

## Artigo

## Efeito estrutural e dinâmico da alteração do padrão de ligações dissulfeto do fator de crescimento vascular endotelial

Horta, B. A. C.;\* de Alencastro, R. B.

Rev. Virtual Quim., 2011, 3 (1), 37-50. Data de publicação na Web: 15 de março de 2011

<http://www.uff.br/rvq>

### Structural and dynamic effects of changing the pattern of disulfide bonds in the vascular endothelial growth factor

**Abstract:** The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key mediator of angiogenesis and is related to several physiological and pathological processes. VEGF is a dimeric protein that belongs to a superfamily of proteins that include in their structures a set of disulfide bonds forming the so called cystine knot. The presence of these disulfide bonds in the structure of VEGF is related to its biological activity, but is not responsible to its thermodynamic stability. The present study aims at the investigation *via* molecular dynamics simulations of the effects of mutations of cysteine residues on the structure and dynamics of VEGF. Modified models (*i.e.* mutants) of VEGF are constructed by replacing certain cysteine residues by alanine or serine residues in such a way that selected disulfide bonds are broken. Molecular dynamics simulations of these models are then carried out and the results are compared to the ones previously obtained for the native structure (WT: wild type) and to the respective crystallographic structures of the mutants. The simulations indicate that the replacement of cysteine residues by alanine or serine promote localized structural changes, basically affecting the loop-2, which is localized at the receptor-binding region.

**Keywords:** VEGF; angiogenesis; molecular dynamics; disulfide bond.

### Resumo

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF: “vascular endothelial growth factor”) é um mediador chave do processo de angiogênese e está relacionado a vários processos fisiológicos e patológicos. O VEGF é uma proteína dimérica que faz parte de uma superfamília de proteínas que possuem em suas estruturas um conjunto de ligações dissulfeto denominado “nó de cistina” (cystine knot). A presença dessas ligações dissulfeto na estrutura do VEGF está relacionada à sua atividade biológica, mas não é responsável pela sua estabilidade termodinâmica. O presente estudo, dedica-se à investigação por simulações de dinâmica molecular dos efeitos de mutações de resíduos de cisteína na estrutura e na dinâmica do VEGF. Modelos modificados (*i.e.* mutantes) do VEGF são gerados através da troca de certos resíduos de cisteína por resíduos de alanina ou serina de forma que ligações dissulfeto selecionadas sejam rompidas. Simulações de dinâmica molecular destes modelos são conduzidas e os resultados são então comparados com aqueles da estrutura nativa (WT: wild type) e com as estruturas cristalográficas dos respectivos mutantes. As simulações indicam que a troca de resíduos de cisteína por resíduos de alanina ou serina provocam mudanças estruturais e dinâmicas localizadas, basicamente, afetam a alça-2, que está localizada na região de ligação ao receptor.

**Palavras-chave:** VEGF; angiogênese; dinâmica molecular; ligação dissulfeto.

\* Laboratory of Physical Chemistry, ETH-Zürich, Hönggerberg, HCI-G238, CH-8093 Zürich, Switzerland.

✉ [bruno.horta@gmail.com](mailto:bruno.horta@gmail.com)

DOI: [10.5935/1984-6835.20110005](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110005)

## Efeito estrutural e dinâmico da alteração do padrão de ligações dissulfeto do fator de crescimento vascular endotelial

Bruno A. C. Horta,<sup>a,\*</sup> Ricardo B. de Alencastro<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Physical Chemistry, ETH-Zürich, Hönggerberg, HCI-G238, CH-8093 Zürich, Switzerland.

<sup>b</sup> LabMMol, Dpto. de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CT, Bloco A, lab. 609, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil.

