrar na região dita como “segura” (pelo menos 30% de identidade), é provável que elas tenham uma estrutura similar.

A modelagem comparativa pode ser considerada útil a fim de obter-se informação sobre proteínas de interesse. Por exemplo, modelagem teórica pode contribuir no desenho de mutantes para testar hipóteses acerca da função de determinada proteína [92], identificação de um dado sítio ativo [93], identificar, desenhar e melhorar ligantes para um determinado sítio ativo [94], dentre outras aplicações.

Na prática, a metodologia da modelagem por homologia é um processo composto basicamente pelas seguintes etapas:

- i) Busca por seqüências homólogas e alinhamento inicial da seqüência alvo com a(s) seqüência(s) *template(s)*.
- ii) Correção do alinhamento.
- iii) Geração do modelo.
- iv) Validação do modelo.
- v) Modelo final.

Através da simulação do movimento de um sistema de partículas aplicada a macromoléculas biológicas, pela aplicação da técnica de dinâmica molecular (DM), são obtidas as trajetórias dos átomos de uma determinada proteína em meio aquoso ou no vácuo em função do tempo. Com a utilização de ferramentas computacionais, as propriedades físicas macroscópicas e locais podem ser observadas, a fim de se obter informações de processos dinâmicos que ocorrem em sistemas biológicos, como:

- Estabilidade da estrutura protéica [95].
- Modificações conformacionais [96].
- Empacotamento de proteínas [97].
- Transporte de íons em sistemas biológicos, como membranas [98,99,100].

DM é uma técnica de simulação computacional usada para reproduzir a movimentação de partículas que permite o acompanhamento temporal de todos os átomos através da integração das equações clássicas de movimentos. Cada átomo pode ser especificado em termos de suas posições e momentos, interagindo entre si ao longo do tempo, segundo as leis da mecânica clássica, ou mais especificamente a

lei de Newton:

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i \quad (1)$$

para cada átomo i em um sistema composto por N átomos. Na equação, m_i é a massa do átomo, $\vec{a}_i = \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2}$ é a aceleração, e \vec{F}_i é a força atuando sobre ele e \vec{r}_i é a posição.

Os átomos “movem-se” através de potenciais de interação na simulação, chocando-se uns contra os outros (em um sistema fluido), de um modo bastante similar ao que acontece na realidade. As equações são resolvidas simultaneamente em pequenos espaços de tempo, tomando-se o devido cuidado para que a pressão e temperatura do sistema mantenham os valores desejados. Nos sistemas moleculares, submetidos à simulações por DM contidos neste trabalho, o solvente é representado explicitamente. As interações eletrostáticas são calculadas pelo Método de Ewald, ou PME, que permite que uma determinada partícula interaja com as demais do sistema e com todas as suas imagens.

Mais detalhes sobre o método de simulação por DM podem ser encontrados em Brendsen e van Gunsteren [101], Allen e Tildesley [102] e van Gunsteren [103].

2. Objetivo

Esta dissertação tem por objetivo compreender os mecanismos funcionais da interação entre o domínio LG1 da laminina 111 humana e os domínios β -*propeller* e β A da integrina α 6 β 1, a fim de se estudar a complementaridade estrutural entre estas duas proteínas.

Neste trabalho foi construído o primeiro modelo do complexo de interação entre a integrina α 6 β 1 e a laminina 111, pela:

- i) Construção de um modelo utilizando a metodologia de modelagem por homologia da cabeça da integrina α 6 β 1 humana (domínios β -*propeller* e β A).
- ii) Construção de um modelo utilizando a metodologia de modelagem por homologia do domínio da laminina 111 humana com o qual a integrina α 6 β 1 se liga.
- iii) Construção de um modelo do complexo formado pela cabeça da integrina α 6 β 1 e o domínio LG da laminina 111.
- iv) Realização de inferências sobre a estrutura dos domínios de interação das proteínas em estudo.

3. Materiais e métodos

Neste capítulo, serão descritas as metodologias e ferramentas utilizadas para a modelagem dos domínios β -*propeller* e β A da integrina $\alpha 6\beta 1$ e do domínio LG1 da laminina 111 humana.

3.1. Modelagem da integrina $\alpha 6\beta 1$

A metodologia de modelagem por homologia é constituída basicamente por quatro etapas sucessivas: a identificação da(s) proteína(s)-molde (*template*), o alinhamento entre as seqüências, a construção das coordenadas e a validação do modelo. A seguir serão descritos os processos utilizados em cada uma das etapas.

3.1.1. Seleção do *template*

O passo inicial na modelagem comparativa é identificar todas as proteínas relacionadas à seqüência alvo, selecionando quais serão usadas como *template*. As seqüências correspondentes aos domínios β -*propeller* da cadeia $\alpha 6$ (SWISS-PROT [94] P23229, resíduos de 1 a 439) e β A da cadeia $\beta 1$ (P05556, resíduos de 111 a 334) de integrina humana foram selecionadas para a criação do modelo da cabeça da integrina $\alpha 6\beta 1$. O programa *BlastP* [104], que busca por regiões contendo similaridade local entre duas seqüências, foi utilizado na busca por estruturas *template*, para a aplicação da metodologia de modelagem molecular comparativa. Este programa compara as seqüências de proteínas contra bancos de dados (no caso o utilizado foi o Protein Data Bank ou PDB). As estruturas das integrinas $\alpha v\beta 3$ (PDB 1L5G) [27] e $\alpha IIb\beta 3$ (PDB 1TXV) [105] foram selecionadas como *template*, dadas suas similaridades seqüenciais mais significativas à $\alpha 6\beta 1$.

3.1.2. Alinhamento entre as seqüências dos domínios β -*propeller* e β A das integrinas

O programa ClustalW [106], com as suas configurações padrão, foi utilizado para o alinhamento múltiplo entre as seqüências dos *templates* αv (1L5G), αIIb (1TXV) e $\alpha 6$ (P23229). Para a região β A, foi feito alinhamento entre as seqüências

correspondentes $\beta 1$ (P05556) e $\beta 3$ (1L5G), para a construção do modelo da região compreendida pela cabeça da integrina $\alpha 6\beta 1$.

Visando investigar possíveis diferenças entre as regiões de β -*propeller* de algumas integrinas não possuidoras de domínio I, foi realizado o alinhamento entre duas isoformas de $\alpha 6$ (P23229 e P23229-6) e outras duas de $\alpha 7$ (Q13683 e Q13683-4), além das seqüências de $\alpha 11b$ (P08514) e αv (P06756).

3.1.3. Modelagem por homologia da integrina $\alpha 6\beta 1$

Uma vez que o alinhamento entre as seqüências alvo e *template(s)* tenha sido feito, a modelagem por homologia foi empregada para a construção do modelo 3D da proteína alvo. O método utilizado foi o de modelagem pela satisfação de restrições espaciais. Este método calcula as restrições espaciais da estrutura *template*, e usando o alinhamento entre as seqüências alvo e *template*, as aplica à seqüência alvo. Tais restrições geralmente são obtidas assumindo que as distâncias e ângulos correspondentes entre os resíduos alinhados no *template* e no alvo são similares. O modelo é então derivado da minimização das violações de todas as restrições, e é construído pela imposição dessas restrições de ângulos e distâncias na seqüência alvo, derivadas do alinhamento com a(s) estrutura(s) *template*, através da otimização da função objetiva no plano Cartesiano.

Nesta etapa, foi utilizado o alinhamento entre as seqüências de $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 11b\beta 3$, além do arquivo contendo as coordenadas das estruturas *template* (1L5G e 1TXV). Estes são os arquivos utilizados pelo programa MODELLER 8v1 [107] para a construção automática do modelo pela metodologia de modelagem por homologia.

Como a estrutura de $\alpha v\beta 3$ não possui uma α -hélice na porção N-terminal do domínio βA , importante para a estabilidade estrutural e como esta região corresponde aos resíduos de 334 a 352 em $\alpha 11b\beta 3$, esta estrutura foi incluída como *template* para a construção do domínio βA do modelo de $\alpha 6\beta 1$. Desta forma pudemos assegurar uma maior confiabilidade na estrutura do modelo.

Para a cabeça da integrina $\alpha 6\beta 1$ (domínios β -*propeller* e βA) foram construídos 10 modelos. Destes o escolhido foi o de menor valor de energia interna que é calculado pelo próprio programa MODELLER. A visualização dos arquivos PDB foi feita através dos programas VMD [108] e NOC [109].

3.1.4. Validação e análise estrutural do modelo de $\alpha\beta 1$

A qualidade de um modelo determina quanta informação pode ser extraída dele. Desta forma estimar a acurácia de modelos 3D é essencial para interpretá-los. Um requisito básico para um modelo é ter uma boa qualidade estereoquímica.

Toda estrutura secundária pode ser descrita pelos ângulos de torção ϕ e ψ (Figura 9), que são repetidos a cada aminoácido, ao longo da cadeia polipeptídica. Os valores permitidos desses ângulos, ou aceitáveis para estruturas tridimensionais das proteínas, para que não haja conflitos estéricos, são, usualmente, demonstrados graficamente pelo gráfico de Ramachandran [110] (Figura 10). A maioria das combinações de ϕ e ψ representam combinações proibidas para a cadeia polipeptídica e apenas três regiões do diagrama são fisicamente acessíveis à maioria dos resíduos [111] (Figura 10).

De posse do modelo dos domínios β -*propeller* e βA de $\alpha\beta 1$, a avaliação da qualidade estereoquímica e validação da estrutura foi analisada pelo programa PROCHECK, na sua versão 3.5 [112]. Este programa analisa a torção dos ângulos ϕ e ψ da cadeia principal de uma determinada proteína, e usa percentagens de ocupação no gráfico de Ramachandran como resultado de suas análises. Este gráfico é particularmente útil na validação porque ele define os resíduos que estão nas regiões estereoquimicamente mais favoráveis e desfavoráveis, e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas.

O PROCHECK também avalia o comportamento das cadeias principal e lateral da proteína analisada, comparado à estruturas em resolução similar. Alguns parâmetros são analisados tais como: os comprimentos de ligação, a planaridade dos anéis de cadeias laterais e das ligações peptídicas, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, os ângulos torcionais das cadeias principal e lateral, o impedimento estérico entre pares de átomos não-ligados e a qualidade do gráfico de Ramachandran.

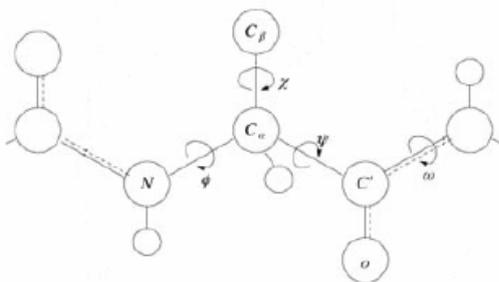


Figura 9. Ligação peptídica de dois aminoácidos consecutivos. Os ângulos torcionais ϕ e ψ permitem que cada plano formado por esta ligação gire em relação aos seus vizinhos.

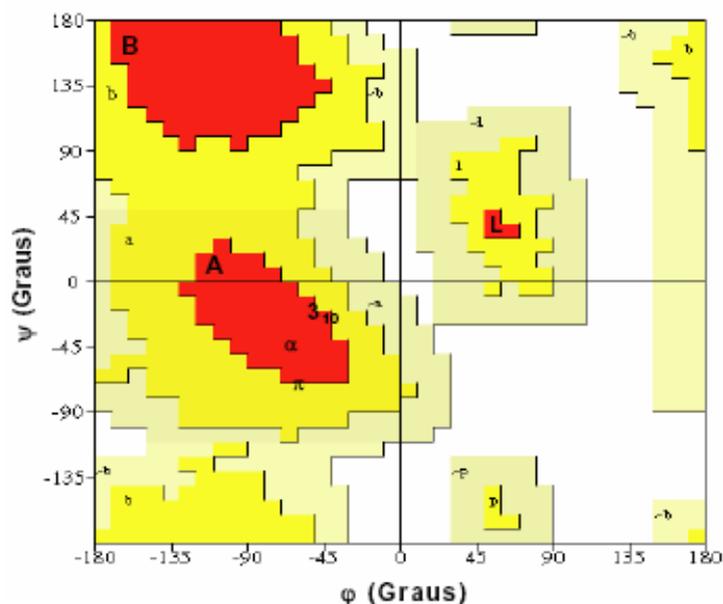


Figura 10. Gráfico de Ramachandran, no qual estão mostradas as regiões fisicamente permitidas para os aminoácidos. É possível identificar regiões de estrutura secundária. A- Regiões de α hélices mais favoráveis; a – Regiões de α hélices adicionalmente permitidas; ~a – regiões de α hélices generosamente permitidas; B – regiões de folhas β mais favoráveis; b - regiões de folhas β adicionalmente permitidas; ~b - regiões de folhas β generosamente permitidas; L – regiões de α hélices de mão esquerda mais favoráveis; l – regiões de α hélices de mão esquerda adicionalmente permitidas; ~l – regiões de α hélices de mão esquerda generosamente permitidas; p – regiões para Glicinas adicionalmente permitidas; ~p – regiões para Glicina generosamente permitidas (Modificado de [113])

A análise da qualidade do gráfico de Ramachandran é baseada em 118 estruturas experimentais com pelo menos 2,0 Å de resolução. Para estas estruturas, dada a baixa temperatura em que elas foram obtidas e seu conseqüente estado não relaxado, espera-se que pelo menos 90% de seus resíduos (excluindo-se as Glicinas) encontrem-se nas regiões mais favoráveis. Porém, para modelos teóricos e refinados, dado o estado relaxado dos ângulos de suas cadeias laterais e portanto diferentes aos

experimentais, é usual somarmos as porcentagens obtidas para resíduos posicionados nas regiões mais favoráveis e nas regiões adicionalmente permitidas a fim de se obter a porcentagem que avalia a qualidade do modelo.

3.1.5. Refinamento do modelo de $\alpha 6\beta 1$

O modelo da porção N-terminal da integrina $\alpha 6\beta 1$ foi refinado pela aplicação de metodologia de DM utilizando o pacote GROMACS 3.3.1 [114], em precisão simples e condições periódicas de contorno ou CPC [115], utilizando *clusters* de processadores Itanium2 de 1.5 GHz e rodando em sistema operacional *Linux*. Precedendo as simulações de DM, o modelo foi solvatado e centralizado em uma caixa d'água octaédrica com ~90000 átomos de água no modelo SPC [116], e foi aplicado o campo de força GROMOS96 53a6 [117]. Com a finalidade de neutralizá-lo, quando necessário foram adicionados ao sistema íons Cl^- e/ou Na^+ , em quantidades suficientes para alcançar a concentração de 0,001 mol/litro de acordo com o volume de solvente contido na caixa.

O sistema formado por $\alpha 6\beta 1 + \text{Mg}^{+2} + \text{H}_2\text{O} + \text{sal}$ (~97000 átomos) foi então submetido à minimização de energia aplicando-se 2 mil passos pelo método de máximo declive [118], sem restrições, para a remoção de contatos de van der Waals mal posicionados. Posteriormente o sistema foi submetido a 150 *ps* de DM sem restrições, e estendida por mais 300 *ps*. Pelo *ensemble* NTP, a temperatura foi mantida constante pelo tratamento termostático de Berendsen [119] à 400 K e pressão de 1 atm, procedidos por mais 300 *ps* à 312 K e mesma pressão, com um passo de integração de 1 *fs*. As interações eletrostáticas foram calculadas pelo Método de Ewald (PME – *Particle Mesh Ewald*) [120] com um *cutoff* de 9 Å. As coordenadas de todos os átomos do sistema foram escritas a cada 5 *ps*, para a análise das trajetórias.

Para a análise de *cluster* das trajetórias obtidas, foi utilizado o *script g_cluster* (todos os *scripts* utilizados neste trabalho estão incluídos no pacote GROMACS), e o modelo final foi obtido a partir da estrutura média do *cluster* mais representativo (*cutoff* de 2 Å).

3.2. Modelagem de $\alpha 6\beta 1$ em complexo com pequenos ligantes peptídicos

As coordenadas para a criação do modelo da cabeça da integrina $\alpha 6\beta 1$ em complexo a pequenos ligantes peptídicos (ECDF, RGDF, PECDFP, DCDF e ECDW)

foram extraídas da estrutura de $\alpha\upsilon\beta3$ em complexo com o peptídeo cíclico RGDFV (PDB 1L5G). Cada modelo foi criado utilizando a metodologia de modelagem por homologia, já descrita anteriormente (seção 3.1).

3.2.1. Refinamento do modelo de $\alpha6\beta1$ em complexo com pequenos ligantes peptídicos

A preparação dos sistemas formados por $\alpha6\beta1 + \text{Mg}^{+2} + \text{peptídeo} + \text{H}_2\text{O} + \text{sal}$ foi idêntica à citada na seção 3.1.5. Para os sistemas formados pela integrina $\alpha6\beta1$ e os peptídeos ECDF e RGDF, o tempo total de simulação aplicado sem restrições foi de 550 *ps*. Deste total, 100 *ps* foram aplicados à temperatura de 400 K e pressão constante de 1 atm, neste caso a dinâmica de relaxamento. Já para a DM de produção foram simulados 450 *ps* à temperatura de 312 K e à mesma pressão.

Os modelos de $\alpha6\beta1$ em complexo com os peptídeos PECDF, DCDF e ECDW foram submetidos a um tempo total de DM (aplicada sem restrições) padronizado em 3 *ns*. Destes os 100 *ps*, a dinâmica de relaxamento, foram aplicados à temperatura de 400 K e pressão constante de 1 atm. Durante os 2.900 *ps* restantes, a DM de produção foi aplicada ao sistema à temperatura de 312 K e à mesma pressão.

A avaliação das distâncias entre os resíduos, observadas durante os experimentos de DM, foi feita com o *script g_mindist*. O *cutoff* considerado, para todas as simulações neste trabalho, para as pontes de hidrogênio, as pontes salinas e as interações eletrostáticas foi de 3,2 Å, 4,0 Å e 4,0 Å, respectivamente.

As análises das médias para os termos de interação de Coulomb (Coulomb-SR) e Lennard-Jones (Lennard-Jones-SR), medidas para o conjunto formado pelas cadeias α e β da integrina e o peptídeo, foram realizadas utilizando o *script g_energy*. O servidor PISA [121], foi utilizado para examinar os valores do ΔG entre as cadeias da integrina $\alpha6\beta1$ e o peptídeo contatante, além da área de contato entre eles.

3.3. Modelagem do domínio LG1 da laminina 111

3.3.1. Seleção do *template*

A partir da seqüência da cadeia $\alpha1$ de laminina 111 humana, P25391, foi selecionada a região compreendida pelo domínio LG1 (resíduos de 2117 a 2297). O programa *BlastP* mostrou que LG1 de laminina 111 possui maior identidade à

estrutura do domínio LG4 de laminina 211 de camundongo (PDB 1DYK [122]).

Embora a identidade entre os domínios LG4 e LG5 seja relativamente baixa, há um alto grau de conservação estrutural entre eles. Isto permite que as coordenadas da estrutura resolvida (PDB 1DYK) sejam extrapoladas aos outros membros da superfamília de domínios LG com alta confiabilidade [122].

3.3.2. Alinhamento entre as seqüências dos domínios LG de laminina

A estrutura do domínio LG4 de laminina 211 murina (PDB 1DYK) foi utilizada como *template* para a modelagem do domínio LG1 de laminina 111, e a partir da utilização do programa ClustalW foi composto o alinhamento entre elas. A fim de identificar a conservação entre regiões de contato entre a integrina e a laminina, foi realizado um alinhamento múltiplo. Para este alinhamento foram utilizadas as seqüências correspondentes aos domínios LG1 a LG5 das lamininas: 211 de camundongo (Q60675); 111 humana (P25391); 111 de camundongo (P19137), totalizando 15 seqüências.

3.3.3. Modelagem por homologia do domínio LG1 de laminina 111

A metodologia de modelagem por homologia utilizada para a construção do modelo do domínio LG1 de laminina 111 foi semelhante à empregada na construção do modelo da integrina $\alpha 6\beta 1$.

Na estrutura dos domínios LG4 e LG5 de lamininas 211 e 111 murina há a presença de dois íons Ca^{+2} (um em cada domínio) [122,123]. Porém em comunicação pessoal com um dos autores desses estudos, foi esclarecido que ainda não há evidência experimental que comprove a sua presença nos outros domínios LG tanto nas lamininas murinas citadas, quanto em outras lamininas. Assim tais íons foram desconsiderados para a construção do modelo do domínio LG1 de laminina 111 humana.

3.3.4. Validação e análise estrutural do modelo do domínio LG1 da laminina 111

De posse do modelo de menor energia interna, a avaliação e a validação foram feitas pela utilização do programa PROCHECK, empregando a mesma

metodologia já descrita na seção 3.1.4.

3.4. Construção do modelo do complexo formado pela integrina $\alpha6\beta1$ e o domínio LG1 de laminina 111

A partir do modelo dos domínios β -*propeller* e βA da integrina $\alpha6\beta1$ (refinado) e o modelo do domínio LG1 da laminina 111, foi construído o complexo formado pelas duas proteínas. O programa Swiss-pdbViewer [124], através do emprego de *docking* manual, foi utilizado para a construção do modelo do complexo. O modelo do domínio LG1 da laminina 111 foi manualmente docado ao modelo da cabeça da integrina $\alpha6\beta1$, através do posicionamento de seu resíduo Asp82 em proximidade ao *MIDAS* da cadeia $\beta1$, a uma distância menor que 4 Å. Como demonstrado por Ido *et al.* [125], a laminina 511 humana perde cerca de 60% a sua capacidade de adesão à integrina quando o resíduo Asp82 de seu domínio LG3 é mutado. Então, dada a importância de Asp82 na adesão da laminina à integrina $\alpha6\beta1$, considerou-se este resíduo como chave para o contato entre LG1 e a integrina $\alpha6\beta1$.