\* [bruno.horta@gmail.com](mailto:bruno.horta@gmail.com)

Recebido em 28 de fevereiro de 2011. Aceito para publicação em 15 de março de 2011

### 1. Introdução

### 2. Detalhes Computacionais

### 3. Resultados e discussão

### 4. Conclusões



## 1. Introdução

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) tem como principal atividade biológica a promoção do crescimento e maturação de células endoteliais vasculares derivadas de artérias, veias ou vasos linfáticos.<sup>1</sup> O VEGF é um potente indutor da angiogênese e isso pode ser comprovado em vários modelos *in vitro*<sup>2</sup> e *in vivo*.<sup>3,4</sup> Outras atividades biológicas também são induzidas pelo VEGF, como a produção de surfactantes por células alveolares do tipo II,<sup>5</sup> prevenção da apoptose de células endoteliais pela indução da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e A1 nessas células,<sup>6,7</sup> promoção de quimiotaxia (o movimento orientado de células ou organismos induzido por agentes químicos) de monócitos<sup>8</sup> e indução de formação de colônias de células progenitoras de macrófagos,<sup>9</sup> inibição do desenvolvimento de células dendríticas<sup>10</sup> e estimulação da produção de células B e da geração de células mieloides imaturas<sup>11</sup>. O VEGF é também responsável pela sobrevivência de células tronco hematopoiéticas durante o processo de repopulação dessas células.<sup>12</sup> Além disso, tem a capacidade de

promover vazamento vascular e, por isso, o VEGF também é conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF: “vascular permeability factor”).<sup>13,14</sup> Essa capacidade de aumentar a permeabilidade vascular relaciona-se a processos inflamatórios e outras patologias.<sup>15</sup> Sabe-se também da participação do VEGF em processos como a vasodilatação, a taquicardia, a hipotensão e a diminuição do déficit cardíaco.<sup>16,17</sup>

O VEGF faz parte de uma superfamília de proteínas caracterizada pela presença de ligações dissulfeto muito conservadas que formam o chamado “nó de cistina” (cystine knot).<sup>18</sup> O VEGF possui oito resíduos de cisteína em cada monômero, seis responsáveis por três ligações dissulfeto intramoleculares (Cys26 – Cys68, Cys57 – Cys102, Cys61 – Cys104) e dois responsáveis por duas ligações dissulfeto entre os dois monômeros (Cys51 – Cys60\* e Cys51\* – Cys60; nesta notação, o asterisco (\*) indica que o resíduo pertence ao outro monômero).

Em 1994, Pötgens e colaboradores<sup>19</sup> demonstraram experimentalmente que a dimerização covalente é necessária para a atividade biológica do VEGF já que, a mutação dos resíduos Cys51 ou Cys60 para serina impede a dimerização e leva à perda de

atividade. A mutação do resíduo Cys57 para serina, porém, não impede a formação do dímero, nem perturba drasticamente a atividade biológica do VEGF. O mesmo trabalho mostrou também que a mistura dos mutantes C57S e C60S, na mesma proporção, origina um dímero com uma única ligação dissulfeto entre os monômeros e que esta espécie heterodimérica é tão ativa quanto o VEGF original. Em 2002, Muller e colaboradores<sup>20</sup> mostraram que o nó de cistina não tem importância na manutenção da estabilidade termodinâmica do VEGF. Aliás, o trabalho mostrou que a mutação, por alanina, de pares de resíduos de cisteína envolvidos nas ligações dissulfeto estabiliza o VEGF em  $\sim 2$  kcal/mol. Entretanto, observou-se que as ligações dissulfeto são importantes na manutenção da estabilidade térmica.

Em certas proteínas, as ligações dissulfeto são importantes para regular a estabilidade termodinâmica, induzir um determinado tipo de enovelamento e até modular a atividade biológica.<sup>21,22</sup> Estudos de dinâmica molecular foram utilizados para investigar o papel das ligações dissulfeto nos movimentos internos de proteínas.<sup>23,24</sup> Como um fator restritivo, sabe-se que essas ligações implicam na redução da entropia do sistema, no aumento das correlações dos movimentos internos, na alteração do padrão de ligações de hidrogênio e na alteração de interações de longo alcance.<sup>24</sup>

O uso de simulações de dinâmica molecular no refino de estruturas obtidas por homologia, obtidas por métodos *ab initio* e geradas por mutações de resíduos na seqüência de uma proteína de estrutura tridimensional conhecida é muito discutido na literatura.<sup>25-27</sup> O paradigma de que simulações de dinâmica molecular não são capazes de refinar essas estruturas na ausência de dados experimentais vem sendo derrubado. O trabalho de Mark e colaboradores<sup>27</sup> mostra que estruturas de proteínas com até 100 resíduos, geradas por homologia ou por métodos *ab initio* de predição estrutural, foram, de forma geral, refinadas e tornaram-se bem semelhantes a suas estruturas cristalográficas. Os autores ressaltam que, no passado, a maior parte dos trabalhos mostrava que a ineficiência das simulações no refino de estruturas era consequência da não inclusão da descrição atômica completa do sistema, da não inclusão discreta do solvente e do curto tempo das simulações, que não eram longas o suficiente para que as mudanças conformacionais necessárias ocorressem. Nesse trabalho, os autores mostram que, para um conjunto de 15 estruturas de proteínas com tamanho médio de 100 aminoácidos, mudanças conformacionais importantes começam a acontecer por volta de 5 ns e que, em alguns casos, são

necessários tempos superiores a 100 ns.

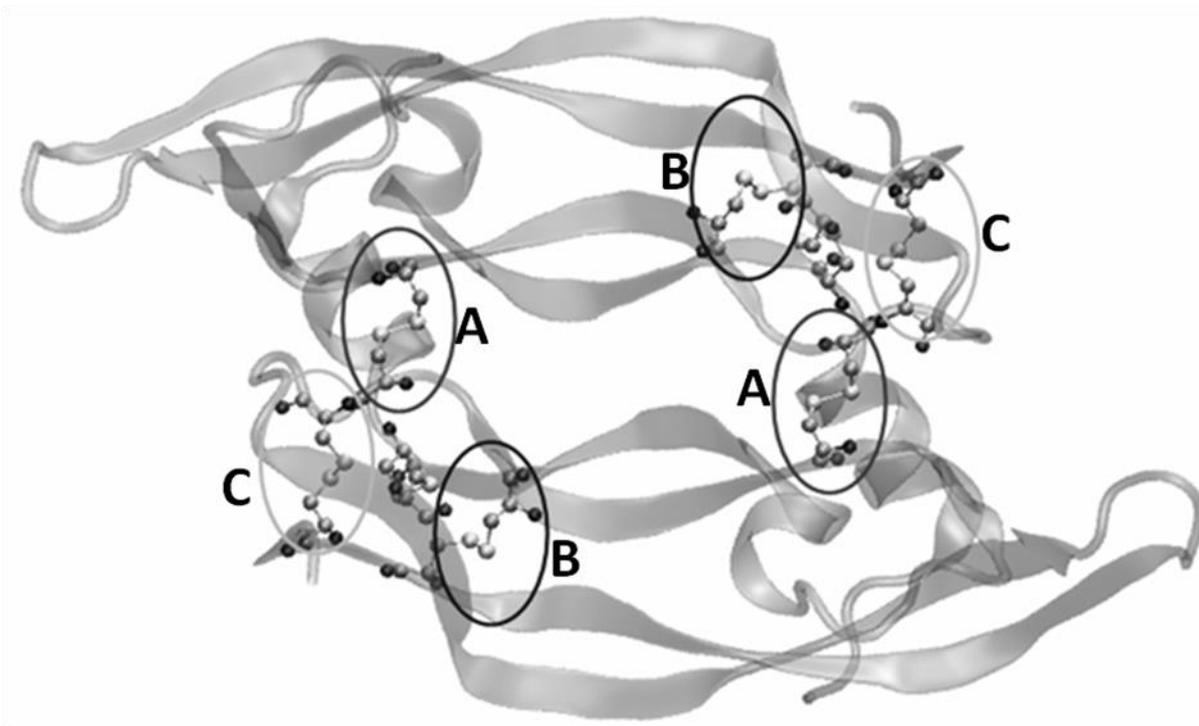
No presente estudo, objetiva-se investigar por dinâmica molecular os efeitos de mutações de resíduos de cisteína na estrutura e na dinâmica do VEGF, visto que estes resíduos são responsáveis pela formação de ligações dissulfeto inter- e intra-monômero. Além disso, pretende-se investigar se simulações relativamente curtas (10 ns) de dinâmica molecular são capazes “refinar” as estruturas dos modelos mutantes. Com essas finalidades, modelos modificados (*i.e.* mutantes) do VEGF são gerados através da troca de certos resíduos de cisteína por resíduos de alanina ou serina de forma que ligações dissulfeto selecionadas sejam rompidas. Simulações de dinâmica molecular destes modelos são conduzidas e os resultados são então comparados com aqueles da estrutura nativa (WT: wild type) e com as estruturas cristalográficas dos respectivos mutantes.