A partir do posicionamento inicial de Asp82 em contato com o *MIDAS*, o domínio LG1 foi disposto em contato com a integrina de modo que a fita β “H” mantivesse em contato com o β -*propeller* de $\alpha6\beta1$.

Foram construídas 3 variantes do complexo. Após a aplicação de 2000 passos de minimização de energia pelo método de máximo declive, cada modelo foi submetido a 500 ps de DM para relaxamento, à temperatura de 400K e pressão de 1 atm, sem restrições. Foi então selecionado o modelo em que LG1 estava melhor posicionado à $\alpha6\beta1$, quanto aos parâmetros de distância entre Asp82 e *MIDAS* e de contatos entre a fita β “H” e o β -*propeller* (proximidade da fita β “H” ao *loop* de interação a ligantes no β -*propeller*).

Para demonstrar a viabilidade do complexo descrito acima, foram criados outros dois modelos, como controles negativos, mantendo em ambos o posicionamento inicial de Asp82 em contato com o *MIDAS*. Em um deles, o LG1 foi paralelamente posicionado ao eixo arbitrário, formado entre as cadeias α e β da integrina, de modo que a fita β “H” não mantivesse contato com o β -*propeller* de $\alpha6$. Já para o segundo modelo, o domínio da laminina foi posicionado de forma que a fita β “H” estivesse exposta ao solvente e a fita β “F”, posicionada oposta à fita β “H” no domínio LG1, em contato com o β -*propeller*. Ambos posicionamentos de LG1 desacordam à literatura, dado que no primeiro não há contato entre a fita β “H” e o β -

propeller, demonstrado por Nomizu *et al.* [87] como existente. No segundo modelo construído como controle negativo, não há descrição na literatura sobre contato entre a fita β “F” de domínios LG e integrinas.

3.4.1. Refinamento do complexo de $\alpha6\beta1$ e LG1

Ao modelo do complexo formado por $\alpha6\beta1$ e LG1 (~ 8.500 átomos) foi aplicada metodologia semelhante à descrita na seção 3.1.5.

O sistema formado por $\alpha6\beta1$ +LG1+Mg⁺²+H₂O+sal (formado por ~ 108.500 átomos) foi então submetido à minimização de energia, para remoção de contatos de van der Waals mal posicionados, sem restrições. Assim, foram aplicados ao sistema 2 mil passos de minimização utilizando o algoritmo BFGS [126], e mais 2 mil passos pelo método de máximo declive. Para o relaxamento do sistema, 150 ps de DM sem restrições foi aplicado, com temperatura de 400 K e pressão de 1 atm. A DM de produção (também sem restrições) foi feita através da aplicação ao sistema de 5.850 ps de simulação, sob temperatura de 312K e à mesma pressão.

A energia de interação foi monitorada através da separação do complexo em grupos formados por LG1 e $\alpha6\beta1$ (*script make_ndx*), e posterior acompanhamento dos valores de energia (*script g_energy*). As análises de distâncias e clusterização foram feitas através da mesma metodologia já descrita.

A partir da estrutura média do *cluster* mais representativo, foram feitas as análises da superfície de contato e ΔG entre os domínios, calculados através do programa PISA.

3.4.2. Validação e análise estrutural do modelo do complexo da integrina $\alpha6\beta1$ e LG1 da laminina 111

A partir do modelo final do complexo formado pela integrina $\alpha6\beta1$ e o domínio LG1 da laminina 111, a etapa de validação foi feita da mesma forma que a descrita na seção 3.1.4.

4. Resultados e discussão

4.1. Introdução

Simulações de DM permitem a construção de modelos baseados em condições bem próximas ao experimental. Desta forma elas tornam viável o estudo de regiões onde a experimentação não é possível.

A aplicação da técnica de DM possibilitou o exame das modificações conformacionais das interações eletrostáticas, hidrofóbicas e aromáticas e de superfície de contato intermolecular nas proteínas estudadas. Esta técnica em conjunto com a avaliação de grandezas macroscópicas, como diferenças de energia de interação, constitui uma ferramenta imprescindível para os estudos pormenorizados abordados neste trabalho.

As análises aqui discutidas têm seus fundamentos em estatísticas sobre os conjuntos de trajetórias geradas pela DM e já foram aplicadas em outros estudos semelhantes do tipo proteína/ligante, inclusive para outras integrinas [105,127,128]. Vale ressaltar que a aplicação dessas técnicas pode constituir uma alternativa a mais de investigação, tão confiável e eficiente quanto técnicas modernas de bioquímica porém mais rápida, automática e de baixo custo.

Neste trabalho, foi construído um modelo do complexo da integrina $\alpha6\beta1$ com o domínio LG1 da laminina 111 humana, que inicialmente uniu observações disponíveis na literatura com conclusões inovadoras. Desta forma foi possível o desenvolvimento do conhecimento sobre a forma com que aquelas duas proteínas interagem, questão que ainda não foi claramente respondida.

4.2. Modelagem da integrina $\alpha6\beta1$

4.2.1. Seleção do *template*

Com o objetivo de construir modelos da estrutura tridimensional da porção N-terminal da integrina $\alpha6\beta1$ o programa *BlastP* foi usado para comparar as seqüências de aminoácidos de $\alpha6$ (P23229) e de $\beta1$ humanas (P05556) depositadas no banco de dados SWISS-PROT com as estruturas resolvidas experimentalmente no PDB. Foram encontrados 32% de identidade e 10% de *gaps* entre a cadeia $\alpha6$ e αv da integrina

resolvida por difração de raios X, na resolução de 3.2 Å (PDB 1L5G) [27]. Entre as cadeias $\beta 1$ e $\beta 3$ da mesma estrutura, foram encontradas 54% de identidade e 1% de *gaps* sendo que estes resultados permitem a aplicação da metodologia a seguir. Esta é a única estrutura de integrina não possuidora de domínio I depositada no PDB que está em contato com inibidor peptídico, permitindo a comparação das regiões responsáveis pela adesão no β -*propeller* e βA .

4.2.2. Alinhamento das seqüências dos domínios β -*propeller* e βA das integrinas

Alinhamentos seqüenciais e estruturais foram utilizados com a finalidade de construir um perfil estrutural das integrinas não possuidoras de domínio I. Assim foram comparadas as estruturas primárias das integrinas $\alpha 6$ (P23229), $\alpha 7$ (Q13683), αv (P06756) e αIIb (P08514).

Algumas integrinas, como a $\alpha 6$, são expressas em variantes extracelulares resultantes do *splicing* alternativo de *exons* em tecidos humanos [19]. A comparação entre as seqüências de duas isoformas de $\alpha 6$ com outras cadeias α de integrinas mostrou que ela é mais similar à $\alpha 7$ (57% de identidade). Esta integrina também apresenta variação por *splicing* alternativo, em regiões equivalentes à $\alpha 6$ [129] (Figura 11).

Tais variantes, codificadas à uma região localizada entre os subdomínios D3 e D4, formam parte do sítio de adesão no β -*propeller*, embora o papel específico desempenhado por elas ainda não foi totalmente esclarecido. Como ambas integrinas ($\alpha 6$ e $\alpha 7$) aderem-se à laminina [129] e parecem possuir características estruturais semelhantes, é possível o envolvimento dessas variações na adesão a outros ligantes. Investigações experimentais são necessárias para a total elucidação da importância das isoformas em integrinas.

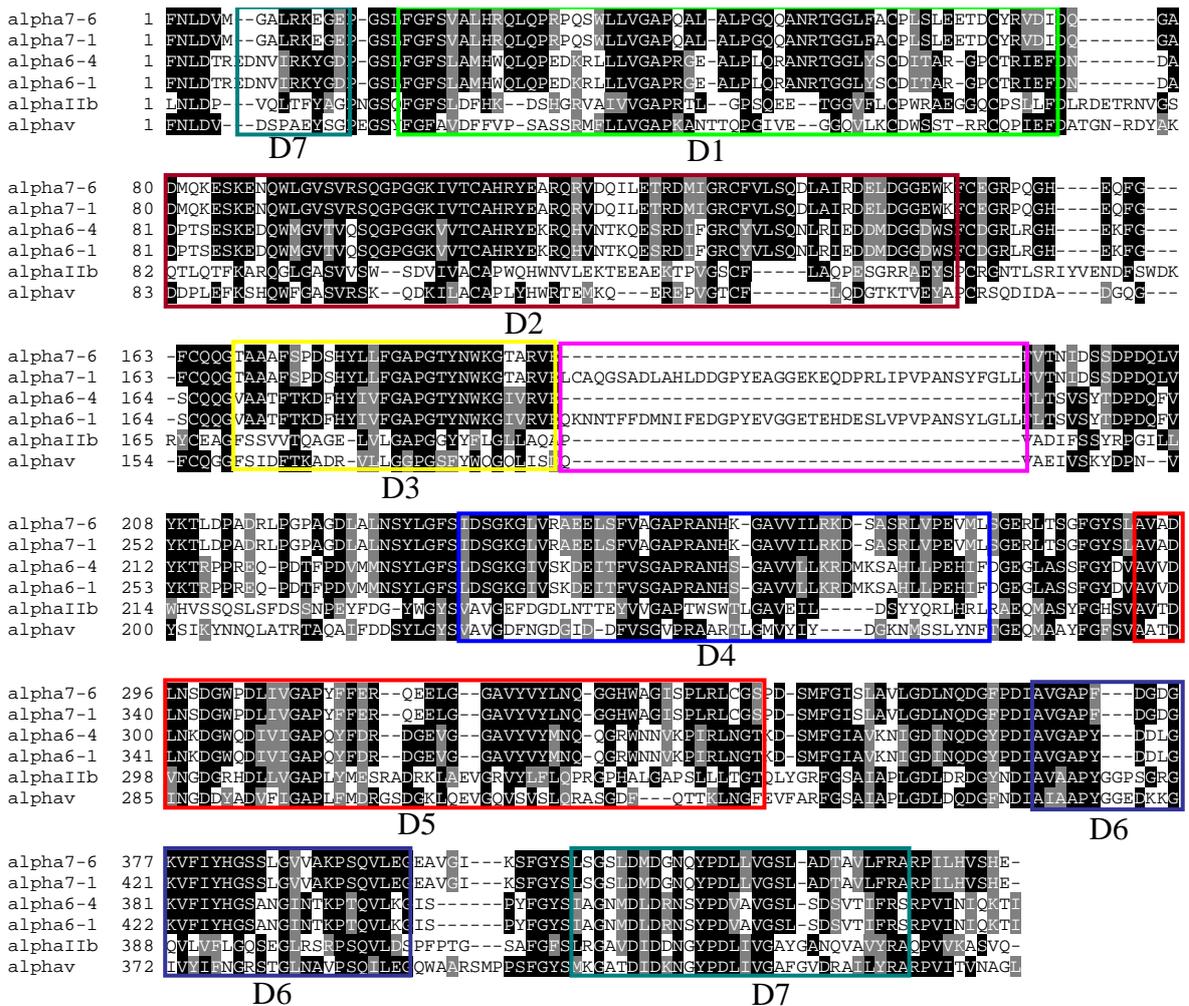


Figura 11. Alinhamento comparativo entre as seqüências das isoformas de $\alpha 6$ (P23229-1 e P23229-6), $\alpha 7$ (Q13683-1, Q13683-4), αv e $\alpha 1Ib$. Cada subdomínio está numerado de D1 a D7. As inserções que ocorrem nas seqüências das isoformas de $\alpha 6$ P23229-1 e $\alpha 7$ Q13683-1 estão assinaladas pelo retângulo rosa.

O alinhamento comparativo das estruturas primária e secundária da porção N-terminal da integrina $\alpha 6$, αv (*template*) e $\alpha 1Ib$ utilizou as seqüências de $\alpha 6$ (P23229), αv (P06756) e $\alpha 1Ib$ (P08514), além de informações estruturais de $\alpha v\beta 3$, disponíveis em <http://www.PDB.org/PDB/explore.do?structureId=1L5G>. Xiong *et al.* [27] identificaram os aminoácidos Asp150 (localizado entre os subdomínios D2 e D3) e Asp218 (localizado entre os subdomínios D3 e D4) como sítios de adesão no β -*propeller* de αv . Este alinhamento mostra que embora a identidade entre as seqüências de $\alpha 6$ e αv seja de 32%, a estrutura secundária é conservada. Além disso as 6 Cisteínas encontradas no β -*propeller* da estrutura *template* estão conservadas em $\alpha 6$. Estes achados reforçam a possibilidade de utilização da técnica de modelagem

por homologia.

É notável a distinção eletrostática entre as duas integrinas $\alpha 6$ e αv . Enquanto αv apresenta um núcleo de resíduos negativamente carregados próximos a Asp150 (QDIDAD), em $\alpha 6$ observa-se, nesta mesma região, a ocorrência de resíduos positivamente carregados (RLRGHE) (Figura 12). Em $\alpha 6$ há a presença de uma Metionina alinhada ao Asp218 de αv , em uma posição favorável a contatos hidrofóbicos (e não eletrostáticos). Isto sugere que a região de adesão a peptídeos em $\alpha 6$ seja o único sítio de contato no β -*propeller* de $\alpha 6$ (Figura 12).

O alinhamento das regiões correspondidas pelo βA da cadeia $\beta 1$ com $\beta 3$ revelou uma alta conservação, de modo que todos os resíduos coordenadores do MIDAS em $\beta 3$ [27] estão alinhados a seus idênticos no modelo $\beta 1$, chamados D19, S21, S23, E120 e D130 (Figura 13A). Como muitos dos resíduos localizados em sítios de adesão ao MIDAS foram determinados por experimentos de mutagênese sítio-dirigida, a identidade inerente a este alinhamento garante a preservação do padrão de coordenação do MIDAS na estrutura *template*. Fica claro que a topologia total do *template* foi extrapolada ao modelo (Figura 13B); sendo assim, todos os cinco resíduos estão topologicamente em posições idênticas aos resíduos de coordenação ao metal do *template*. Além disto, as Cisteínas estão conservadas, permitindo a extrapolação de suas coordenadas do *template* para o modelo, o que reforça a qualidade do modelo obtido para $\beta 1$.