## 2. Detalhes Computacionais

Para investigar o papel das ligações dissulfeto, oito simulações de dinâmica molecular foram realizadas. Cinco delas partiram da mesma estrutura utilizada como ponto de partida na simulação do VEGF livre, ou seja, a primeira estrutura (modelo 1 do conjunto de estruturas de código PDB: 1KAT) de RMN, determinada por Pan e colaboradores.<sup>28</sup> Para estas cinco simulações, a estrutura inicial foi, primeiramente, modificada para a construção dos mutantes. O mutante C51A/C60A, caracterizado pela ausência das ligações dissulfeto entre os monômeros (Figura 1), foi construído pela substituição dos resíduos Cys51 e Cys60 por alanina. O mutante heterodímero C51A/C60A\*, caracterizado pela ausência de uma das ligações dissulfeto entre os monômeros, foi construído pela substituição do resíduo Cys51 de um monômero e do resíduo Cys60 do outro monômero por alanina. O mutante heterodímero C51S/C60S\* foi construído da mesma forma que o C51A/C60A\*, porém, os resíduos de cisteína foram substituídos por serina. O mutante C57A/C102A foi construído pela substituição dos resíduos Cys57 e Cys102 por alanina e o mutante C61A/C104A pela substituição dos resíduos Cys61 e Cys104 também por alanina (Figura 1). As três outras simulações tiveram como ponto de partida estruturas cristalográficas depositadas no PDB. Muller e colaboradores<sup>20</sup> determinaram as estruturas tridimensionais dos mutantes C51A/C60A, C57A/C102A e C61A/C104A (códigos PDB: 1MJV,

1MKG e 1MKK, respectivamente) por difração de raios-X. O símbolo <sup>§</sup> foi utilizado para indicar que estas

simulações partiram de estruturas cristalográficas.



**Figura 1.** Representação estrutural do VEGF enfatizando os resíduos de cisteína que participam de ligações dissulfeto. (A) ligações dissulfeto intercadeia (entre os monômeros do VEGF). Elas são formadas pelos resíduos Cys51 de um monômero e Cys60 do outro. Os mutantes C51A/C60A\* e C51S/C60S\* foram construídos para apresentarem somente uma dessas ligações dissulfeto. (B) ligações dissulfeto intracadeia formadas pelos resíduos Cys57 e Cys102. (C) ligações dissulfeto intracadeia formadas por Cys61 e Cys104

As oito simulações de dinâmica molecular foram realizadas no *ensemble* NPT, utilizando o pacote computacional *GROMACS*<sup>29,30</sup> e o campo de forças *OPLS all-atom* estendido para o tratamento de biomoléculas.<sup>31</sup> Primeiramente, um procedimento de minimização de energia foi aplicado à cada estrutura inicial para remover contatos de alta energia. A minimização utilizou 1000 passos do algoritmo *steepest descent* (SD). Posteriormente, cada sistema foi solvatado dentro de uma caixa retangular contendo aproximadamente 9000 moléculas de água do tipo SPC,<sup>32</sup> sendo que 12 delas foram posteriormente substituídas por contra-íons Na<sup>+</sup> para neutralizar o sistema. Essa substituição foi realizada pelo módulo *genion* do pacote *GROMACS* que recalcula o potencial eletrostático após a inclusão de cada contra-íon. A partir desse ponto foram aplicadas condições periódicas de contorno, o algoritmo LINC3<sup>33</sup> para fixar estiramentos envolvendo átomos de hidrogênio e o método do somatório de Ewald<sup>34</sup> para o tratamento de interações eletrostáticas de longo alcance. Simulações prévias das moléculas de água e dos contra-íons foram realizadas na temperatura de