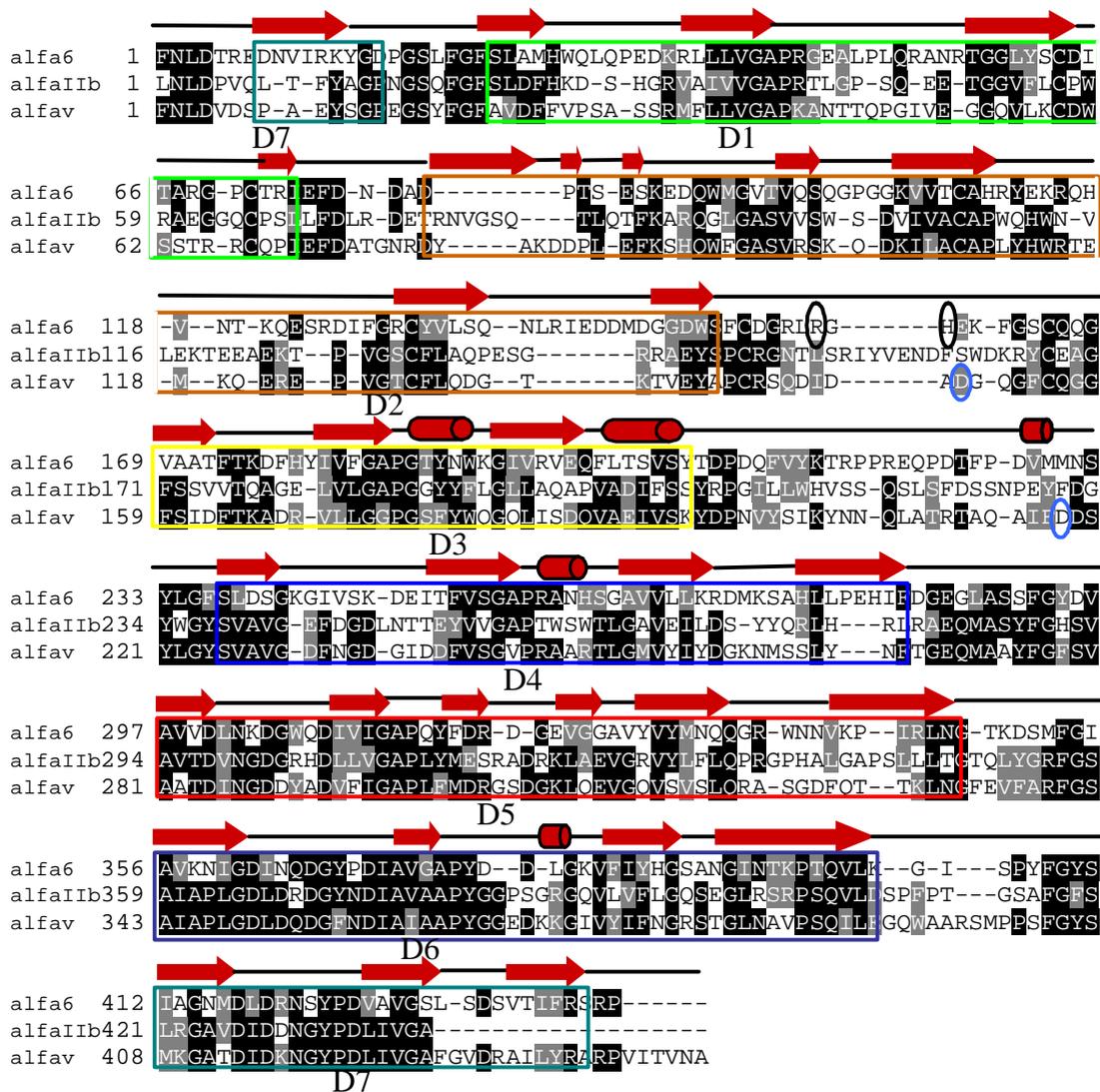


Figura 12. Alinhamento entre as seqüências do β -propeller de $\alpha 6$, $\alpha I I b$ e αv . Cada subdomínio está numerado de D1 a D7. A estrutura secundária está representada por: setas, fita β ; cilindro, α -hélice; reta, loop; círculos pretos e azuis designam os aminoácidos responsáveis pelo sítio de ligação em $\alpha 6$ e αv , respectivamente.

```

beta 3      111 FVDIYYLMDLSYSMKDDIWSIQNLGTRKLTATQMRKLTSNLRIGFCAFVDKPEVSPYMYTSPPEALBNPGYDMKTTGLPMFGY
beta 1      1  PFDLYYLMDLSSYSMKDDIENVKSLGTDLMNEMRRITSDFRIGFGSFVEKTIWMPYITSTIE-AKLRNPGTSEQN-CTTPEFSY
consensus  * * . ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

beta 3      191 KEVLTITLDQVTRFNEBVKKQSVSRNRPAPEGGFDAIMQATVQDEKIGWRNDASHLLVFTITDAKTHETALDGRITAGIVQEND
beta 1      91 KNVLSLTINKGEVFNELVKKQRISGNLDSPEGGGFDAIMQVAVCGSLIGWRN-VIRLLVFSITDAGFFHACDGNLGGIVLQEND
consensus  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

beta 3      271 GQCHVGSNDNHSASTIMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTENVVNLYQNYSELTPGCTITVGVLS
beta 1      171 GQCHLEN-NMYIMSHYYDPSIAHLVCKLSENNICITIFAVTEEFQPVYKELKNLIERKSAVGLTS
consensus  **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

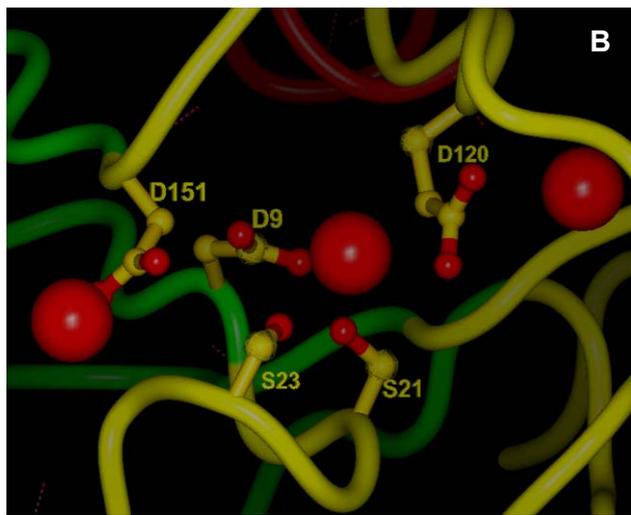


Figura 13. (A) Alinhamento das seqüências $\beta 3$ e $\beta 1$. As setas indicam os aminoácidos responsáveis pela coordenação do sítio MIDAS. (B) Representação em fitas do domínio βA , mostrando os resíduos críticos associados à coordenação do MIDAS.

4.2.3. Avaliação do modelo obtido para os domínios β -propeller e βA da integrina $\alpha 6\beta 1$

O primeiro modelo para as subunidades α e β da integrina $\alpha 6\beta 1$ foi construído por modelagem por homologia utilizando-se o programa MODELLER, das regiões correspondentes aos aminoácidos 1 a 439 e 111 a 334, respectivamente (estes renumerados de 1 a 223), responsáveis pelo sítio de ligação. Os outros domínios, tanto para a cadeia α quanto para β (EGF-1, EGF-2, Calf, Thigh), foram desconsiderados pois estão minimamente definidos no *template*. Desta forma, a focalização nas regiões responsáveis pela adesão aos ligantes produz uma melhora significativa no modelo obtido.

A estrutura obtida foi então avaliada com PROCHECK (Figura 14). Pode-se observar que as taxas de ocupação no gráfico de Ramachandran para as regiões mais favoráveis do modelo foram superiores a 95%. Em contraste, a percentagem de

resíduos em duas regiões desfavoráveis é bem menor que o nível aceitável considerado para modelos construídos por modelagem por homologia. As estruturas das cadeias principal e lateral também são consideradas bem posicionadas, quando comparadas à estruturas experimentais com a mesma resolução (no caso 3,2 Å) (Figura 15A e B). Estes resultados, em conjunto com os resultados observados no gráfico de Ramachandran, mostram que o modelo obtido para os domínios β -propeller e β A da integrina $\alpha6\beta1$ é de aceitável qualidade estereoquímica.

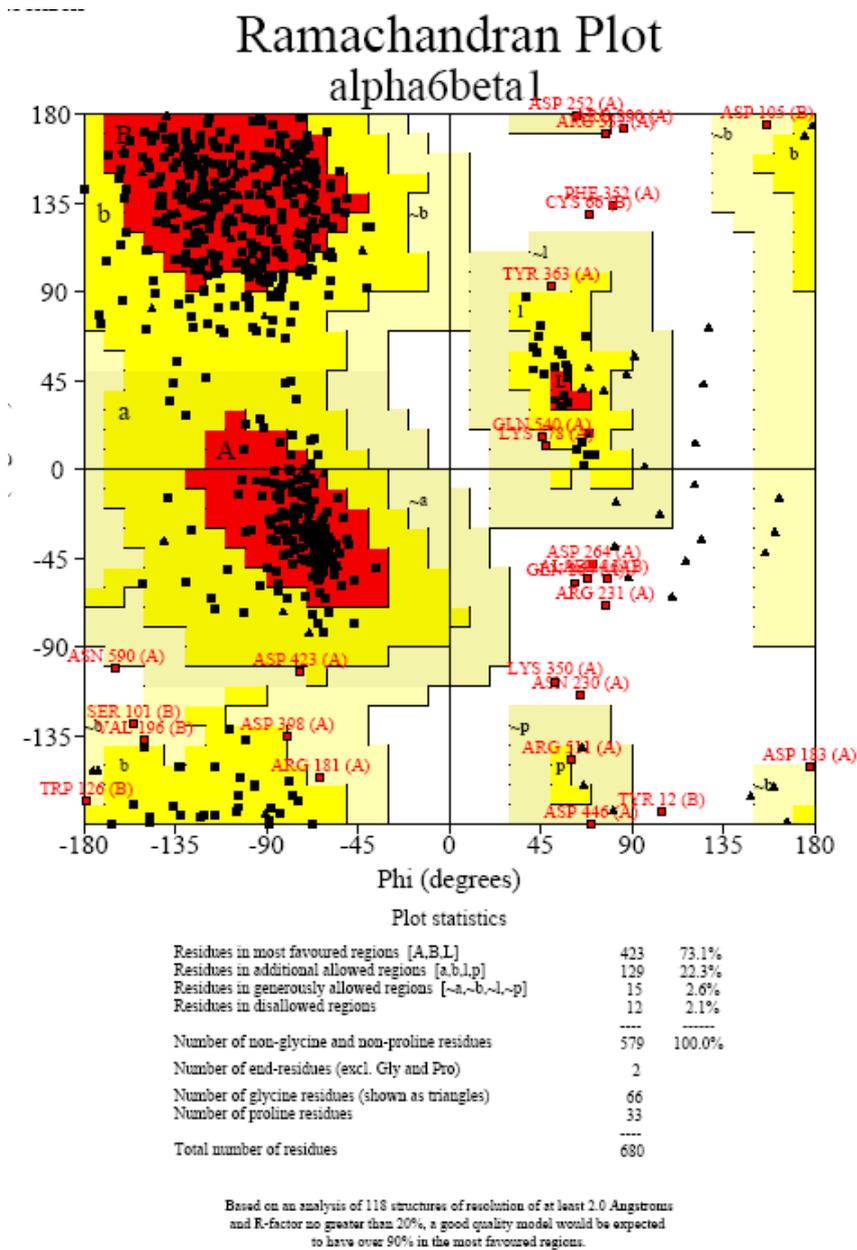


Figura 14. Dados dos ângulos ϕ e ψ de cada resíduo da estrutura $\alpha6\beta1$ fornecidos pelo gráfico de Ramachandran.

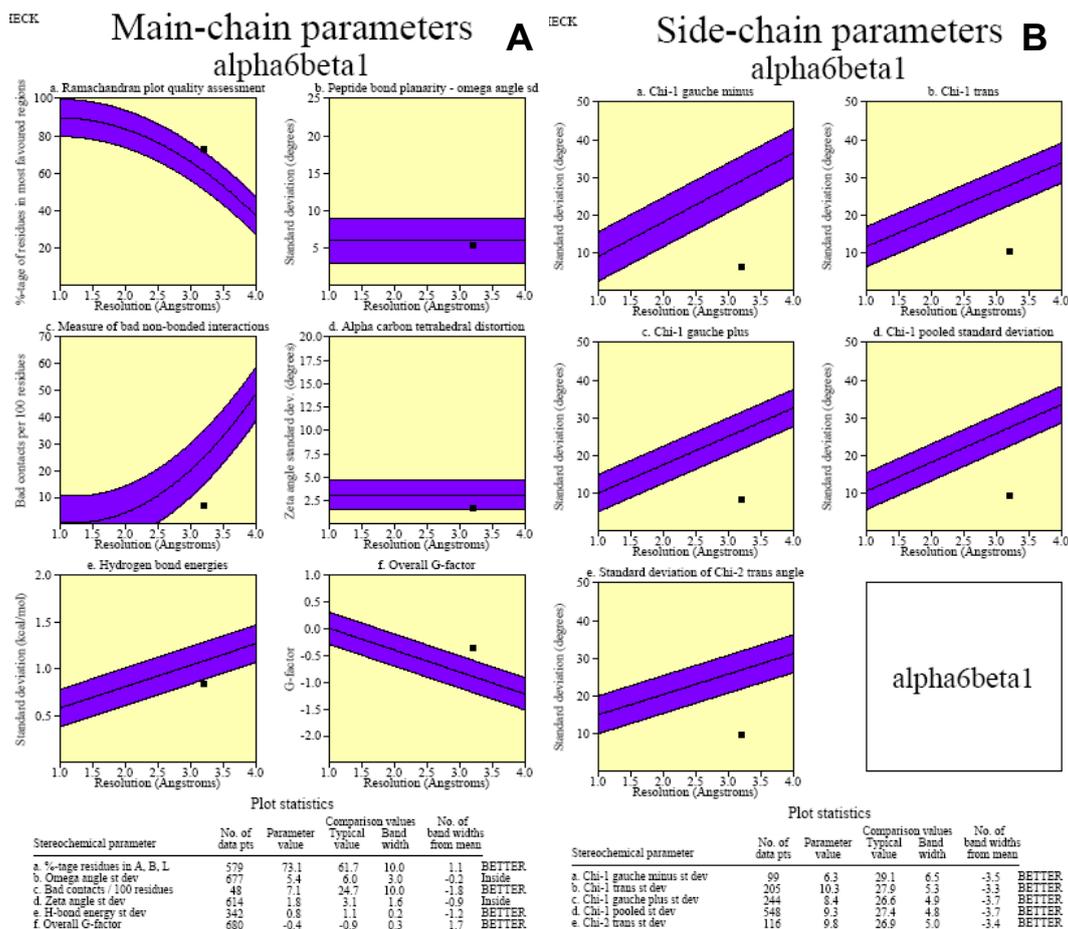


Figura 15. Conjunto de gráficos mostrando o comportamento da estrutura $\alpha 6\beta 1$ (representada pelos pequenos quadrados negros) comparado a estruturas bem refinadas em resolução similar (no caso 3,2Å), para a cadeia principal (A) e para a cadeia lateral (B).

A região de interface entre as cadeias α e β da integrina (calculada utilizando-se o servidor PISA) mostrou que a área total de contato entre os domínios β -propeller e βA de $\alpha 6\beta 1$ é de 1616,7 Å², valor pouco menor que o observado na estrutura de $\alpha \nu \beta 3$ (1689,8 Å²). O ΔG , calculado pelo mesmo programa, obteve -130.21 e -95.45 kJ mol⁻¹ para as estruturas de $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha \nu \beta 3$, respectivamente. Estes resultados reforçam a qualidade do modelo quando comparado à estrutura experimental.

A Figura 16 mostra a sobreposição estrutural do modelo $\beta 1$ com a proteína *template* $\beta 3$ (PDB 1L5G). A alta conservação entre as estruturas nesta região ratificar a qualidade do modelo de $\beta 1$ apesar do tamanho dos *loops* ao seu redor estarem alterados. Um exame detalhado do tipo de resíduos envolvidos revelou que a maioria dos aminoácidos polares encontra-se na superfície da proteína, enquanto que o núcleo é formado principalmente por resíduos hidrofóbicos. Este padrão é condizente

com os padrões encontrados em estruturas protéicas experimentalmente determinadas.

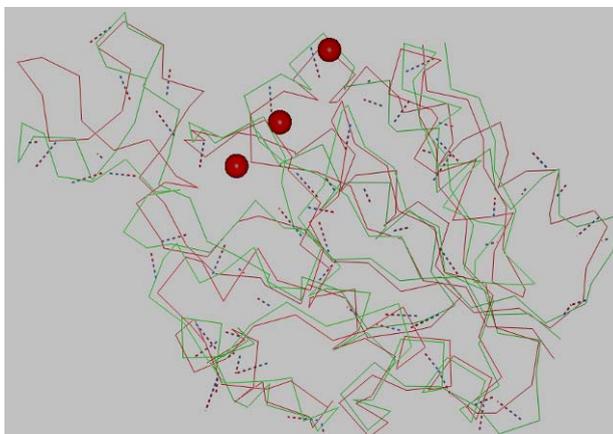


Figura 16. Sobreposição das estruturas de $\beta 1$ (vermelho) e $\beta 4$ (verde). Círculos vermelhos, indicam Mg^{+2} .

A identidade de 32% entre as seqüências do *template* e do modelo do β -*propeller* justifica a observação de regiões discrepantes, a maior parte das quais formada por *loops* (Figura 17).

Xiong *et al.* [27] verificaram que os aminoácidos responsáveis pela adesão do peptídeo cíclico RGDFV no β -*propeller* de αv localizam-se nos *loops* entre os domínios D2-D3 (Asp150) e D3-D4 (Asp218). No modelo de $\alpha 6$, a zona de contato com o ligante peptídico se restringe ao *loop* D2-D3, que apresenta resíduos positivamente carregados (Arg157 e His159) (Figura 18 e Figura 19). Neste sítio, conforme anteriormente observado no alinhamento (Figura 12), um Ácido Glutâmico (Glu160) corresponde ao Asp150 de αv . Porém por análise estrutural foi observado que este aminoácido encontra-se localizado em uma região do *loop* distante do sítio de ligação em $\alpha 6$, a aproximadamente 10 Å do peptídeo. Ao contrário, His159 encontra-se adjacente, a menos de 5 Å do primeiro resíduo do peptídeo ligante, e possivelmente está envolvida na adesão a ligantes. Tais resultados reforçam a teoria de que existe distinção eletrostática entre as integrinas comparadas, além da demonstração de que Glu160 não faz parte do sítio de ligação no β -*propeller* de $\alpha 6$. Esta dualidade eletrostática será posteriormente apresentada no estudo da associação de $\alpha 6\beta 1$ a pequenos ligantes peptídicos.

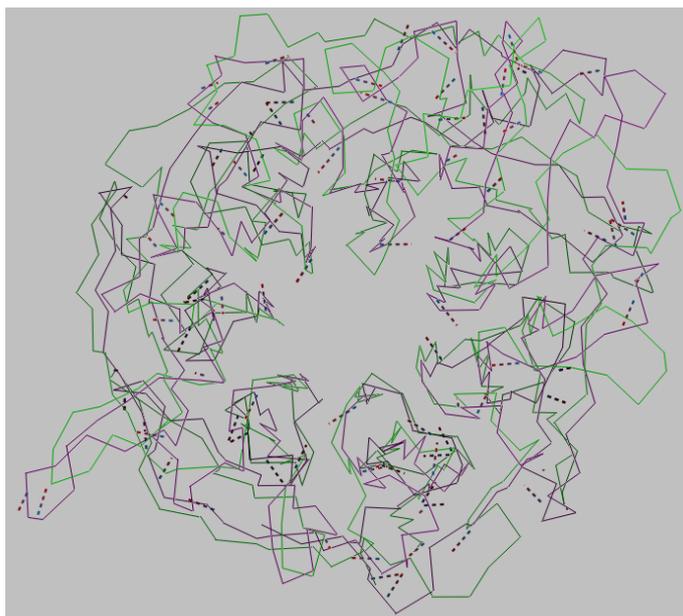


Figura 17. Representação em fitas da sobreposição do β -*propeller* das cadeias $\alpha 6$ (verde) e αv (magenta).

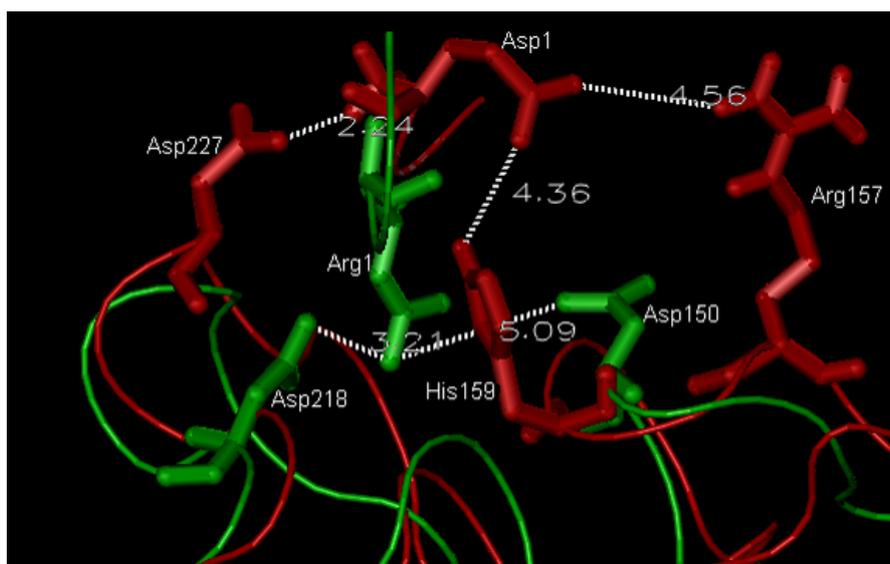


Figura 18. Representação em fitas do β -*propeller* da integrina $\alpha 6$ (vermelho) e αv (verde), mostrando em ambas detalhes do mecanismo de seletividade a ligantes.

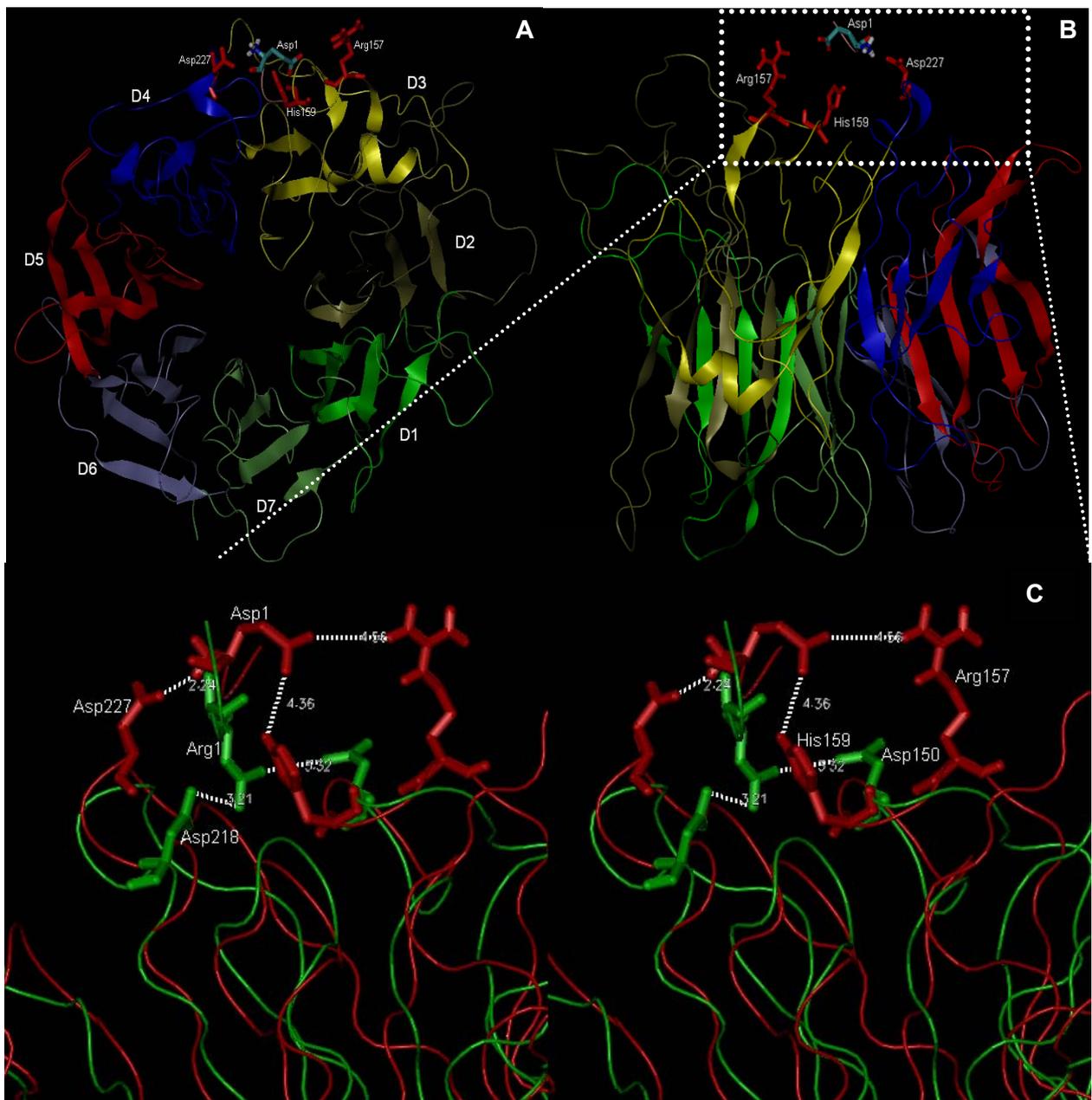


Figura 19. Estrutura do β -propeller da integrina $\alpha 6$. (A) vista de cima e (B) lateral dos 7 subdomínios mostrando o sítio de ligação (resíduos em vermelho) ao peptídeo ECDF (em CPK). (C) Vista estéreo dos sítios de ligação das estruturas de αv (verde) e $\alpha 6$ (vermelho).

4.2.4. Análise da interação integrina $\alpha 6\beta 1$ a pequenos ligantes peptídicos

Seqüências de peptídeos de disintegrina quando unidos às integrinas que servem de seus receptores, constituem o maior sistema de reconhecimento de adesão celular. Em consequência disso o foco primordial do desenvolvimento farmacêutico é a

produção de inibidores seletivos às integrinas [105], de modo a inibir sua função no tratamento de diversas doenças.

Pequenas moléculas antagonistas aderem-se a uma região localizada no topo das integrinas, formada por um *loop* na cadeia β (SDL ou *loop* determinante de especificidade) e 4 *loops* no β -*propeller* da cadeia α , correspondendo ao subdomínio de reconhecimento macromolecular ou *cap* [105] (Figura 20A). O subdomínio *cap* consiste em uma especialização do β -*propeller*, correlacionada a modificações no tamanho das seqüências reconhecidas por diferentes cadeias α de integrinas. Este subdomínio forma a região de adesão a ligantes, incluindo parte da superfície de reconhecimento à laminina 111 em $\alpha6$, composta por 4 longas regiões no β -*propeller* (Figura 20A): a região 3 forma um *loop* no sítio de ligação a peptídeos em $\alpha6$, onde os resíduos Arg157 e His159 estão localizados; as regiões 1 e 2 formam 4 *loops* no centro do subdomínio *cap* que é rodeado, de um lado por uma α -hélice e o *loop* da região 4, e do outro pelo SDL de $\beta1$.

Xiao *et al.* [105] observaram que a principal variação estrutural entre os domínios β -*propeller* de $\alpha11b$ e αv , está localizada nas regiões de *cap* 1, 2 e 3 (Figura 20B). Em $\alpha6\beta1$ observa-se uma diferença ainda maior, quando comparados os subdomínios *cap* e SDL às estruturas de $\alpha v\beta3$ e $\alpha11b\beta3$, que a encontrada pelos autores [105]. Tal divergência parece influenciar no tipo e tamanho dos ligantes reconhecidos por estas integrinas, além de modificações conformacionais no SDL [105]. Em $\alpha6\beta1$ os ligantes reconhecidos possuem tamanhos diferentes quando comparados aos ligantes reconhecidos por $\alpha11b\beta3$ [105] e $\alpha v\beta3$ [27].

Há pouca informação acerca do motivo peptídico que seria reconhecido pela integrina $\alpha6\beta1$. Alguns trabalhos [130,131,132] citam peptídeos do tipo ECD como sendo o ligante peptídico que interage com $\alpha6\beta1$. O modelo de $\alpha6\beta1$ foi então utilizado para o estudo de seus modos de adesão a pequenos ligantes peptídicos do tipo ECD e RGD. A fim de observar a flexibilidade conformacional do modelo de $\alpha6\beta1$ e a forma pela qual o ligante se adere ao β -*propeller*, foram analisadas as trajetórias obtidas no experimento de DM, conforme descrito no capítulo de materiais e métodos.

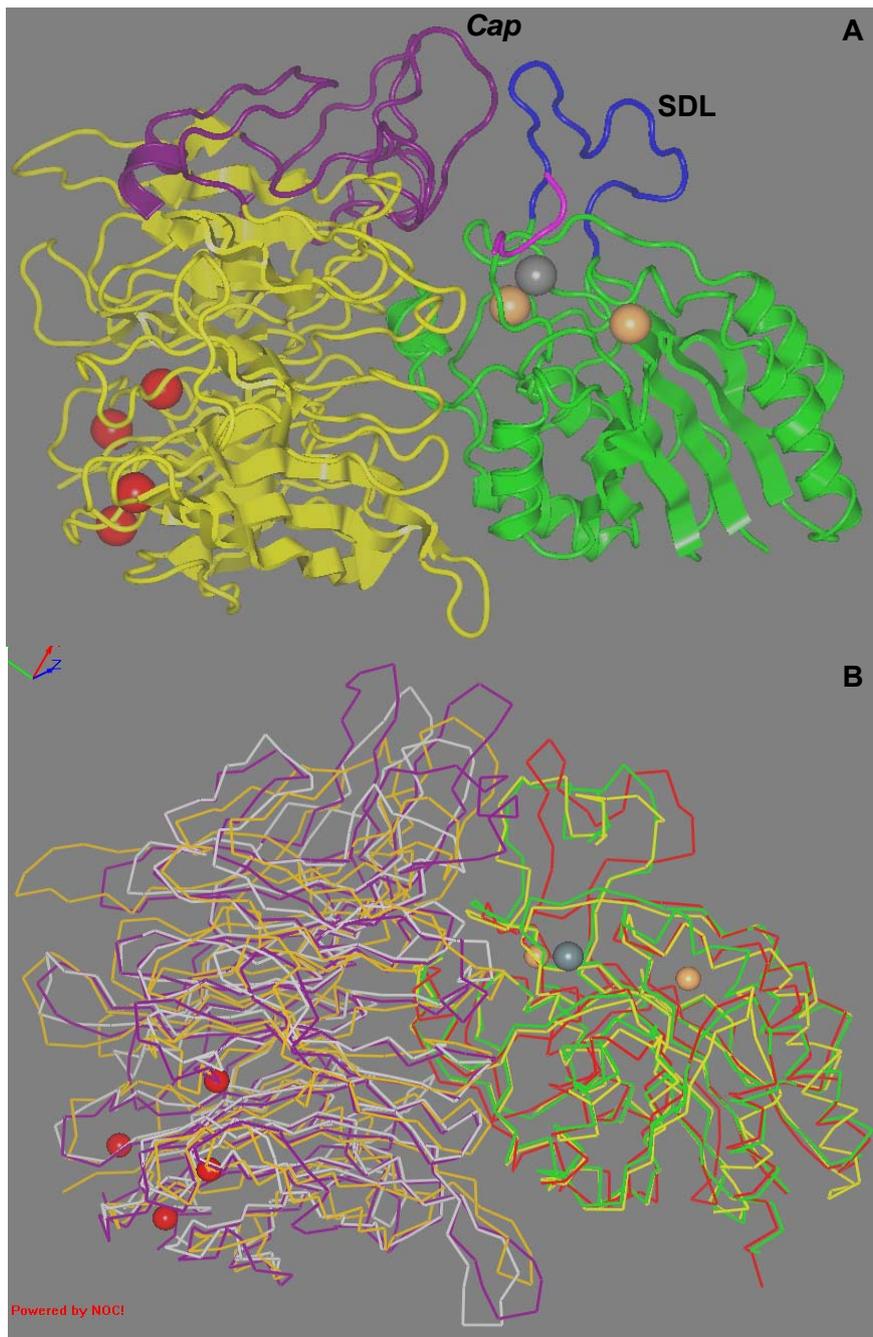


Figura 20. Estrutura dos domínios β -propeller e β A. (A) representação em fitas de $\alpha 6\beta 1$ e peptídeo PECDFP, em amarelo, verde e rosa, respectivamente, mostrando a região cap em magenta e SDL em azul. O MIDAS está representado pelo círculo cinza e o peptídeo PECDFP em rosa. (B) Sobreposição entre as estruturas do β -propeller das cadeias $\alpha 6$ (dourado), αv (cinza) e αIIb (magenta) e βA das cadeias $\beta 1$ (vermelho), $\alpha v\beta 3$ (amarelo) e $\alpha IIb\beta 3$ (verde). O íon Mg^{+2} MIDAS está representado em cinza, e os outros íons Mg^{+2} estão representados em vermelho e amarelo.

4.2.5. Seletividade da integrina $\alpha6\beta1$ a pequenos ligantes peptídicos do tipo ECD ou RGD

No intuito de estudar a seletividade de $\alpha6\beta1$ por ligantes do tipo ECD, foram comparadas as trajetórias obtidas por experimentos de DM dos complexos de $\alpha6\beta1$ com peptídeos ECDF e RGDF, utilizando as coordenadas importadas da estrutura resolvida por Xiong *et al.* [27], que representa a integrina $\alpha v\beta3$ complexada com RGDFV.

O primeiro ligante peptídico modelado em complexo com $\alpha6\beta1$ foi o peptídeo ECDF, e utilizou-se o complexo $\alpha6\beta1$ -RGDF como controle negativo. No primeiro modelo de interação, tal como descrito por Xiong *et al.* [27], Glu1 e Asp3 do ligante apontam em direções opostas, contatando as cadeias α e β , respectivamente, com o ácido Aspártico projetando-se ao íon Mg^{+2} do MIDAS. Glu1 peptídico insere-se no topo do β -*propeller* de $\alpha6$, contatando os resíduos positivamente carregados Arg157 e His159. A Fenilalanina, no C-terminal do peptídeo, mantém interações hidrofóbicas com resíduos do domínio βA de $\beta1$. Por sua característica eletrostática negativa, com apenas 150ps de dinâmica, o ácido Glutâmico do peptídeo é fortemente atraído pela integrina (Figura 21A).

A seguir, como controle negativo, a mesma metodologia de estudo foi aplicada para analisar a interação de $\alpha6\beta1$ com o peptídeo do *template* RGDF [27]. Observou-se que, ao contrário do que ocorreu com $\alpha6\beta1$ -ECDF, Arg1 do peptídeo RGDF, com 100ps de dinâmica, foi repelida do sítio de ligação da cadeia $\alpha6$ e estabilizou-se distante dos resíduos deste sítio (Figura 21B). Este experimento demonstrou que com menos de 200ps de DM, o modelo de $\alpha6\beta1$ apresenta seletividade para pequenos ligantes peptídicos do tipo ECDF.

A principal diferença eletrostática entre os sítios de ligação das integrinas $\alpha6\beta1$ e $\alpha v\beta3$ [27], revela a base para a seletividade a pequenos ligantes peptídicos que elas apresentam. Claramente foi observada a discriminação, em $\alpha6\beta1$, em favor do peptídeo ECDF. Parece razoável assumir que esta seletividade ocorra devido a mutações em resíduos críticos, especialmente nos que tangem o sítio de ligação a peptídeos nas integrinas, como Arg157 e His159 em $\alpha6\beta1$ *versus* Asp150 em $\alpha v\beta3$.

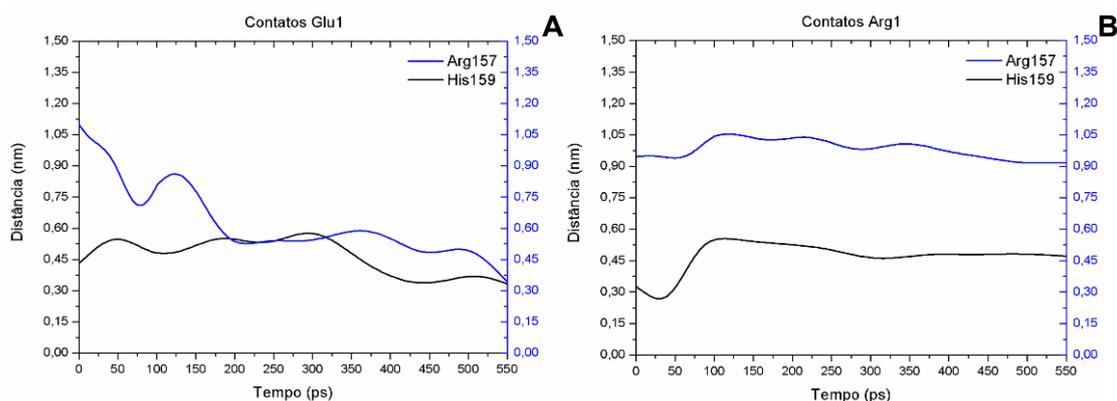


Figura 21. Gráfico de distâncias entre o ácido Glutâmico (A) e Arginina (B) dos peptídeos ECDF e RGDF, respectivamente, e os resíduos Arg157 e His159 do β -propeller da integrina $\alpha 6\beta 1$.

4.2.6. Estudo da interação de $\alpha 6\beta 1$ a pequenos ligantes peptídicos do tipo ECD

Com a demonstração da seletividade do modelo de $\alpha 6\beta 1$ pelo peptídeo ECDF, decidiu-se construir modelos dos domínios β -propeller e βA da integrina $\alpha 6\beta 1$ com outros pequenos peptídeos do tipo ECD. Foram usados os peptídeos DCDF, ECDW e PECDFP.

Os gráficos das trajetórias das simulações por DM foram construídos de modo a analisar as distâncias entre os aminoácidos carregados, hidrofóbicos e aromáticos, buscando-se um padrão de atração/repulsão, além de postular qual o ligante peptídico que melhor se adequa a integrina $\alpha 6\beta 1$. Todas as simulações dos complexos foram padronizadas em 3 ns de dinâmica, o que permite uma análise mais acurada dos contatos. Durante as simulações, os peptídeos mantiveram estrutura rígida, garantida através da ligação do ácido Aspártico central do peptídeo com o íon metal (*MIDAS*). Ademais, interações eletrostáticas entre o N-terminal peptídico o *loop* de interação no β -propeller, reforçam a tese de que o sítio de ligação no β -propeller de $\alpha 6$ é formado pelos resíduos Arg157 e His159.

DCDF mostrou padrão de adesão semelhante ao encontrado no peptídeo ECDF: Asp3 aderiu-se ao *MIDAS* e Phe4 formou interações hidrofóbicas com Ala585 e Tyr158 (Figura 22B). Por possuir carga negativa, Asp1 deste pequeno ligante peptídico maximizou a aderência ao sítio formado por Arg157 e His159, conforme pode ser observado nos gráficos da Figura 22C e D.

O ligante peptídico ECDW foi modelado em complexo com a integrina $\alpha 6\beta 1$,

de forma parecida a DCDF. Asp3 deste peptídeo manteve-se estavelmente aderido ao *MIDAS*. Glu1, por sua vez manteve-se em contato eletrostaticamente favorável com o sítio de ligação a peptídeos, localizado no β -*propeller*, formado por Arg157 e His159 (Figura 23C). Foram observadas também interações hidrofóbicas entre Trp4 peptídico e os resíduos da cadeia β Ala585 e Tyr158, conforme pode ser observado na Figura 23D.

O peptídeo PECDFP, quando modelado em complexo com a integrina $\alpha6\beta1$, apresentou interação eletrostática do Glu2 com Arg157 e His159, sítio de ligação localizado entre os subdomínios D2 e D3 do β -*propeller* da cadeia $\alpha6$ (Figura 24C). Como esperado, Phe5 manteve interações hidrofóbicas com Ala585, Phe646 e Tyr458 da cadeia βA durante toda a simulação de 3 ns, além da manutenção do Asp4 peptídico aderido ao *MIDAS* (Figura 24D). Os resultados obtidos com os experimentos de DM, reiteram que peptídeos do tipo ECD possuem maior interação à integrina $\alpha6\beta1$ que o peptídeo RGD.

Os valores médios de energia de interação de Coulomb e Lennard-Jones entre os pequenos peptídeos do tipo ECD e a integrina $\alpha6\beta1$ foram calculados para as trajetórias obtidas por DM. Utilizando o programa PISA foram obtidos os valores de ΔG para cada complexo e de $\alpha v\beta3$ com RGDFV [27], além da área de contato entre os peptídeos e as cadeias α e β da integrina (Tabela 3).

Os valores para as energias de Coulomb e Lennard-Jones observados para a interação de $\alpha6\beta1$ com o peptídeo PECDFP, foram mais negativos que os alcançados pelos outros experimentos com pequenos peptídeos do tipo ECD. Porém parece plausível que isto ocorra devido ao tamanho do peptídeo PECDFP, dada a sua maior área de contato entre ele e as cadeias α e β da integrina $\alpha6\beta1$. As somas dos valores de ΔG para ambas as cadeias e os peptídeos sugerem que a maior afinidade é encontrada quando a integrina $\alpha6\beta1$ está complexada ao peptídeo ECDW ($-25.53 \text{ kJ mol}^{-1}$ versus -22.60 para DCDF e $-23.02 \text{ kJ mol}^{-1}$ para PECDFP). Tais somas também permitem a observação de que $\alpha6\beta1$ possui melhor interação a peptídeos do tipo ECD que $\alpha v\beta3$ a RGDF ($-25.53 \text{ kJ mol}^{-1}$ para $\alpha6\beta1$ /ECDW versus $-5.024 \text{ kJ mol}^{-1}$ para $\alpha v\beta3$ /RGDF) (Tabela 3).

Tabela 3. Média das interações de Coulomb-SR (Coul-SR), Lennard-Jones-SR (LJ-SR) (em kJ mol^{-1}), área de contato (em Å^2), e ΔG (em kJ mol^{-1}) entre os peptídeos do tipo ECD e a integrina $\alpha_6\beta_1$. O ΔG foi calculado para a integrina $\alpha_6\beta_3$ em complexo com RGD e para a estrutura mais representativa, obtida pela experimentação de DM, de cada complexo $\alpha_6\beta_1$ pequenos peptídeos do tipo ECD.

Complexo	Coul-SR	LJ-SR	Área de contato		ΔG	
			cadeia α	cadeia β	cadeia α	cadeia β
$\alpha_6\beta_1/\text{ECDW}$	-394,326046	-111,876840	140,1	290,3	-10.467	-15.072
$\alpha_6\beta_1/\text{DCDF}$	-381,653603	-106,057461	134,6	275,0	-7.536	-15.072
$\alpha_6\beta_1/\text{PECDFP}$	-685,770213	-947,31344	169,2	315,9	-1.674	-21.353
$\alpha_6\beta_3/\text{RGDF}$	-	-	168,1	209,9	2.930	-7.954

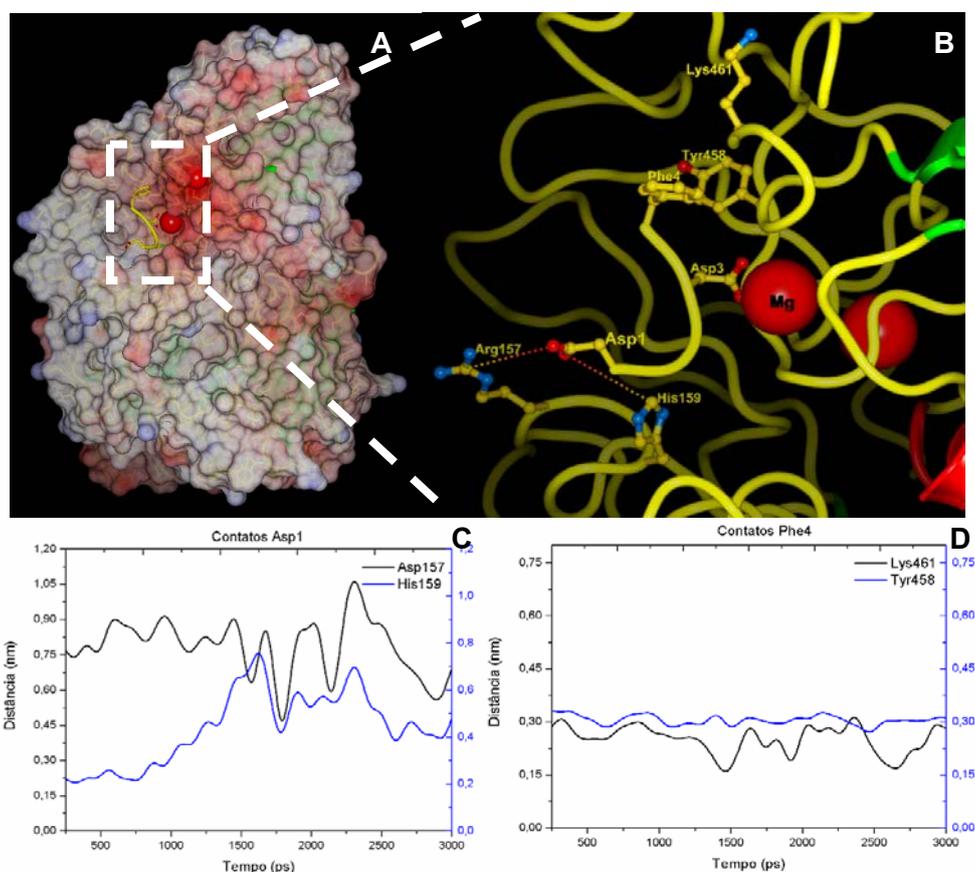


Figura 22. (A) Vista geral eletrostática do modelo de interação integrina $\alpha_6\beta_1$ -peptídeo DCDF. (B) Detalhes do sítio de ligação mostrando os contatos de Asp1 (que contata o β -propeller) e Asp3, que se adere ao MIDAS (círculo vermelho), além das interações hidrofóbicas da Fenilalanina (Phe4). (C e D) Gráficos das trajetórias $\alpha_6\beta_1$ -DCDF mostrando os contatos entre o Asp1 (C) e Phe4 (D) dos peptídeos e as cadeias α_6 e β_1 , respectivamente.

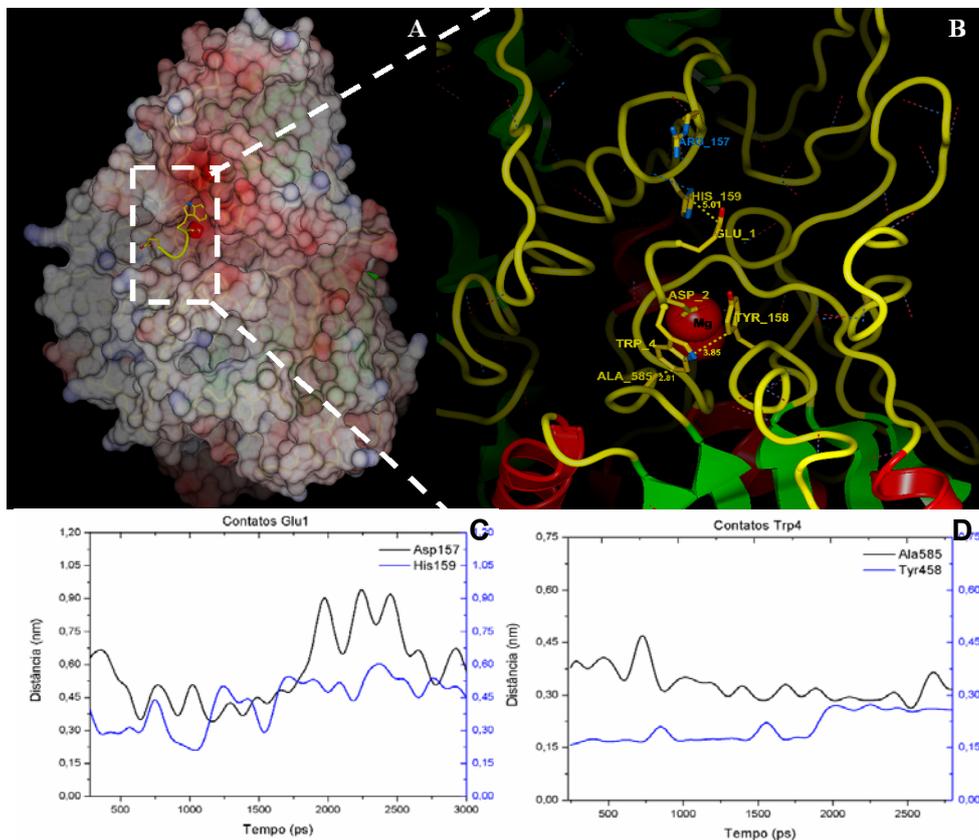


Figura 23. (A) Vista geral eletrostática do modelo de interação do complexo integrina $\alpha6\beta1$ com o peptídeo ECDW. (B) Detalhes do sítio de adesão, mostrando os contatos de Glu1 (contatando o β -propeller) e Asp3, que está aderido ao MIDAS (círculo vermelho), além das interações hidrofóbicas do Triptofano (Trp4). (C e D) Gráficos das trajetórias $\alpha6\beta1$ -ECDW, mostrando os contatos entre o Glu1 (C) e Trp4 (D) peptídicos e as cadeias $\alpha6$ e $\beta1$, respectivamente.

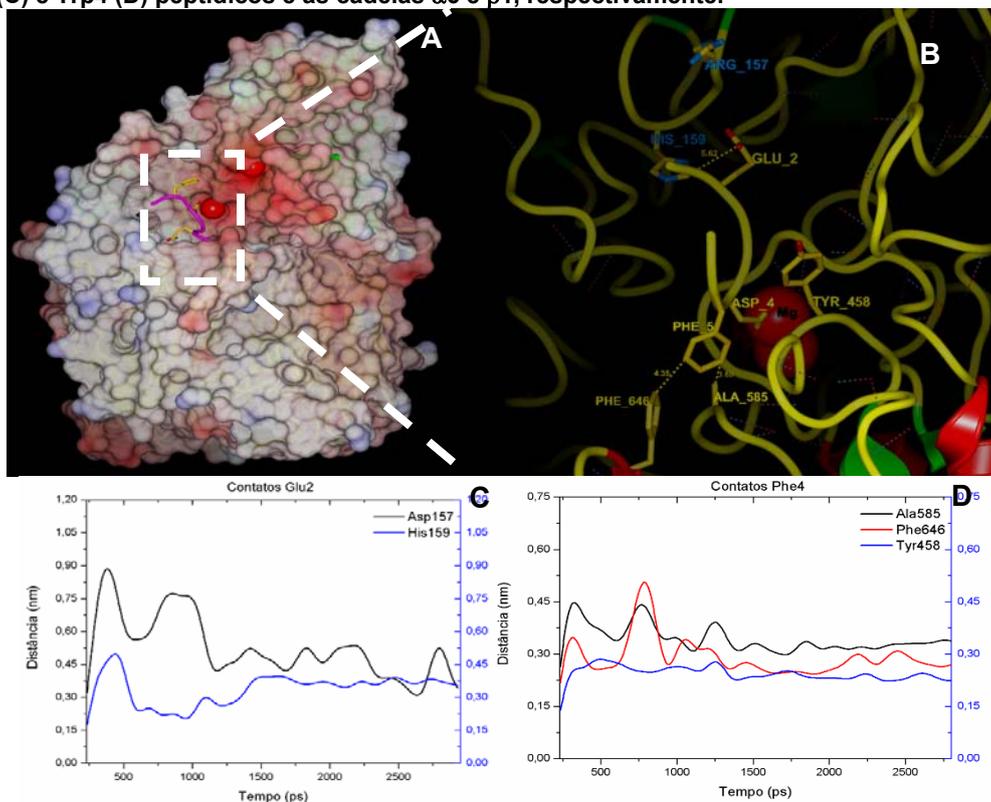


Figura 24. (A) Vista geral eletrostática do modelo de interação do complexo integrina $\alpha6\beta1$ +peptídeo PECDFP. (B) Detalhes do sítio de adesão, mostrando os contatos de Glu2 (contatando o β -propeller) e Asp4, que está aderido ao MIDAS (círculo vermelho), além das interações hidrofóbicas de Phe5. Gráficos das trajetórias $\alpha6\beta1$ -ECDW, mostrando os contatos entre o Glu2 (C) e Phe4 (D) peptídicos e as cadeias $\alpha6$ e $\beta1$, respectivamente.

4.2. Modelagem da laminina 111

4.2.1. Seleção do *template*

O programa *BlastP* foi utilizado para comparar as seqüências da porção globular do domínio LG de laminina 111. Há 37% de identidade entre o domínio LG1 de laminina 111 humana e o domínio LG4 da cadeia $\alpha 2$ de laminina murina (PDB 1DYK) [122], e 25% de identidade para o domínio LG5 (cadeia $\alpha 2$ de laminina murina PDB 1DYK). Desta forma, o primeiro resultado foi o escolhido como *template* para modelagem, por possuir identidade mais alta em relação ao domínio LG1 de laminina 111 humana. Além disto, segundo Tisi *et al.* [122], o alto grau de conservação estrutural entre os dois subdomínios LG permite que as coordenadas das estruturas resolvidas para camundongo sejam extrapoladas aos outros membros da superfamília de domínios LG, viabilizando assim a modelagem por homologia.

4.2.2. Alinhamento das seqüências dos domínios LG de laminina

O alinhamento seqüencial da laminina 111 (cadeia $\alpha 1$) humana, laminina 111 (cadeia $\alpha 1$) e a laminina 211 (cadeia $\alpha 2$) murina mostrou grande conservação entre as seqüências dos domínios LGs humano e murino (Figura 25).

4.2.3. Avaliação do modelo do domínio LG1 da laminina 111 humana

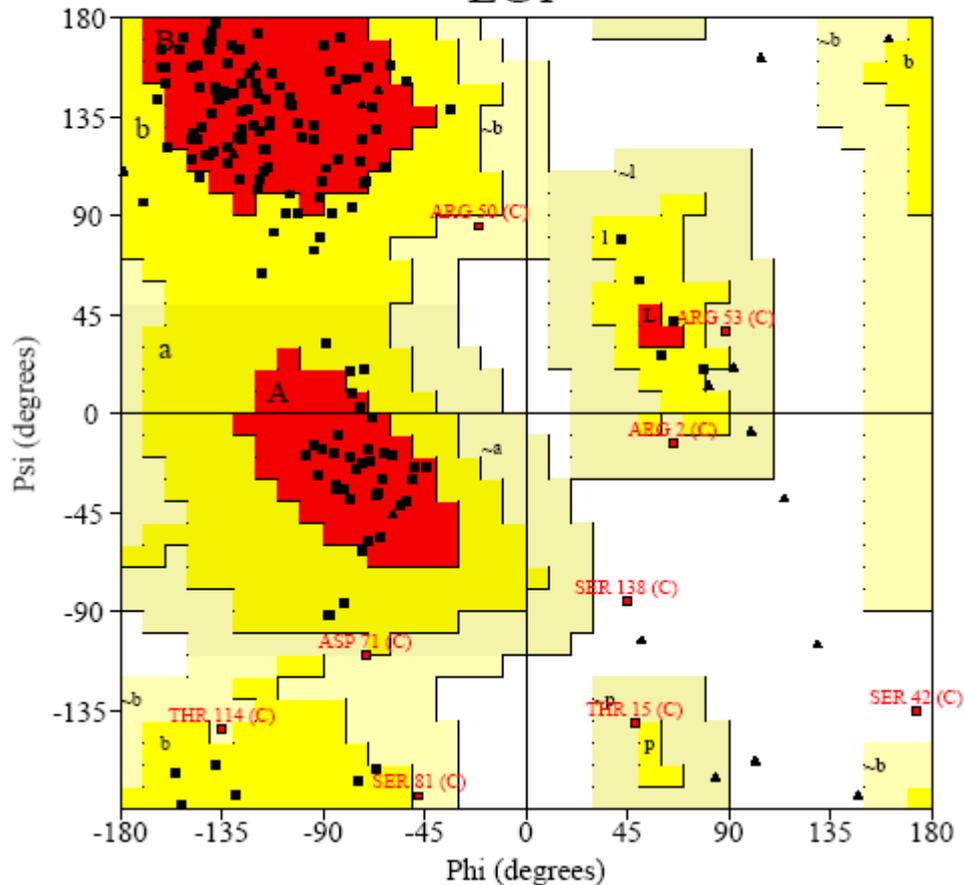
A estrutura do 1º modelo construído para o domínio LG1 da laminina 111 humana, da mesma forma que o modelo de $\alpha6\beta1$, foi avaliada com PROCHECK. As taxas de ocupação observadas tanto para a região mais favorável quanto para a região permitida no modelo do domínio LG1 de laminina 111 humana estão acima dos valores calculados para estas regiões em relação à estrutura experimental (PDB 1DYK) (98,6% versus 98%, respectivamente). Em contraste, a percentagem de regiões menos favoráveis para o modelo teórico é mais baixa (1,9% em 1DYK contra 1,3% no modelo) (Figura 26).

Foram avaliados parâmetros para as cadeias lateral e principal, como a qualidade geral do gráfico de Ramachandran, a planaridade das ligações peptídicas, a energia das pontes de hidrogênio da cadeia principal, e os desvios padrão dos ângulos torcionais χ . Em todos os tópicos avaliados, o modelo de LG1 obteve valores estatísticos próximos ou superiores aos resultados obtidos para estruturas refinadas e em equivalente resolução (2,0Å) (Figura 27A e B). Por meio dessas comparações, a qualidade do modelo teórico parece aceitável quando comparada à estrutura experimental (PDB 1DYK).

A sobreposição entre LG4 de laminina 211 murina (PDB 1DYK) e o modelo de LG1 de laminina 111 humana, claramente mostra que a topologia geral da estrutura *template* foi extrapolada para o modelo. Assim como no modelo da integrina $\alpha6\beta1$, modificações configuracionais locais estão presentes em regiões variáveis de LG1. As alterações encontradas principalmente nos *loops* advêm das divergências seqüenciais, porém nas regiões compreendidas pelas fitas β a conservação estrutural é alta (Figura 28A). Ambas estruturas são compostas por 14 folhas β antiparalelas, formando um β -sanduíche globular, comum a todos os domínios LG de laminina. A sobreposição das cadeias principais de LG1 e o *template* sugere que a configuração da cadeia principal foi preservada, enquanto que os *loops* apresentaram certo grau de mobilidade conformacional, que confirmam a boa qualidade do modelo construído (Figura 28B).

Ramachandran Plot

LG1



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	110	73.8%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	30	20.1%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	7	4.7%
Residues in disallowed regions	2	1.3%
Number of non-glycine and non-proline residues	149	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	17	
Number of proline residues	7	
Total number of residues	175	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 26. Dados dos ângulos ϕ e ψ de cada resíduo da estrutura do domínio LG1 de laminina 111 humana, fornecidos pelo gráfico de Ramachandran.