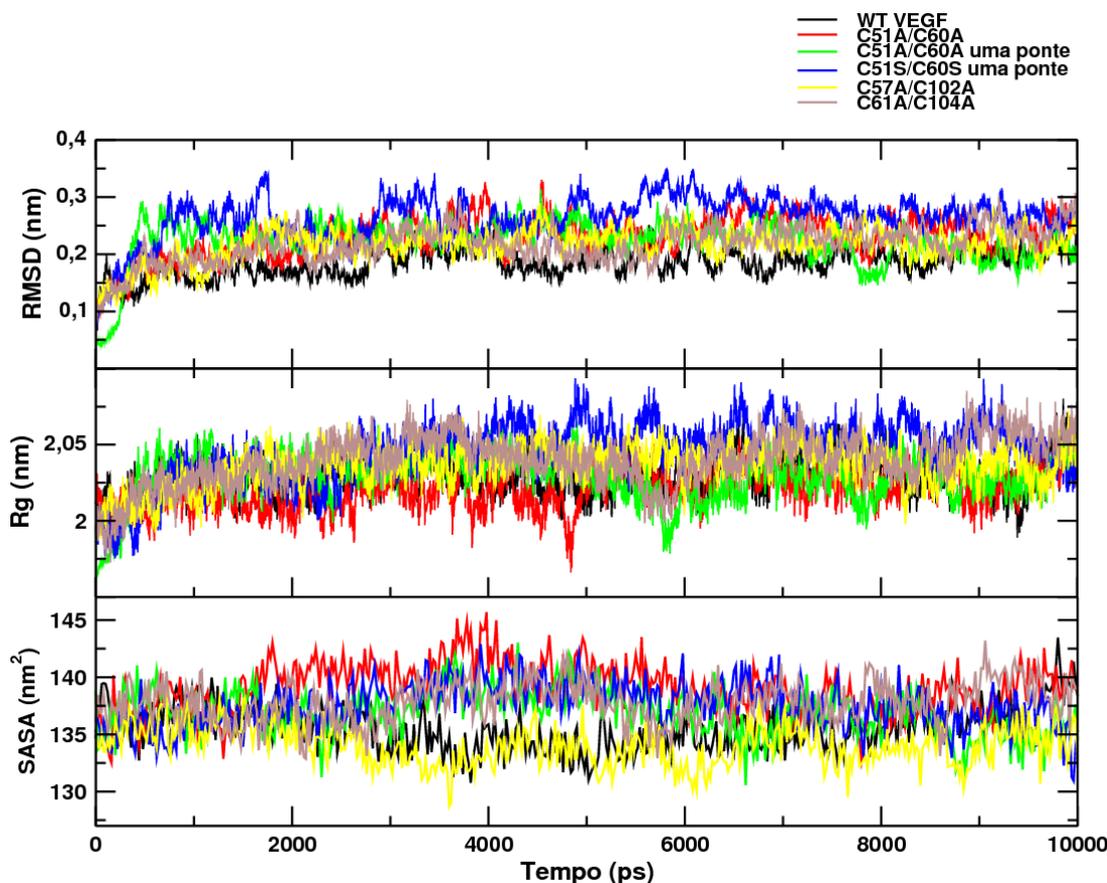
300 K e 1 atm com o objetivo de equilibrá-los ao potencial exercido pela proteína e permitir que as moléculas de água penetrassem nas cavidades da superfície da proteína. Nessa etapa, potenciais harmônicos foram utilizados para restringir o movimento dos átomos da proteína. As equações de movimento foram integradas segundo o algoritmo *Verlet Leapfrog*.<sup>35</sup> O controle de temperatura e pressão foi realizado por acoplamento fraco a um banho externo segundo o formalismo de Berendsen,<sup>36</sup> com tempos de relaxamento de 0.1 e 1.0 ps, respectivamente e compressibilidade isotérmica de  $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ . Após equilibrar moléculas de água e íons, a energia do sistema foi minimizada por 1000 passos do algoritmo SD. Cada sistema foi aquecido gradualmente até a temperatura de 300 K utilizando seis blocos de simulação. No primeiro bloco a temperatura variou de 0 a 50 K, no segundo de 50 a 100 K, e assim por diante. Cada bloco durou 50 ps, totalizando 300 ps na etapa de aquecimento.<sup>37</sup> Com os oito sistemas termalizados em 300 K e 1 atm, a etapa de aquisição de dados foi iniciada. Exceto pelos estiramentos envolvendo átomos de hidrogênio,

nenhuma restrição foi imposta aos sistemas. Cada simulação foi desenvolvida com intervalo de integração de 2 fs e tempo total de 10 ns.