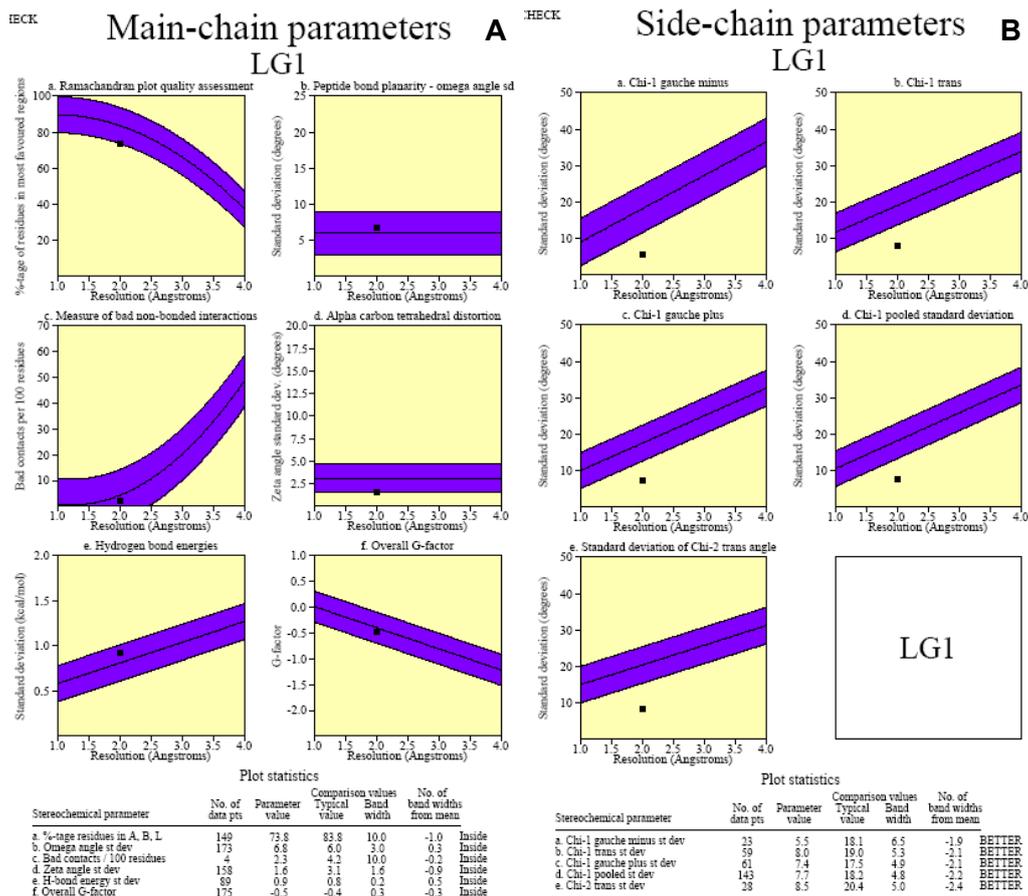


Figura 27. Conjunto de gráficos mostrando o comportamento do domínio LG1 de laminina1 humana (representada pelos pequenos quadrados negros) comparado a estruturas bem refinadas em resolução similar (no caso 2,0Å), para a cadeia principal (A) e para a cadeia lateral (B).

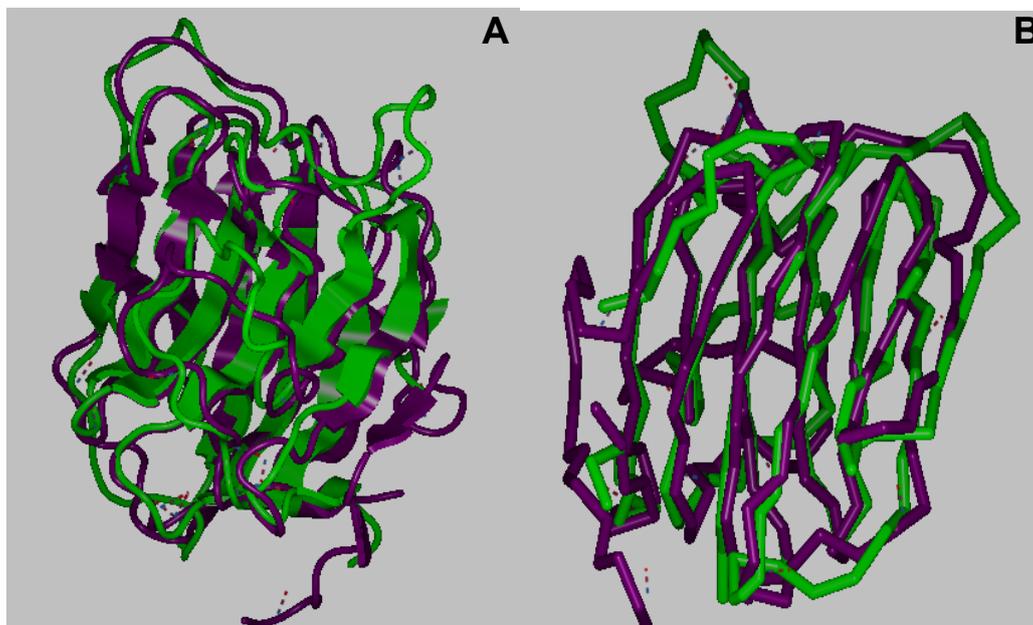


Figura 28. (A) Sobreposição da representação colorida em fitas da sobreposição entre a estrutura LG4 de laminina 211 de camundongo (PDB 1DYK [122]) (em magenta) e o modelo do domínio LG1 de laminina 111 humana (em verde). (B) representação da cadeia principal das mesmas estruturas.

4.3. Modelagem do complexo integrina-laminina

4.3.1. Construção do complexo formado por $\alpha6\beta1$ e o domínio LG1 da laminina 111

O modelo refinado do β -*propeller* e βA da integrina $\alpha6\beta1$ e o modelo do domínio LG1 da laminina 111 humana foram utilizados para o estudo do mecanismo de adesão integrina-laminina. O primeiro modelo da interação entre a laminina e a integrina, formado pelo posicionamento da estrutura modelada do domínio LG1 em contato com a integrina, foi construído conforme descrito no capítulo de materiais e métodos.

Nomizu *et al.* [87], utilizando 113 peptídeos sintéticos sobrepostos abrangendo toda a região que corresponde ao domínio globular na cadeia $\alpha1$ de laminina 111 murina, encontraram que dos 19 possíveis sítios de ligação, 5 possuíam atividades na adesão celular. O peptídeo formado pela seqüência NRWHSIYITRFG, localizada no domínio LG1 de laminina 111 murina, segundo o estudo dos autores possuía a maior atividade de aderência às cadeias $\alpha6$ e $\beta1$ da integrina murina. Esta seqüência se encontra conservada no domínio LG1 de laminina 111 humana e forma a fita β "H" (Figura 29A). Nos domínios LG3, LG4 ou LG5 nenhum dos peptídeos estudados pelos autores aderiu à $\alpha6$ ou a $\beta1$. Embora o peptídeo TWYKIAFQRNRK do LG2 de laminina 111 de camundongo tenha sido identificado experimentalmente como receptor da cadeia $\alpha6$ e $\beta1$ de integrina, sua atividade adesiva foi reduzida, conforme mostrado por Nomizu *et al.* [87].

Conforme resultados de Ido *et al.* [125], o resíduo Asp82 do domínio LG3 de laminina 511 humana, quando mutado para Ala, reduz em 60% a sua capacidade de adesão à integrina $\alpha6\beta1$. Segundo os autores [125], a adesão ao domínio LG3 da laminina 511 é mediada não apenas pela integrina mas também por outros tipos de receptores como α -dístroglicanas e síndecanas. Desta forma, LG3 não pode ser considerado o principal domínio de adesão na laminina 111, por não ser exclusivamente o domínio de contato entre ele e a integrina $\alpha6\beta1$. Porém, como o resíduo Asp82 aderiu LG3 de laminina 511 à integrina $\alpha6\beta1$ e está conservado em LG1 de laminina 111, este resíduo foi considerado como contato ao *MIDAS* por interação eletrostática. No domínio LG2 de laminina 111 humana, há a substituição deste ácido Aspártico por uma Asparagina (Figura 25), dificultando a interação devido à sua neutralidade eletrostática, além deste domínio ter apresentado atividade de

adesão reduzida à integrina $\alpha 6\beta 1$ [87]. Dadas essas observações, o contato eletrostático de Asp82 com o *MIDAS* foi tomado como ponto de partida para a construção do complexo $\alpha 6\beta 1$, a uma distância menor que 4Å.

A estrutura quaternária do modelo preliminar e não refinado do domínio G da laminina 111 humana permitiu a observação de que a fita β “H” encontra-se exposta ao solvente (Figura 29B). De acordo com o modelo de LG1 proposto neste trabalho a estrutura da fita β “H” está posicionada do lado oposto às extremidades N- e C-terminal. Este posicionamento permitiria que uma proteína grande, como a integrina, se ligue à laminina aderindo-se pelo contato com a fita β “H” (Figura 29A e B). Desta forma, é plausível o emprego do domínio LG1 da laminina 111 como receptor da integrina $\alpha 6\beta 1$, para a construção do modelo do complexo, razão deste trabalho. Dadas as observações e conclusões apresentadas, postula-se o domínio LG1 de laminina 111 humana como o principal domínio de adesão à integrina $\alpha 6\beta 1$, além de Asp82 como sítio de ligação ao *MIDAS* de $\alpha 6\beta 1$.

O alto estado de conservação entre as fitas β dos diferentes domínios LG, nos permitiu extrapolar as coordenadas da estrutura LG4 de laminina 211 murina (PDB 1DYK) à seqüência LG1 de laminina 111 humana. Nomizu *et al.* [87] demonstraram que a fita β “H” em LG1 de laminina 111 murina é a porção reconhecida pelas cadeias $\alpha 6$ e $\beta 1$ de integrina [87]. Assim, a seqüência NRWHSIYITRFG (fita β “H”) foi considerada a porção em LG1 de adesão ao β -*propeller* de $\alpha 6$.

O modelo foi construído através do posicionamento da seqüência da fita β “H” próxima ao *loop* do β -*propeller* de $\alpha 6$, formado pelos resíduos DTFPDVMMN. Esta última seqüência faz parte da região da inserção na isoforma 4 da cadeia $\alpha 6$ de integrina (P23229-4), e é a porção de menor distância estrutural (~ 6 Å) ao sítio de ligação a peptídeos em $\alpha 6$, formado pelos resíduos Arg157 e His159. Foi possível observar que a região em LG1 da laminina 111 humana é formada majoritariamente por resíduos positivamente carregados, enquanto que o *loop* do β -*propeller* (DTFPDVMMN) é eletronegativo. Deste modo, consideramos que o posicionamento de da fita β “H” em contato com o β -*propeller* de $\alpha 6$ oferece interações eletrostáticas favoráveis entre o receptor e o ligante. A Figura 30 mostra a representação em fitas do modelo final obtido.

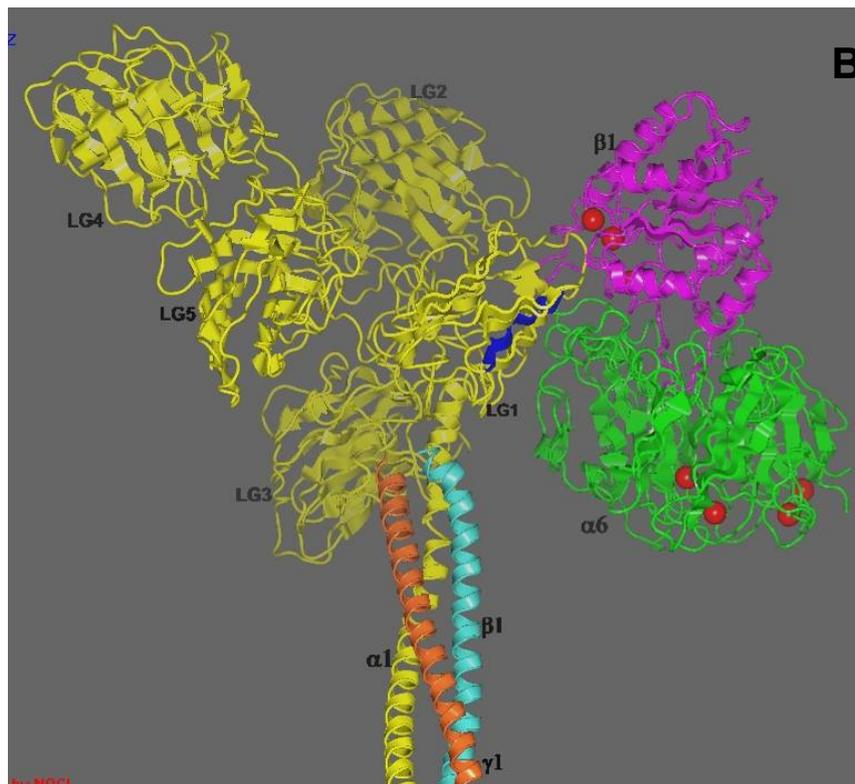
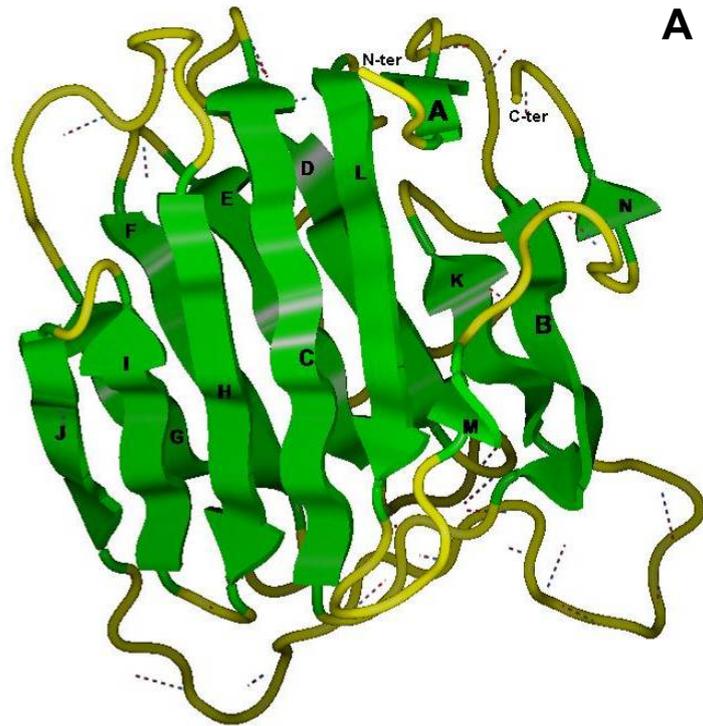


Figura 29. Representação em fitas da laminina 111. (A) Detalhes do modelo do domínio LG1. (B) Modelo não refinado do domínio globular da laminina 111 humana (em amarelo) em complexo à porção N-terminal da integrina $\alpha 6 \beta 1$. As cadeias α , β e γ da laminina 111 estão representadas em amarelo, azul claro e marrom, respectivamente. Os domínios β -*propeller* e βA da integrina $\alpha 6 \beta 1$ estão representados em verde e magenta, respectivamente, e a fita β "H" está realçada em azul. Os íons Mg^{+2} estão representados por círculos vermelhos.

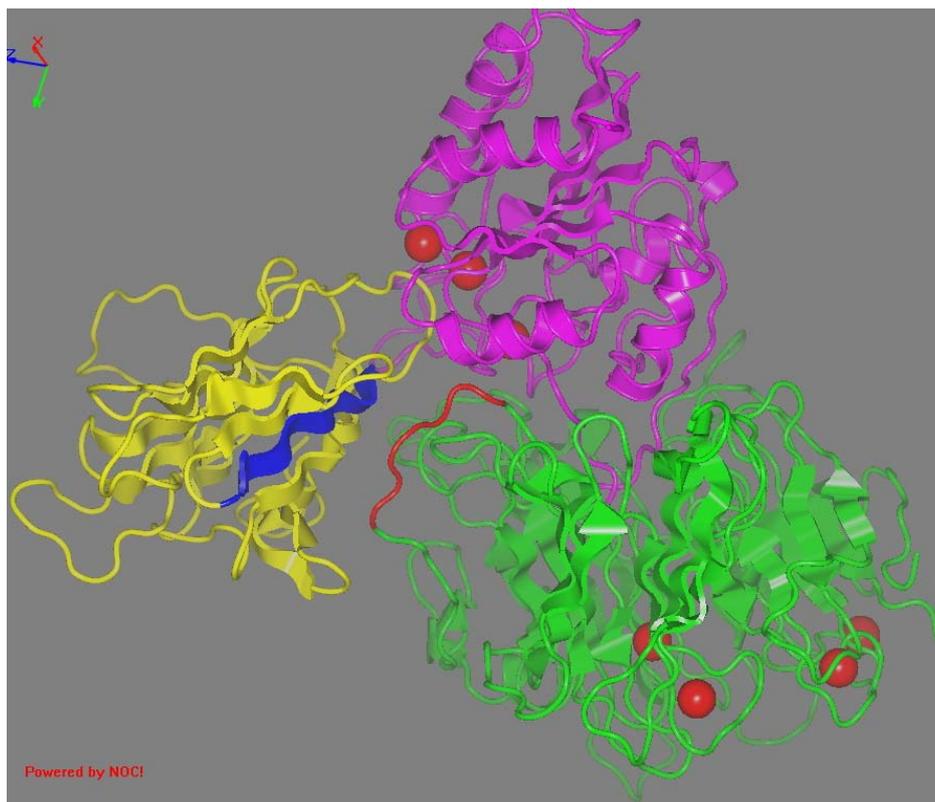


Figura 30. Representação em fitas da estrutura do complexo integrina $\alpha 6\beta 1$ (em verde e magenta, respectivamente) e do domínio LG1 da laminina 1 humana (em amarelo). Círculos vermelhos, íons Mg^{+2} . O *loop* de interação com LG1 no β -*propeller* está realçado em vermelho, e a fita β “H” em azul.

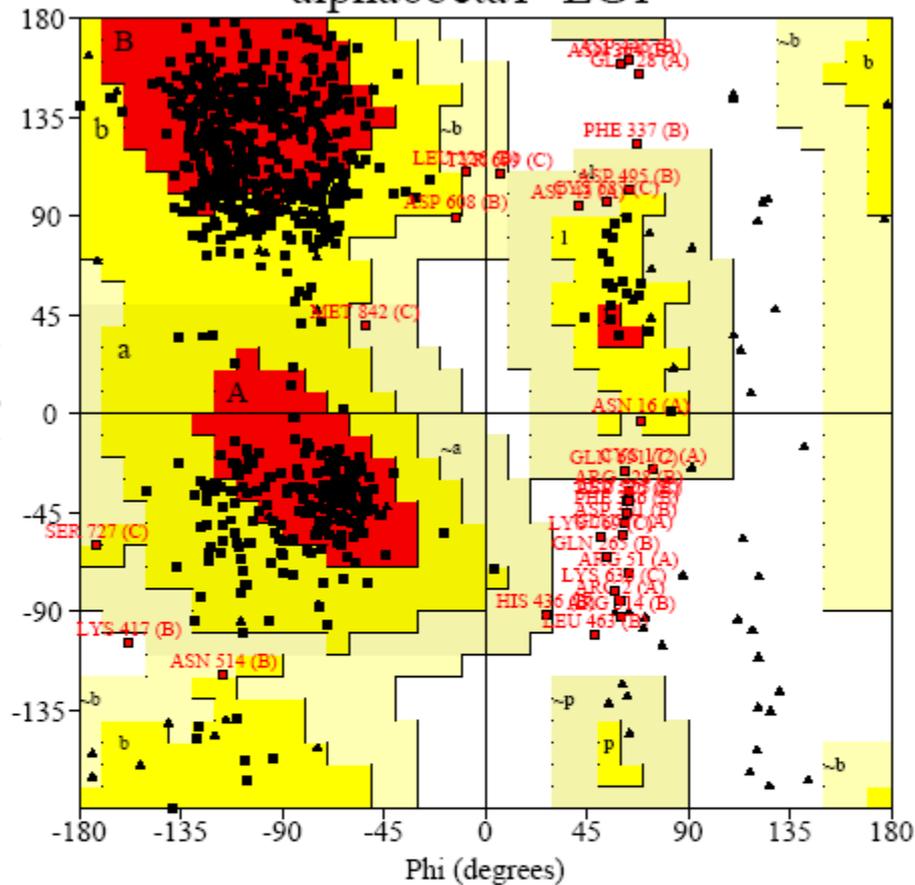
4.3.2. Avaliação do modelo do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e LG1 da laminina 111

Resultados obtidos pela análise do programa PROCHECK mostraram que do total de 855 resíduos, excluindo-se as Prolinas, Glicinas e os resíduos terminais, 690 possuem os ângulos ϕ e ψ mais favoravelmente posicionados. Em contraste, apenas 5,6% ou 38 resíduos foram definidos com possuidores de ângulos em posições consideradas desfavoráveis. Desta forma, é possível a conclusão de que o modelo do complexo $\alpha 6\beta 1$ -laminina 111 possui aceitável qualidade estereoquímica, conforme visualizado na Figura 31.

Os resultados analisados dos parâmetros para as cadeias lateral e principal mostram a qualidade da estrutura, comparada a outras estruturas bem refinadas e com semelhante resolução (no caso 3,2 Å) (Figura 32A e B). Em todas as avaliações, o modelo do complexo construído obteve valores estatísticos próximos ou superiores aos resultados observados nas estruturas comparadas (Figura 32A e B).

UCHECK

Ramachandran Plot alpha6beta1+LG1



Plot statistics

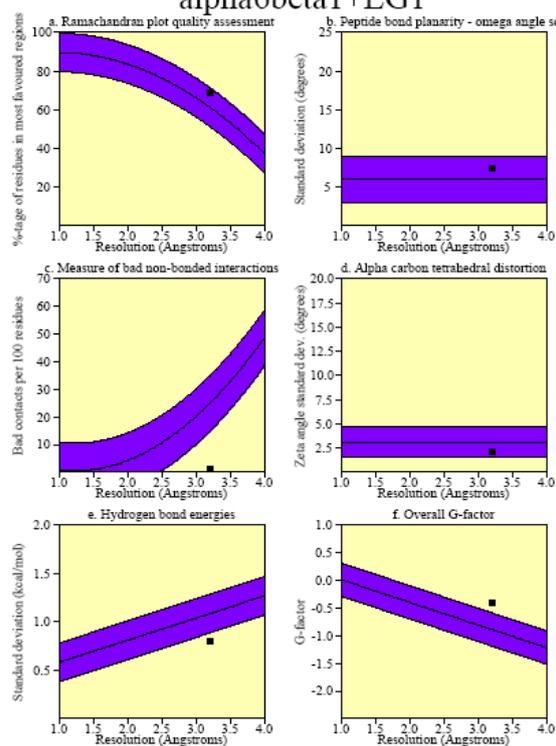
Residues in most favoured regions [A,B,L]	499	68.5%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	198	27.2%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	13	1.8%
Residues in disallowed regions	18	2.5%
Number of non-glycine and non-proline residues	728	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	83	
Number of proline residues	40	
Total number of residues	855	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

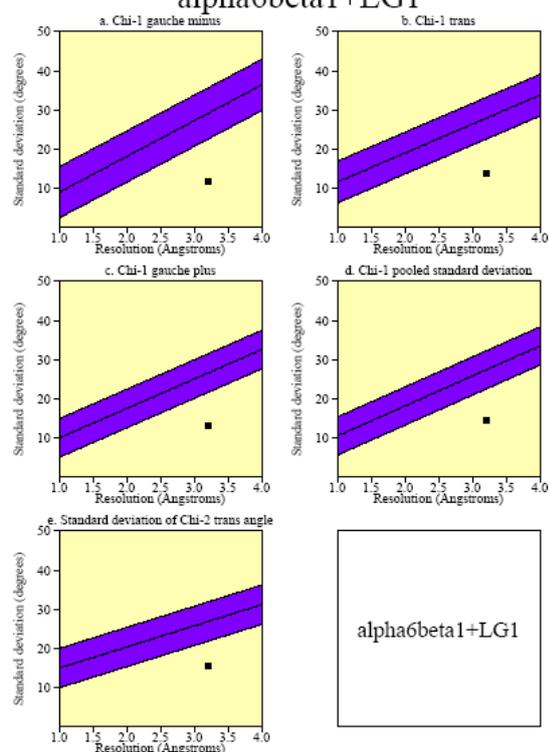
Figura 31. Dados dos ângulos ϕ e ψ de cada resíduo da estrutura $\alpha 6\beta 1$ fornecidos pelo Gráfico de Ramachandran.

Main-chain parameters
alpha6beta1+LG1

A

Side-chain parameters
alpha6beta1+LG1

B



Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean
			Typical value	Band width	
a. %age residues in A, B, L	728	68.5	61.7	10.0	0.7 Inside
b. Omega angle st dev	849	7.5	6.0	3.0	0.3 Inside
c. Bad contacts / 100 residues	12	1.4	24.7	10.0	-2.3 BETTER
d. Zeta angle st dev	772	2.12	3.1	1.6	-0.6 Inside
e. H-bond energy st dev	484	0.8	1.1	0.2	-1.4 BETTER
f. Overall G-factor	855	-0.4	-0.9	0.3	1.6 BETTER

Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean
			Typical value	Band width	
a. Chi-1 gauche minus st dev	131	11.8	26.1	6.5	-2.7 BETTER
b. Chi-1 trans st dev	227	13.8	27.8	5.3	-2.6 BETTER
c. Chi-1 gauche plus st dev	333	13.1	26.6	4.9	-2.7 BETTER
d. Chi-1 pooled st dev	691	14.4	27.4	4.8	-2.7 BETTER
e. Chi-2 trans st dev	199	15.5	26.9	5.0	-2.3 BETTER

Figura 32. Conjunto de gráficos mostrando o comportamento da estrutura $\alpha 6\beta 1$ em complexo com o domínio LG1 de laminina 111 humana (representada pelos pequenos quadrados negros) comparado a estruturas bem refinadas em resolução similar (no caso 3,2Å), para a cadeia principal (A) e para a cadeia lateral (B).

4.3.3. Comparação entre o modelo do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e LG1 de laminina 111 e controles negativos

Com a finalidade de demonstrar a viabilidade do modelo construído para o complexo formado pelos domínios β -propeller e βA da integrina $\alpha 6\beta 1$ e LG1 da laminina 111, foram construídos outros dois complexos como controle negativo. Ambos complexos foram submetidos à DM padronizada em 6ns, e o mesmo posicionamento inicial do resíduo Asp82 (anteriormente descrito) em contato com o MIDAS.

4.3.3.1. Controle negativo “fita β “F””

Um dos complexos de $\alpha 6\beta 1$ e LG1 de controle negativo, foi construído a partir do posicionamento da fita β “H” voltada para o solvente, e, conseqüentemente, com a fita β “F” (inversamente localizada à fita β “H” no domínio LG1) em contato com o *loop* de interação em $\alpha 6$ (Figura 33). Este complexo foi nomeado “fita β “F”” devido ao seu posicionamento de contato.

Ao longo da trajetória de DM, o domínio LG1 apresentou-se aderido à integrina e, conforme análise feita utilizando o programa PISA, com contatos distribuídos uniformemente entre as cadeias α e β da integrina. As áreas de contato entre o domínio e cada cadeia da integrina observadas foram praticamente iguais (866,4 Å² e 824,8 Å² para as cadeias α e β da integrina, respectivamente).

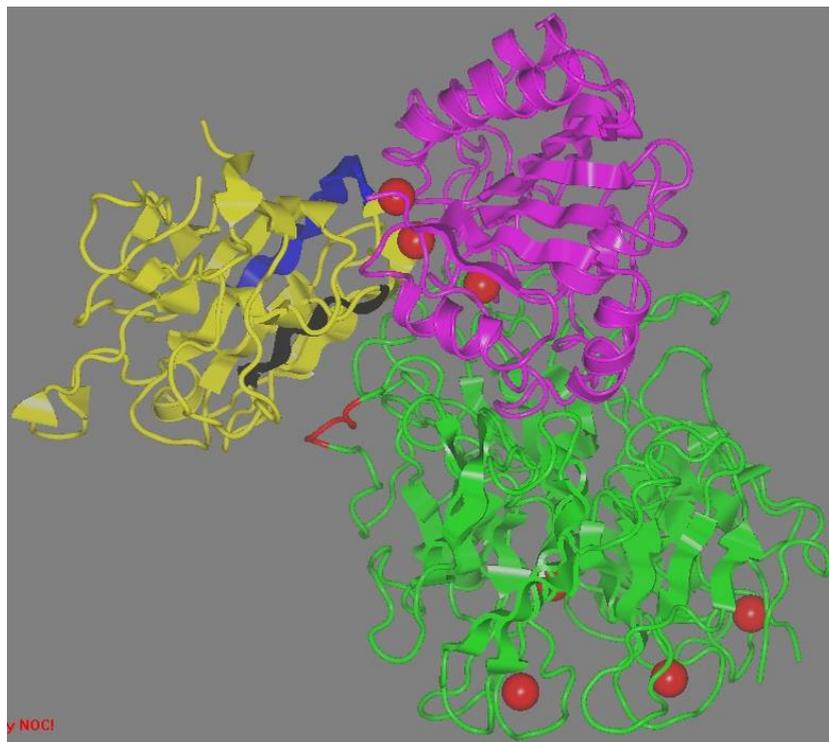


Figura 33. Representação em fitas do complexo integrina $\alpha 6\beta 1$ (em verde e magenta, respectivamente) e domínio LG1 da laminina 111 (em amarelo), construído com a fita β “H” (em azul) sem contato com o *loop* de interação no β -*propeller* (em vermelho). A fita β “F” está realçada na cor preta.

4.3.3.2. Controle negativo “fita β “H” 2”