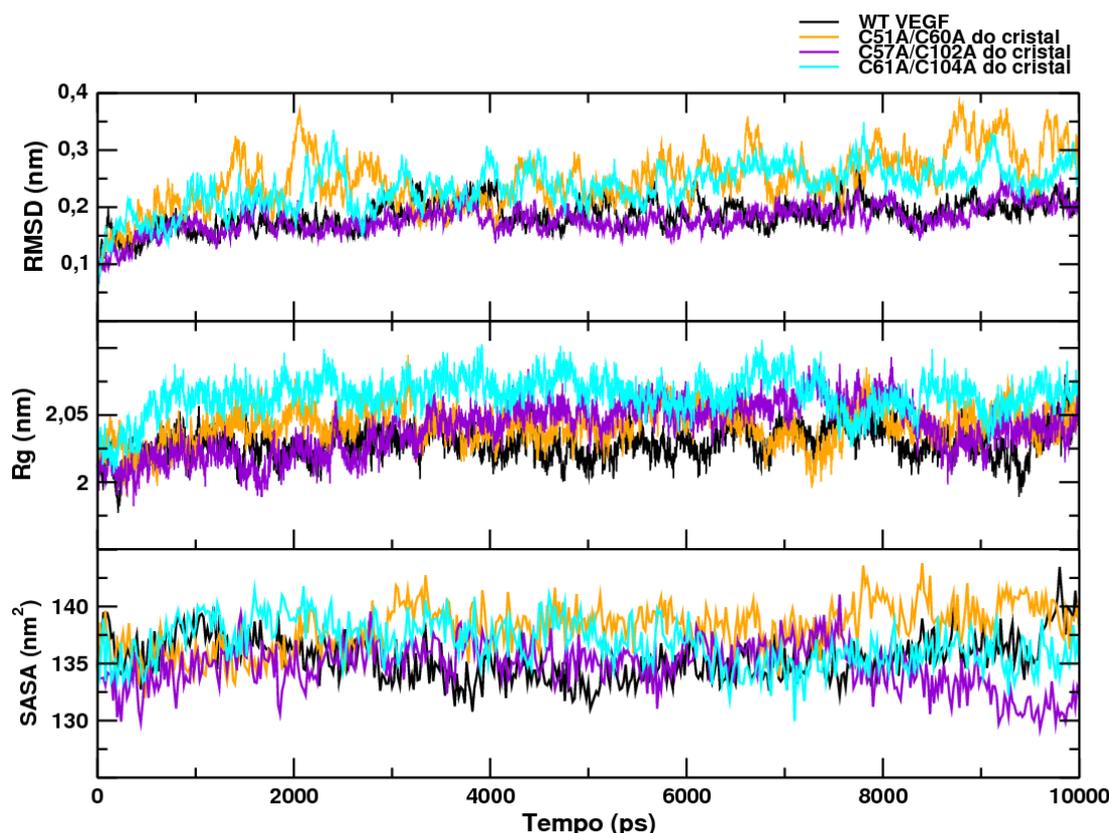
### 3. Resultados e discussão

O desvio do valor quadrático médio (RMSD: “root mean-square deviation”) das posições atômicas em relação à estrutura inicial, o raio de giro (Rg) e a área superficial acessível ao solvente (SASA) de cada simulação cujo ponto de partida foi a estrutura

modificada do VEGF nativo estão mostrados na Figura 2. A Figura 3 mostra os mesmos dados para as simulações que tiveram estruturas cristalográficas como ponto de partida. Nota-se que, após aproximadamente 1 ns de simulação, todas as séries temporais atingem regiões de estabilidade e apenas flutuam em torno desses valores. Como esperado, todas as simulações tiveram valores de RMSD maiores do que o VEGF nativo (abreviado por WT VEGF: *wild type* VEGF). Observa-se também, de uma forma geral, Rg e SASA maiores para os mutantes do que para o WT VEGF.



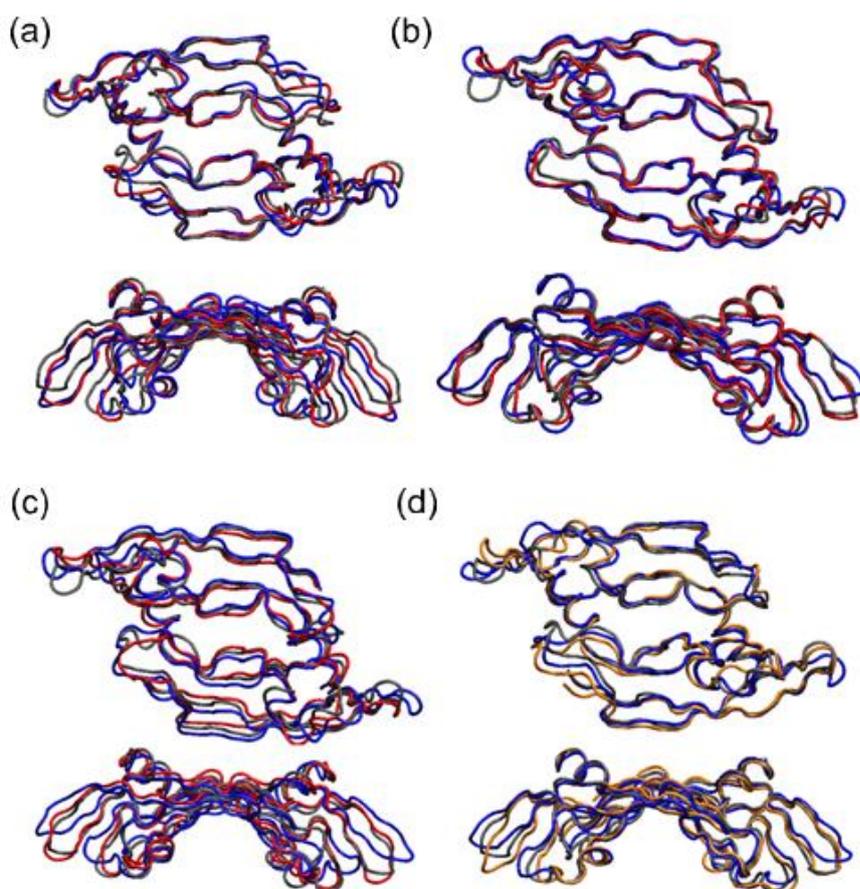
**Figura 2.** (A) RMSD relativo às posições iniciais dos átomos de  $C\alpha$ , (B) raio de giro (Rg), (C) área superficial acessível ao solvente (SASA) dos sistemas cujo ponto de partida foi a estrutura do VEGF modificada. A legenda no canto superior direito relaciona as cores aos sistemas



**Figura 3.** (A) RMSD relativo às posições iniciais dos átomos de C $\alpha$ , (B) raio de giro (Rg), (C) área superficial acessível ao solvente (SASA) dos sistemas cujos pontos de partida foram as respectivas estruturas cristalográficas. A legenda no canto superior direito relaciona as cores aos sistemas

Estruturas médias representativas do final das simulações foram obtidas considerando 2500 configurações no intervalo de tempo de 5-10 ns. A Figura 4 mostra as sobreposições dessas estruturas em relação à estruturas cristalográficas. A Tabela 1 mostra valores médios de RMSD entre estruturas obtidas da simulação e estruturas cristalográficas. A estrutura média do mutante C51A/C60A (em azul na Figura 4a) assemelha-se mais à estrutura cristalográfica deste mutante (em vermelho, código PDB: 1MJV), RMSD de  $\sim 0,147$  nm, do que à estrutura cristalográfica do VEGF (código PDB: 2VPF), RMSD de  $\sim 0,211$  nm. Isso indica que, mesmo partindo da estrutura inicial do VEGF, a simulação convergiu corretamente para a estrutura do mutante. A estrutura média do mutante C57A/C102A (em azul, Figura 4b) assemelha-se às estruturas do VEGF e do cristal desse mutante, e tem o mesmo valor de RMSD,  $\sim 0,149$  nm. Este resultado já era esperado, visto que o valor de RMSD entre as estruturas experimentais cristalográficas do VEGF e desse mutante é  $0,119$  nm. Em outras palavras, o resultado experimental indica que a mutação dos resíduos Cys57 e Cys102 para