O segundo posicionamento de controle negativo, criado para o complexo de $\alpha 6\beta 1$ e o domínio LG1 da laminina 111, foi construído de modo que LG1 estivesse paralelamente posicionado em relação ao eixo formado entre os domínios β -*propeller* e β A. Desta forma, a fita β “H” não manteve contato com o *loop* de interação do β -*propeller*, conforme pode ser visualizado na Figura 34. Por também utilizar a fita β “H” como referência de interação entre LG1 e o β -*propeller* de $\alpha 6$, este complexo foi nomeado de “fita β “H” 2”.

Ao longo dos 6ns de DM a que foi submetido, o domínio LG1 apresentou-se aderido à integrina, e primordialmente contactou sua cadeia β . Isto pode ser mostrado através dos valores observados para as áreas de interação entre LG1 e as cadeias α e β da integrina (10,1 e 694,6 Å² para as cadeias α e β , respectivamente).

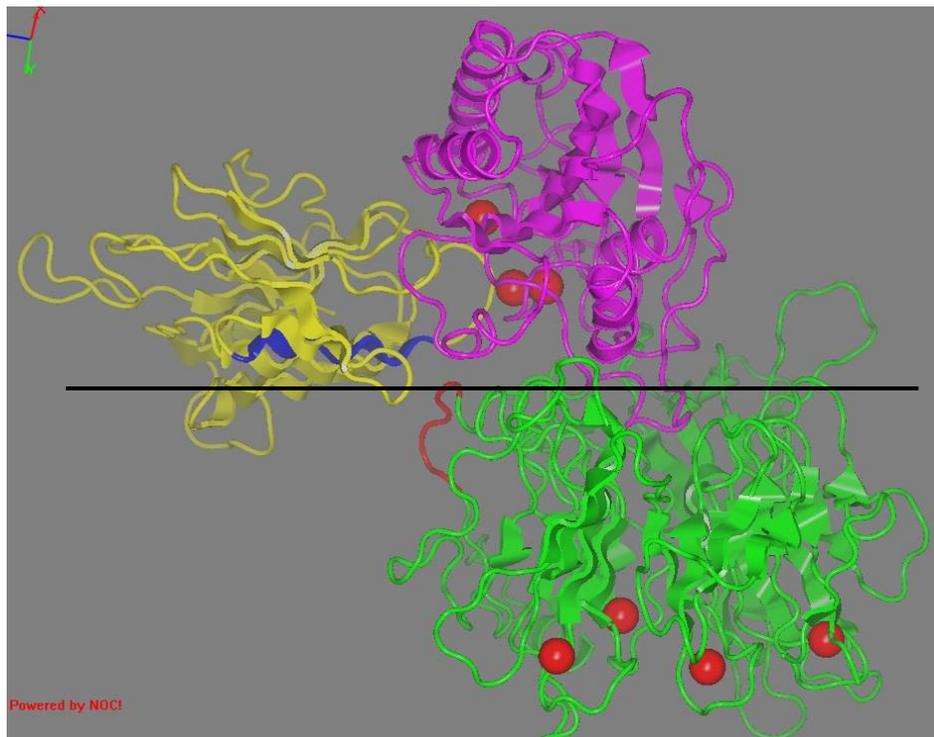


Figura 34. Representação em fitas do complexo formado pela integrina $\alpha 6\beta 1$ (em verde e magenta, respectivamente) e domínio LG1 da laminina 111 (em amarelo), construído paralelamente posicionado em relação ao eixo (linha preta) entre os domínios β -*propeller* e β A. Em vermelho está realçado o *loop* de interação no β -*propeller* e em azul, a fita β “H”.

4.3.4. Análise comparativa do modelo do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e o domínio LG1 de laminina 111 e controles negativos

Os termos de interação de Coulomb e Lennard-Jones, além da área de interface entre os três domínios (LG1, β -propeller e βA), foram calculados para as trajetórias de 6 ns obtidas por DM, entre a integrina $\alpha 6\beta 1$ e o domínio LG1 da laminina 111.

Os valores para os termos de interação de Coulomb e Lennard-Jones calculados para o controle negativo “fita β “F”” foram mais negativos que os observados para os dois outros posicionamentos da fita β “H”. Apesar disso, os resultados somados para o ΔG entre o domínio LG1 e as cadeias $\alpha 6$ e $\beta 1$ da integrina, sugerem que o complexo construído com a fita β “H” adjacente à cadeia $\alpha 6$ possui melhor interação que os complexos construídos como controle negativo (-75.36 kJ mol⁻¹ versus -28.88 e -39.35 kJ mol⁻¹, respectivamente para os complexos “fita β “H” 2” e “fita β “F””). Pode-se perceber também que o valor de ΔG para o contato entre LG1 e a cadeia α da integrina está condizente aos resultados obtidos por Nomizu *et al.* [87]. Segundo estes autores há maior interação da laminina com a cadeia α que com a β da integrina (-50,66 kJ mol⁻¹ versus -24.70 kJ mol⁻¹ para interações com as cadeias α e β , respectivamente). Ao contrário, para o complexo “fita β “F”” observou-se um valor de ΔG mais positivo quando observado o contato entre a laminina e a cadeia β da integrina, em comparação ao obtido para o contato de LG1 com a cadeia α (-37.26 e -2.09 kJ mol⁻¹, respectivamente). Estes resultados são conflitantes com as observações dos autores [87], o que possivelmente torna este posicionamento do domínio LG1 à integrina $\alpha 6\beta 1$ menos favorável a ocorrer naturalmente. De forma semelhante, os resultados de ΔG para o complexo “fita β “H” 2” também contrariam o mesmo estudo, com valores de 0,41 kJ mol⁻¹ para o contato entre LG1 e a cadeia α , e -28.88 kJ mol⁻¹ para o mesmo contato com a cadeia β .

Como esperado, é evidente a maior área de interação do domínio LG1 do complexo “fita β “H” 2” à cadeia β (10,1 e 694,6 Å² para as cadeias α e β da integrina, respectivamente). Esta observação contraria ao estudo citado [87], e combinado aos resultados observados de ΔG , possivelmente também torna este complexo menos favorável à ocorrência natural (Tabela 4). As áreas de contato entre LG1 e as cadeias α e β observadas para o experimento inicial “fita β “H””, estão condizentes com o estudo de Nomizu *et al.* [87] quanto à maior interação de LG1 à cadeia α que à β (790,5 e 709,5 Å², respectivamente). Dados os resultados positivamente observados

para o complexo em que a fita β "H" do domínio LG1 está posicionada adjacente ao β -*propeller* de $\alpha 6$, acredita-se que o modelo concorda com o que já foi demonstrado pela literatura e aos valores de ΔG .

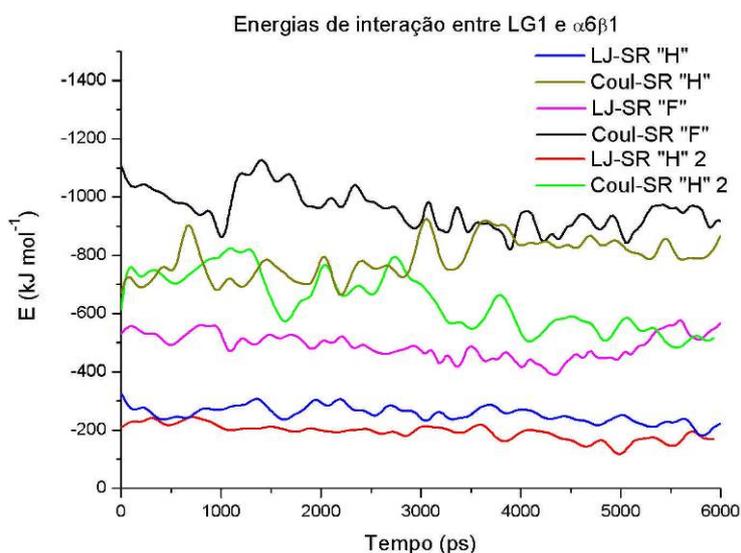


Figura 35. Gráfico das energias de interação de Coulomb (Coul-SR) e Lennard-Jones (LJ-SR) para os complexos de $\alpha 6\beta 1$ e LG1, construídos com a fita β "H" posicionada adjacente ("H") e perpendicular ("H" 2) à $\alpha 6$, e com a fita β "F" em contato com o β -*propeller*.

Tabela 4. Média das interações de Coulomb-SR (Coul-SR), Lennard-Jones-SR (LJ-SR) (em kJ mol^{-1}), área de contato (em \AA^2) e ΔG (em kJ mol^{-1}) entre o domínio LG1 da laminina 111 humana e as cadeias α e β das integrinas $\alpha 6\beta 1$. O ΔG foi calculado para a estrutura mais representativa de cada complexo $\alpha 6\beta 1$ com LG1, obtida pela experimentação de DM, construídos com a fita β "H" posicionada adjacente ("H") e perpendicular ("H" 2) de $\alpha 6$, e com a fita β "F" em contato com o β -*propeller*.

Complexo	Coul-SR	LJ-SR	Área de contato		ΔG	
			cadeia α	cadeia β	cadeia α	cadeia β
$\alpha 6\beta 1$ /LG1 fita β "H"	-789,69272	-254,77584	790,5	709,5	-50,66	-24,70
$\alpha 6\beta 1$ /LG1 fita β "H"2	-643,09622	-192,74236	10,1	694,6	0,41	-28,88
$\alpha 6\beta 1$ /LG1 fita β "F"	-947,76642	-485,70258	866,4	824,8	-2,09	-37,26

4.3.5. Análise do sítio de ligação do complexo formado por $\alpha 6\beta 1$ e o domínio LG1 da laminina 111

Através da análise por DM do complexo integrina $\alpha 6\beta 1$ com o domínio LG1

de laminina 111 humana, verificou-se que a estabilidade estrutural da trajetória é assegurada pelos diferentes tipos de interações não-covalentes (eletrostáticas, pontes de hidrogênio, empilhamento aromático (*aromatic stacking*) e hidrofóbicas) entre $\alpha6\beta1$ e LG1, o que permite o estudo da conformação do complexo estudado.

O modelo refinado do complexo foi utilizado para o estudo do mecanismo de adesão entre o domínio LG1 da laminina 111 e a integrina $\alpha6\beta1$. O estudo detalhado da interação entre as duas proteínas mostrou que o resíduo Asp82 de $\alpha1$ LG1 manteve-se em contato com o MIDAS a uma distância praticamente constante em 2Å durante toda a trajetória de DM (Figura 36).

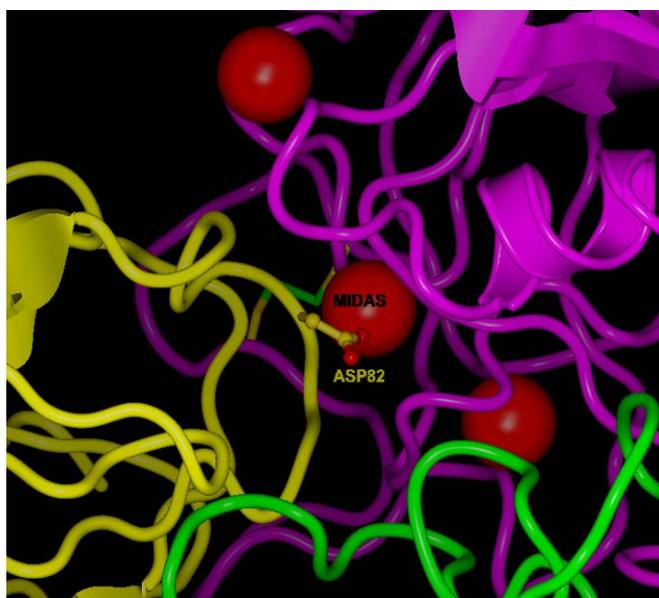


Figura 36. Representação em fitas da estrutura da interação integrina $\alpha6\beta1$ (em verde e magenta, respectivamente) com o domínio LG1 de laminina 111 (em amarelo), mostrando a ligação do resíduo Asp82 de LG1 ao MIDAS.

Nomizu *et al.* [87] relataram em seu estudo que a seqüência SIYITRF é a mínima essencial para a adesão às cadeias $\alpha6$ e $\beta1$ da integrina. Por mutação sítio-dirigida, os autores também demonstraram que a Serina é indispensável a tal ligação. No modelo de interação aqui discutido, o resíduo Ser87, localizado na fita β "H" do domínio LG1 da laminina 111, forma ponte de hidrogênio com a cadeia lateral de Asp227 (localizado no β -*propeller* de $\alpha6$) (Figura 37A). Porém, além da Serina, His89 também se mostrou indispensável à interação entre as duas proteínas, e se manteve em contato eletrostático com Asp227 ao longo de toda a trajetória de DM (Figura 37A)

e B).

No trabalho de Nomizu *et al.* [87] é citada a participação integral do peptídeo formado pelos resíduos SIYITRF na interação entre a laminina e a integrina. Os resíduos mutados para VARF em LG1 de laminina 111 humana são correspondentes à seqüência ITRF na laminina 111 murina. Até o momento, os resíduos VARF apresentaram-se estruturalmente distantes de qualquer contato com a integrina $\alpha6\beta1$ no modelo de interação. Acredita-se que a adesão do conjunto de resíduos formadores do peptídeo SIYITRF [87] foi sucedida pelo fato desta seqüência se tratar de um fragmento, e não do domínio completo LG1, conforme apresentado neste trabalho. Porém um maior tempo de simulações de DM pode propiciar interpretações mais precisas.

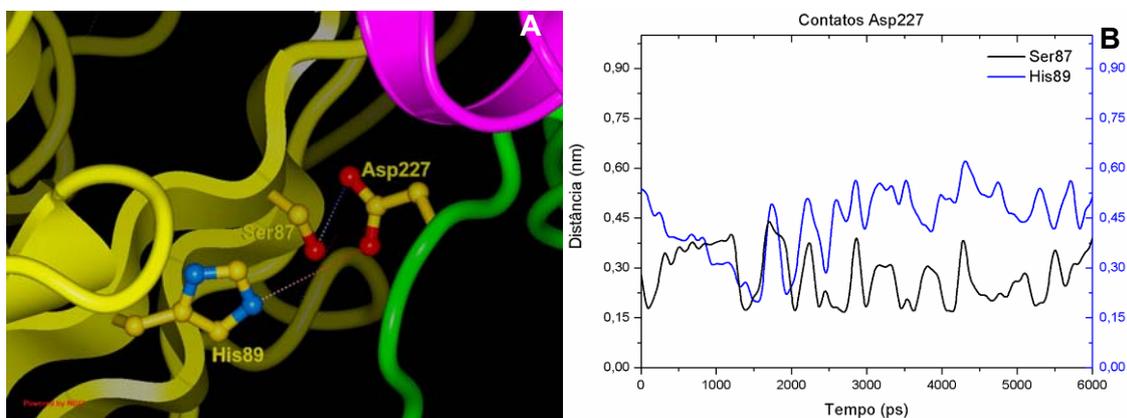


Figura 37. (A) Representação em fitas dos domínios β -propeller (verde) e β A (magenta) da integrina $\alpha6\beta1$ e LG1 (amarelo) da laminina 111, mostrando os contatos entre Asp227 (β -propeller) e Ser87 e His89 de LG1. (B) Gráfico de distâncias dos contatos entre Asp227 e Ser87 e His89.

5. Conclusões

Esta dissertação reflete um trabalho de investigação teórica sobre a forma com que a porção N-terminal da integrina $\alpha6\beta1$ interage com o domínio LG1 da laminina 111. Dada a complexidade das duas proteínas, esta é uma questão que ainda não foi completamente elucidada. Neste estudo foram construídos os primeiros modelos das regiões de β -*propeller* e βA da integrina $\alpha6\beta1$ e do domínio LG1 da laminina 111, além do primeiro modelo da interação entre estas duas proteínas.

A partir do modelo construído para $\alpha6\beta1$, acrescido a outros estudos em estrutura de integrinas [27], demonstrou-se que mutações em resíduos tangentes ao sítio de ligação em $\alpha6$ regulam a afinidade a ligantes. Isto foi provado pela observação de que o *loop* entre os subdomínios D2 e D3 do β -*propeller* de $\alpha6$ diferencia ligantes por discriminação eletrostática, quando comparadas as cadeias $\alpha6$ e αv . Nesta integrina foi observado um núcleo formado por resíduos negativamente carregados próximo ao sítio de ligação, enquanto que em região equivalente de $\alpha6$, há primariamente resíduos positivos.

Dada a sua eletropositividade nos resíduos que formam o sítio de ligação, foi observado neste trabalho que a integrina $\alpha6\beta1$ possui interação preferencial a peptídeos do tipo ECDF. Ao contrário, em $\alpha v\beta3$, por seu carácter eletronegativo, o peptídeo RGDFV é seu ligante (já demonstrado por Xiong *et al.* [27]).

Esta observação, aliada à proposição de que a integrina $\alpha6\beta1$ repele de seu sítio de ligação o peptídeo RGDF, reforça a teoria de que peptídeos-miméticos derivados de ECDF podem ser excelentes inibidores da interação de $\alpha6\beta1$ com a laminina 111.

Pequenas moléculas antagonistas, como ECDF, aderem ao topo das integrinas em região formada pelo SDL e o *cap*. Neste trabalho foi observado que ligantes peptídicos ECDF não são discriminados pela região SDL da cadeia $\beta1$, concentrando a suas interações no *MIDAS* e no *loop* entre os subdomínios D2 e D3 do β -*propeller* (uma das regiões do *cap*). Porém ligantes maiores, como o domínio LG1 da laminina 111, são discriminados tanto pela região que corresponde ao SDL de $\beta1$ quanto pelo *cap* em $\alpha6$.

Foi sugerido neste trabalho que o domínio LG1 é a região da laminina 111 que interage com a integrina $\alpha6\beta1$, contato formado pela fita β "H" de LG1 e o β -*propeller* de $\alpha6$. Identificou-se ainda que, por seu carácter eletrostático e proximidade à

fita β "H", o resíduo Asp82 de LG1 e o íon Mg^{+2} do *MIDAS* da integrina $\alpha6\beta1$ também participam e se mostram essenciais a interação entre as duas proteínas. A fita β "H" está posicionada oposta às extremidades N- e C-terminal do domínio LG1. Isto permite que a integrina se ligue à laminina pelo contato entre o β -*propeller* e a fita β "H".

6. Perspectivas

Como continuação deste trabalho, sugere-se:

- Para ampliar as conclusões obtidas até o momento, é necessária a aplicação de maior tempo de DM ao modelo do complexo formado pelas regiões de β -*propeller* e β A da integrina α 6 β 1 e o domínio LG1 da laminina 111.
- Para estudar os rearranjos estruturais globais no mecanismo de adesão entre a integrina e a laminina, é necessária a construção de modelo do segmento extracelular completo da integrina α 6 β 1 (domínios β -*propeller* e β A, além de EGF, Calf, Thigh, Psi e Hybrid), o refinamento do modelo do domínio G da laminina 111 (domínios de LG1 a LG5), construção do complexo formado pelas duas proteínas, e posterior aplicação de simulações de DM.
- A aplicação de testes em laboratório que comprovem a observação de que a integrina α 6 β 1 é inibida por pequenos derivados peptídicos de ECDF.
- A aplicação de algoritmos de *docking* proteína-proteína, a fim de reforçar a qualidade do modelo da interação entre a integrina e a laminina construído neste trabalho.

Referências bibliográficas

- [1] ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., *et al.*, "Molecular biology of the cell". 4th. Garland, 2002.
- [2] FELDING-HABERMANN, B. e CHERESH, D. A. "Vitronectin and its receptors". *Curr Opin Cell Biol*, v.5, n. 5, pp. 864-8, 1993.
- [3] AKIYAMA, S. K., OLDEN, K. e YAMADA, K. M. "Fibronectin and integrins in invasion and metastasis". *Cancer Metastasis Rev*, v.14, n. 3, pp. 173-89, 1995.
- [4] ALBELDA, S. M. e BUCK, C. A. "Integrins and other cell adhesion molecules". *Faseb J*, v.4, n. 11, pp. 2868-80, 1990.
- [5] HUMPHRIES, M. J. "Integrin structure". *Biochem Soc Trans*, v.28, n. 4, pp. 311-39, 2000.
- [6] SCHWARTZ, M. A. e INGBER, D. E. "Integrating with integrins". *Mol Biol Cell*, v.5, n. 4, pp. 389-93, 1994.
- [7] HATO, T., PAMPORI, N. e SHATTIL, S. J. "Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3". *J Cell Biol*, v.141, n. 7, pp. 1685-95, 1998.
- [8] MARCINKIEWICZ, C., CALVETE, J. J., VIJAY-KUMAR, S., *et al.* "Structural and functional characterization of EMF10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits alpha 5 beta 1 integrin". *Biochemistry*, v.38, n. 40, pp. 13302-9, 1999.
- [9] SPRINGER, T. A. "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm". *Cell*, v.76, n. 2, pp. 301-14, 1994.
- [10] MIZEJEWSKI, G. J. "Role of integrins in cancer: survey of expression patterns". *Proc Soc Exp Biol Med*, v.222, n. 2, pp. 124-38, 1999.
- [11] GIANCOTTI, F. G. e RUOSLAHTI, E. "Integrin signaling". *Science*, v.285, n. 5430, pp. 1028-32, 1999.
- [12] BELKIN, A. M. e STEPP, M. A. "Integrins as receptors for laminins". *Microsc Res Tech*, v.51, n. 3, pp. 280-301, 2000.
- [13] SONNENBERG, A., MODDERMAN, P. W. e HOGERVORST, F. "Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6". *Nature*, v.336, n. 6198, pp. 487-9, 1988.
- [14] MECHTERSHEIMER, G., MUNK, M., BARTH, T., *et al.* "Expression of beta 1 integrins in non-neoplastic mammary epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the breast". *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, v.422, n. 3, pp. 203-10, 1993.
- [15] PELTONEN, J., LARJAVA, H., JAAKKOLA, S., *et al.* "Localization of integrin

- receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin. Variable expression in basal and squamous cell carcinomas". *J Clin Invest*, v.84, n. 6, pp. 1916-23, 1989.
- [16] SONNENBERG, A., LINDERS, C. J., DAAMS, J. H., *et al.* "The alpha 6 beta 1 (VLA-6) and alpha 6 beta 4 protein complexes: tissue distribution and biochemical properties". *J Cell Sci*, v.96 (Pt 2), n., pp. 207-17, 1990.
- [17] ANDREW, S. M., EDWARDS, B. D., CHALMERS, R. J., *et al.* "A quantitative immunohistochemical study of the expression of integrins by nerves in psoriatic and normal skin". *Br J Dermatol*, v.127, n. 4, pp. 359-64, 1992.
- [18] BELLO-DEOCAMPO, D., KLEINMAN, H. K., DEOCAMPO, N. D., *et al.* "Laminin-1 and alpha6beta1 integrin regulate acinar morphogenesis of normal and malignant human prostate epithelial cells". *Prostate*, v.46, n. 2, pp. 142-53, 2001.
- [19] HOGERVORST, F., ADMIRAAL, L. G., NIESSEN, C., *et al.* "Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin alpha 6 subunit". *J Cell Biol*, v.121, n. 1, pp. 179-91, 1993.
- [20] JASPARS, L. H., DE MELKER, A. A., BONNET, P., *et al.* "Distribution of laminin variants and their integrin receptors in human secondary lymphoid tissue. Colocalization suggests that the alpha 6 beta 4-integrin is a receptor for laminin-5 in lymphoid follicles". *Cell Adhes Commun*, v.4, n. 4-5, pp. 269-79, 1996.
- [21] LAGROTA-CANDIDO, J., CANELLA, I., SAVINO, W., *et al.* "Expression of extracellular matrix ligands and receptors in the muscular tissue and draining lymph nodes of mdx dystrophic mice". *Clin Immunol*, v.93, n. 2, pp. 143-51, 1999.
- [22] PATEY, N., HALBWACHS-MECARELLI, L., DROZ, D., *et al.* "Distribution of integrin subunits in normal human kidney". *Cell Adhes Commun*, v.2, n. 2, pp. 159-67, 1994.
- [23] SIMON, E. E. e MCDONALD, J. A. "Extracellular matrix receptors in the kidney cortex". *Am J Physiol*, v.259, n. 5 Pt 2, pp. F783-92, 1990.
- [24] TERPE, H. J., STARK, H., RUIZ, P., *et al.* "Alpha 6 integrin distribution in human embryonic and adult tissues". *Histochemistry*, v.101, n. 1, pp. 41-9, 1994.
- [25] ZOLA, H., "Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA)". Disponível em: <<http://www.hlda8.org/CD1toCD350.htm>>. Acesso em: 24-01-2007.
- [26] XIONG, J. P., STEHLE, T., DIEFENBACH, B., *et al.* "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaVbeta3". *Science*, v.294, n. 5541, pp. 339-45, 2001.
- [27] XIONG, J. P., STEHLE, T., ZHANG, R., *et al.* "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaVbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand". *Science*, v.296, n. 5565, pp. 151-5, 2002.

- [28] LEE, J. O., RIEU, P., ARNAOUT, M. A., *et al.* "Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)". *Cell*, v.80, n. 4, pp. 631-8, 1995.
- [29] PLOW, E. F., HAAS, T. A., ZHANG, L., *et al.* "Ligand binding to integrins". *J Biol Chem*, v.275, n. 29, pp. 21785-8, 2000.
- [30] CHEN, J., SALAS, A. e SPRINGER, T. A. "Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster". *Nat Struct Biol*, v.10, n. 12, pp. 995-1001, 2003.
- [31] CRAIG, D., GAO, M., SCHULTEN, K., *et al.* "Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force". *Structure*, v.12, n. 11, pp. 2049-58, 2004.
- [32] MINER, J. H., LI, C., MUDD, J. L., *et al.* "Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation". *Development*, v.131, n. 10, pp. 2247-56, 2004.
- [33] COTTA-DE-ALMEIDA, V., BONOMO, A., MENDES-DA-CRUZ, D. A., *et al.* "Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration". *Eur J Immunol*, v.33, n. 9, pp. 2439-48, 2003.
- [34] SAVINO, W., MENDES-DA-CRUZ, D. A., SMANIOTTO, S., *et al.* "Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix". *J Leukoc Biol*, v.75, n. 6, pp. 951-61, 2004.
- [35] SAVINO, W., AYRES MARTINS, S., NEVES-DOS-SANTOS, S., *et al.* "Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions?" *Braz J Med Biol Res*, v.36, n. 8, pp. 1015-25, 2003.
- [36] SILVA-BARBOSA, S. D. e SAVINO, W. "The involvement of laminin in anti-myocardial cell autoimmune response in murine Chagas disease". *Dev Immunol*, v.7, n. 2-4, pp. 293-301, 2000.
- [37] COPPOLINO, M. G. e DEDHAR, S. "Bi-directional signal transduction by integrin receptors". *Int J Biochem Cell Biol*, v.32, n. 2, pp. 171-88, 2000.
- [38] SHIMAOKA, M. e SPRINGER, T. A. "Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function". *Nat Rev Drug Discov*, v.2, n. 9, pp. 703-16, 2003.
- [39] BECK, K., DIXON, T. W., ENGEL, J., *et al.* "Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly". *J Mol Biol*, v.231, n. 2, pp. 311-23, 1993.
- [40] EKBLUM, P. e TIMPL, R., "The Laminins." 1st. Amsterdam, Hardwood Academic Publishers, 1996.
- [41] COLOGNATO, H. e YURCHENCO, P. D. "Form and function: the laminin family of heterotrimers". *Dev Dyn*, v.218, n. 2, pp. 213-34, 2000.
- [42] TIMPL, R., TISI, D., TALTS, J. F., *et al.* "Structure and function of laminin LG

- modules". *Matrix Biol*, v.19, n. 4, pp. 309-17, 2000.
- [43] AUMAILLEY, M. e SMYTH, N. "The role of laminins in basement membrane function". *J Anat*, v.193 (Pt 1), n., pp. 1-21, 1998.
- [44] ENGVALL, E. "Laminin variants: why, where and when?" *Kidney Int*, v.43, n. 1, pp. 2-6, 1993.
- [45] KOCH, M., OLSON, P. F., ALBUS, A., *et al.* "Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain". *J Cell Biol*, v.145, n. 3, pp. 605-18, 1999.
- [46] SASAKI, M., KLEINMAN, H. K., HUBER, H., *et al.* "Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains". *J Biol Chem*, v.263, n. 32, pp. 16536-44, 1988.
- [47] SASAKI, T. e TIMPL, R., "Laminins". In: T. Kreis e R. Vale (Ed.), *Guidebook for the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins.*, Oxford University Press, 1999.
- [48] BURGESSON, R. E., CHIQUET, M., DEUTZMANN, R., *et al.* "A new nomenclature for the laminins". *Matrix Biol*, v.14, n. 3, pp. 209-11, 1994.
- [49] CHAMPLIAUD, M. F., LUNSTRUM, G. P., ROUSSELLE, P., *et al.* "Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment". *J Cell Biol*, v.132, n. 6, pp. 1189-98, 1996.
- [50] IIVANAINEN, A., VUOLTEENAHO, R., SAINIO, K., *et al.* "The human laminin beta 2 chain (S-laminin): structure, expression in fetal tissues and chromosomal assignment of the LAMB2 gene". *Matrix Biol*, v.14, n. 6, pp. 489-97, 1995.
- [51] HUTTER, H., VOGEL, B. E., PLENEFISCH, J. D., *et al.* "Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes". *Science*, v.287, n. 5455, pp. 989-94, 2000.
- [52] RICHARDS, A. J., AL-IMARA, L., CARTER, N. P., *et al.* "Localization of the gene (LAMA4) to chromosome 6q21 and isolation of a partial cDNA encoding a variant laminin A chain". *Genomics*, v.22, n. 1, pp. 237-9, 1994.
- [53] AUMAILLEY, M., BRUCKNER-TUDERMAN, L., CARTER, W. G., *et al.* "A simplified laminin nomenclature". *Matrix Biol*, v.24, n. 5, pp. 326-32, 2005.
- [54] SASAKI, T., GOHRING, W., MANN, K., *et al.* "Short arm region of laminin-5 gamma2 chain: structure, mechanism of processing and binding to heparin and proteins". *J Mol Biol*, v.314, n. 4, pp. 751-63, 2001.
- [55] TALTS, J. F., SASAKI, T., MIOSGE, N., *et al.* "Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin alpha4 chain and its proteolytic processing in tissues". *J Biol Chem*, v.275, n. 45, pp. 35192-9, 2000.
- [56] SASAKI, T. e TIMPL, R. "Domain IVa of laminin alpha5 chain is cell-adhesive and binds beta1 and alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp". *FEBS Lett*,

v.509, n. 2, pp. 181-5, 2001.

- [57] EKBLÖM, P., LONAI, P. e TALTS, J. F. "Expression and biological role of laminin-1". *Matrix Biol*, v.22, n. 1, pp. 35-47, 2003.
- [58] MIYAGOE, Y., HANAOKA, K., NONAKA, I., *et al.* "Laminin alpha2 chain-null mutant mice by targeted disruption of the Lama2 gene: a new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy". *FEBS Lett*, v.415, n. 1, pp. 33-9, 1997.
- [59] KUANG, W., XU, H., VACHON, P. H., *et al.* "Merosin-deficient congenital muscular dystrophy. Partial genetic correction in two mouse models". *J Clin Invest*, v.102, n. 4, pp. 844-52, 1998.
- [60] RYAN, M. C., LEE, K., MIYASHITA, Y., *et al.* "Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells". *J Cell Biol*, v.145, n. 6, pp. 1309-23, 1999.
- [61] THYBOLL, J., KORTESMAA, J., CAO, R., *et al.* "Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation". *Mol Cell Biol*, v.22, n. 4, pp. 1194-202, 2002.
- [62] MINER, J. H., CUNNINGHAM, J. e SANES, J. R. "Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain". *J Cell Biol*, v.143, n. 6, pp. 1713-23, 1998.
- [63] KIKKAWA, Y., VIRTANEN, I. e MINER, J. H. "Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin alpha5 in the glomerular basement membrane". *J Cell Biol*, v.161, n. 1, pp. 187-96, 2003.
- [64] KIKKAWA, Y. e MINER, J. H. "Molecular dissection of laminin alpha 5 in vivo reveals separable domain-specific roles in embryonic development and kidney function". *Dev Biol*, v.296, n. 1, pp. 265-77, 2006.
- [65] BLOCH, W., FORSBERG, E., LENTINI, S., *et al.* "Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis". *J Cell Biol*, v.139, n. 1, pp. 265-78, 1997.
- [66] DIPERSIO, C. M., HODIVALA-DILKE, K. M., JAENISCH, R., *et al.* "alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane". *J Cell Biol*, v.137, n. 3, pp. 729-42, 1997.
- [67] SASAKI, T., FORSBERG, E., BLOCH, W., *et al.* "Deficiency of beta 1 integrins in teratoma interferes with basement membrane assembly and laminin-1 expression". *Exp Cell Res*, v.238, n. 1, pp. 70-81, 1998.
- [68] MCGOWAN, K. A. e MARINKOVICH, M. P. "Laminins and human disease". *Microsc Res Tech*, v.51, n. 3, pp. 262-79, 2000.
- [69] ROSKELLEY, C. D., SREBROW, A. e BISSELL, M. J. "A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression". *Curr Opin Cell Biol*, v.7, n. 5, pp. 736-47, 1995.
- [70] FARQUHAR, M. G. "Membrane recycling in secretory cells: implications for traffic of products and specialized membranes within the Golgi complex".

Methods Cell Biol, v.23, n., pp. 399-427, 1981.

- [71] GIVANT-HORWITZ, V., DAVIDSON, B. e REICH, R. "Laminin-induced signaling in tumor cells". *Cancer Lett*, v.223, n. 1, pp. 1-10, 2005.
- [72] YURCHENCO, P. D., TSILIBARY, E. C., CHARONIS, A. S., *et al.* "Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity". *J Biol Chem*, v.260, n. 12, pp. 7636-44, 1985.
- [73] FREIRE, E. e COELHO-SAMPAIO, T. "Self-assembly of laminin induced by acidic pH". *J Biol Chem*, v.275, n. 2, pp. 817-22, 2000.
- [74] CUKIERMAN, E., PANKOV, R. e YAMADA, K. M. "Cell interactions with three-dimensional matrices". *Curr Opin Cell Biol*, v.14, n. 5, pp. 633-9, 2002.
- [75] EVEN-RAM, S. e YAMADA, K. M. "Cell migration in 3D matrix". *Curr Opin Cell Biol*, v.17, n. 5, pp. 524-32, 2005.
- [76] CUKIERMAN, E., PANKOV, R., STEVENS, D. R., *et al.* "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension". *Science*, v.294, n. 5547, pp. 1708-12, 2001.
- [77] CHEN, Z. L. e STRICKLAND, S. "Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin". *Cell*, v.91, n. 7, pp. 917-25, 1997.
- [78] DIKE, L. E., CHEN, C. S., MRKSICH, M., *et al.* "Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates". *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v.35, n. 8, pp. 441-8, 1999.
- [79] INGBER, D. E. "Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development". *Int J Dev Biol*, v.50, n. 2-3, pp. 255-66, 2006.
- [80] VAN DER FLIER, A. e SONNENBERG, A. "Structural and functional aspects of filamins". *Biochim Biophys Acta*, v.1538, n. 2-3, pp. 99-117, 2001.
- [81] SUZUKI, N., YOKOYAMA, F. e NOMIZU, M. "Functional sites in the laminin alpha chains". *Connect Tissue Res*, v.46, n. 3, pp. 142-52, 2005.
- [82] LEE, E. C., LOTZ, M. M., STEELE, G. D., JR., *et al.* "The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor". *J Cell Biol*, v.117, n. 3, pp. 671-8, 1992.
- [83] KRAMER, R. H., VU, M. P., CHENG, Y. F., *et al.* "Laminin-binding integrin alpha 7 beta 1: functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes". *Cell Regul*, v.2, n. 10, pp. 805-17, 1991.
- [84] TALTS, J. F., ANDAC, Z., GOHRING, W., *et al.* "Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins". *Embo J*, v.18, n. 4, pp. 863-70, 1999.
- [85] HOFFMAN, M. P., NOMIZU, M., ROQUE, E., *et al.* "Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line". *J Biol Chem*, v.273, n. 44, pp.

- 28633-41, 1998.
- [86] ANDAC, Z., SASAKI, T., MANN, K., *et al.* "Analysis of heparin, alpha-dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin alpha1 chain by site-directed mutagenesis". *J Mol Biol*, v.287, n. 2, pp. 253-64, 1999.
- [87] NOMIZU, M., KIM, W. H., YAMAMURA, K., *et al.* "Identification of cell binding sites in the laminin alpha 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides". *J Biol Chem*, v.270, n. 35, pp. 20583-90, 1995.
- [88] MARTI-RENOM, M. A., STUART, A. C., FISER, A., *et al.* "Comparative protein structure modeling of genes and genomes". *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, v.29, n., pp. 291-325, 2000.
- [89] EPSTAIN, C. J., GOLDBERGER, R. F. e ANFINSEN, C. B. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, v.28, n., pp. 439, 1963.
- [90] CHOTHIA, C. e LESK, A. M. "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins". *Embo J*, v.5, n. 4, pp. 823-6, 1986.
- [91] BOISSEL, J. P., LEE, W. R., PRESNELL, S. R., *et al.* "Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure". *J Biol Chem*, v.268, n. 21, pp. 15983-93, 1993.
- [92] SHENG, Y., SALI, A., HERZOG, H., *et al.* "Site-directed mutagenesis of recombinant human beta 2-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity". *J Immunol*, v.157, n. 8, pp. 3744-51, 1996.
- [93] RING, C. S., SUN, E., MCKERROW, J. H., *et al.* "Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents". *Proc Natl Acad Sci*, v.90, n. 8, pp. 3583-7, 1993.
- [94] BAIROCH, A. e APWEILER, R. "The SWISS-PROT protein sequence database: its relevance to human molecular medical research". *J Mol Med*, v.75, n. 5, pp. 312-6, 1997.
- [95] PIKKEMAAT, M. G., LINSSEN, A. B., BERENDSEN, H. J., *et al.* "Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability". *Protein Eng*, v.15, n. 3, pp. 185-92, 2002.
- [96] CAMPBELL, J. D., DEOL, S. S., ASHCROFT, F. M., *et al.* "Nucleotide-dependent conformational changes in HisP: molecular dynamics simulations of an ABC transporter nucleotide-binding domain". *Biophys J*, v.87, n. 6, pp. 3703-15, 2004.
- [97] CAFLISCH, A. e PACI, E., "Molecular Dynamics Simulations to Study Protein Folding and Unfolding". In: J. B. A. T. Kiefhaber (Ed.), *Protein Folding Handbook*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2005.
- [98] LEONTIADOU, H., MARK, A. e MARRINK, S. "Ion transport across transmembrane pores". *Biophys J*, n., pp., 2007.

- [99] GURTOVENKO, A. A. e VATTULAINEN, I. "Lipid transmembrane asymmetry and intrinsic membrane potential: two sides of the same coin". *J Am Chem Soc*, v.129, n. 17, pp. 5358-9, 2007.
- [100] GURTOVENKO, A. A. e VATTULAINEN, I. "Ion leakage through transient water pores in protein-free lipid membranes driven by transmembrane ionic charge imbalance". *Biophys J*, v.92, n. 6, pp. 1878-90, 2007.
- [101] BERENDSEN, H. J. C. e VAN GUNSTEREN, W., "Practical algorithms for dynamics simulations." In: N.-H. Phys (Ed.), *Molecular dynamics simulation of statistical mechanical systems.*, Amsterdam, 1986.
- [102] ALLEN, M. P. e TILDESLEY, D. J., "Computer Simulation of Liquids." Oxford, Clarendon Press, 1987.
- [103] VAN GUNSTEREN, W. F., "Molecular dynamics and stochastic dynamics simulation: a primer." In: W. F. V. G. P. K. W. A. J. Wilkinson. (Ed.), *Simulations of Biomolecular Systems.*, Leiden, ESCOM Science, 1994.
- [104] ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., *et al.* "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res*, v.25, n. 17, pp. 3389-402, 1997.
- [105] XIAO, T., TAKAGI, J., COLLIER, B. S., *et al.* "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics". *Nature*, v.432, n. 7013, pp. 59-67, 2004.
- [106] THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. e GIBSON, T. J. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice". *Nucleic Acids Res*, v.22, n. 22, pp. 4673-80, 1994.
- [107] SALI, A. e BLUNDELL, T. L. "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints". *J Mol Biol*, v.234, n. 3, pp. 779-815, 1993.
- [108] HUMPHREY, W., DALKE, A. e SCHULTEN, K. "VMD: visual molecular dynamics". *J Mol Graph*, v.14, n. 1, pp. 33-8, 27-8, 1996.
- [109] CANG, H. X. e BI, R. C., "NOC Home". Disponível em: <<http://noc.ibp.ac.cn/index.htm>>. Acesso em: 10-02-2006.
- [110] RAMACHANDRAN, G. N., RAMAKRISHNAN, C. e SASISEKHARAN, V. "Stereochemistry of polypeptide chain configurations". *J Mol Biol*, v.7, n., pp. 95-9, 1963.
- [111] VOET, D. e VOET, J. G., "Biochemistry". New York, John Wiley, 1995.
- [112] LASKOWSKI, R. A., MOSS, D. S. e THORNTON, J. M. "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures". *J Mol Biol*, v.231, n. 4, pp. 1049-67, 1993.
- [113] LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. e COX, M. M., "Principles of Biochemistry". New York, Work Publishers, 1982.

- [114] BERENDSEN, H. J. C., VAN DER SPOEL, D. e VAN DRUNEN, R. "GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation." *Comp. Phys. Comm.*, n. 91, pp. 43-56, 1995.
- [115] VAN GUNSTEREN, W. F. e BERENDSEN, H. J. C. "Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry." *Chem. Int. Ed. Engl.*, v.29, n., pp. 992-1023, 1990.
- [116] HERMANS, J., BERENDSEN, H. J. C., VAN GUNSTEREN, W. F., *et al.* "A consistent empirical potential for water-protein interactions." *Biopolymers*, v.23, n., pp. 1513-1518, 1984.
- [117] OOSTENBRINK, C., VILLA, A., MARK, A. E., *et al.* "A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6". *J Comput Chem*, v.25, n. 13, pp. 1656-76, 2004.
- [118] WIBERG, G. S. e GRICE, H. C. "Effect of prolonged individual caging on toxicity parameters in rats". *Food Cosmet Toxicol*, v.3, n. 4, pp. 597-603, 1965.
- [119] BERENDSEN, H. J. C., POSTMA, J. P. M., VAN GUNSTEREN, W. F., *et al.* "Molecular dynamics with coupling to an external bath." *J. Chem. Phys.*, v.81, n., pp. 3684-3690, 1984.
- [120] DARDEN, T., YORK, D. e PEDERSEN, P. "Particle mesh Ewald: an N.log(N) method for Ewald sums in large systems." *J. Chem. Phys.*, v.98, n., pp. 10089-10092, 1993.
- [121] KRISINEL, E. e HERINCK, K., "Detection of Protein Assemblies in Crystals." 1st. Springer Berlin / Heidelberg, 2005.
- [122] TISI, D., TALTS, J. F., TIMPL, R., *et al.* "Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin". *Embo J*, v.19, n. 7, pp. 1432-40, 2000.
- [123] HARRISON, D., HUSSAIN, S. A., COMBS, A. C., *et al.* "Crystal structure and cell surface anchorage sites of laminin alpha1LG4-5". *J Biol Chem*, v.282, n. 15, pp. 11573-81, 2007.
- [124] GUEX, N. e PEITSCH, M. C. "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling". *Electrophoresis*, v.18, n. 15, pp. 2714-23, 1997.
- [125] IDO, H., HARADA, K., FUTAKI, S., *et al.* "Molecular dissection of the alpha-dystroglycan- and integrin-binding sites within the globular domain of human laminin-10". *J Biol Chem*, v.279, n. 12, pp. 10946-54, 2004.
- [126] SAITO, K. e NAKANO, R. "Partial BFGS update and efficient step-length calculation for three-layer neural networks". *Neural Comput*, v.9, n. 1, pp. 123-41, 1997.
- [127] RUEDA, M., FERRER-COSTA, C., MEYER, T., *et al.* "A consensus view of protein dynamics". *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, n. 3, pp. 796-801, 2007.

- [128] FERNANDEZ, J. H., SILVA, C. A., ASSAKURA, M. T., *et al.* "Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom". *Biochem Biophys Res Commun*, v.329, n. 2, pp. 457-64, 2005.
- [129] VON DER MARK, H., WILLIAMS, I., WENDLER, O., *et al.* "Alternative splice variants of alpha 7 beta 1 integrin selectively recognize different laminin isoforms". *J Biol Chem*, v.277, n. 8, pp. 6012-6, 2002.
- [130] CALVETE, J. J., MARCINKIEWICZ, C., MONLEON, D., *et al.* "Snake venom disintegrins: evolution of structure and function". *Toxicon*, v.45, n. 8, pp. 1063-74, 2005.
- [131] NATH, D., SLOCOMBE, P. M., WEBSTER, A., *et al.* "Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha6beta1 integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility". *J Cell Sci*, v.113 (Pt 12), n., pp. 2319-28, 2000.
- [132] GUPTA, S., LI, H. e SAMPSON, N. S. "Characterization of fertilin beta-disintegrin binding specificity in sperm-egg adhesion". *Bioorg Med Chem*, v.8, n. 4, pp. 723-9, 2000.

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](#)