alanina não afeta significativamente a estrutura. A estrutura média do mutante C61A/C104A (em azul, Figura 4c) assemelha-se mais à estrutura do VEGF do que à estrutura do cristal desse mutante. Os valores de RMSD são  $\sim 0,171$  e  $\sim 0,261$  nm em relação ao VEGF e ao cristal do mutante, respectivamente. Isso indica que, nesse tempo de simulação, a estrutura não converge para a estrutura esperada. Estruturas cristalográficas dos mutantes que possuem apenas uma ligação dissulfeto (C51A/C60A\* e C51S/C60S\*) entre os monômeros não foram ainda determinadas. Porém, uma comparação das estruturas médias obtidas por simulação desses mutantes com as estruturas cristalográficas do WT VEGF e do mutante C51A/C60A (ver Tabela 1 e Figura 4d) indicam que estes mutantes se assemelham mais ao VEGF do que ao C51A/C60A. Este resultado de simulação sugere que a ausência de uma ligação dissulfeto não altera de forma significativa a estrutura do VEGF e, possivelmente, explica porque heterodímeros com uma ligação dissulfeto entre monômeros são capazes de ativar os receptores de VEGF e promover angiogênese.<sup>19</sup>



**Figura 4.** Sobreposição de estruturas médias de dinâmica molecular e estruturas cristalográficas. (a) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C51A/C60A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C51A/C60A em vermelho. (b) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C57A/C102A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C57A/C102A em vermelho. (c) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C61A/C104A em azul, e estrutura cristalográfica do mutante C61A/C104A em vermelho. (d) Estrutura cristalográfica do VEGF em preto, estrutura média do mutante C51A/C60A\* em azul, e estrutura média do mutante C51S/C60S\* em amarelo

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

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

códigos PDB: 2VPF<sup>a</sup>, 1MJV<sup>b</sup>, 1MKG<sup>c</sup>, 1MKK<sup>d</sup>.

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

<sup>§</sup> Estruturas que tiveram como ponto de partida as estruturas cristalográficas.

Para verificar se as simulações foram eficientes na obtenção de estruturas médias razoáveis para as proteínas mutantes, outras simulações foram realizadas a partir das estruturas cristalográficas desses mutantes. Para isso, os sistemas C51A/C60A<sup>§</sup>, C57A/C102A<sup>§</sup> e C61A/C104A<sup>§</sup> foram construídos conforme descrito anteriormente. A principal questão é compreender se os desvios observados para as simulações que não convergiram para a estrutura do cristal, principalmente C61A/C104A, são devidos a problemas da simulação (isto é, tempo de simulação insuficiente, problemas relacionados ao campo de força, etc.) ou se as estruturas de alguns cristais não correspondem às suas estruturas em solução. Para o mutante C51A/C60A<sup>§</sup>, o valor de RMSD, ~0,208 nm em relação a sua estrutura cristalográfica, é maior do que o valor ~0,147 nm obtido para a simulação que teve como ponto de partida o VEGF. Este resultado é, de alguma forma, interessante e inesperado, visto que a simulação que teve como estrutura de partida um modelo criado a partir de outra estrutura se assemelha mais à estrutura cristalográfica do mutante C51A/C60A do que a simulação que teve como ponto de partida a própria estrutura cristalográfica do mutante C51A/C60A. Pode-se dizer que a simulação partindo do modelo convergiu para a estrutura experimental. Para o mutante C57A/C102A<sup>§</sup>, o RMSD em relação à estrutura cristalográfica das simulações partindo do VEGF, ~0,189 nm, e da estrutura cristalográfica, ~0,192, é muito semelhante. Pode-se dizer que a simulação partindo deste modelo também convergiu para a estrutura experimental. No caso do mutante C61A/C104A<sup>§</sup>, valores elevados de RMSD são observados para a simulação partindo do VEGF, ~0,261 nm, e para a simulação partindo do cristal, ~0,211 nm. Houve uma clara divergência dos valores de RMSD, principalmente, da simulação que partiu do modelo baseado no WT VEGF. O valor elevado de ~0,211 nm da simulação que partiu do cristal desse mutante pode ser um indicativo de que a estrutura presente em solução pode apresentar, possivelmente, diferenças conformacionais em relação a sua estrutura cristalográfica. O valor muito elevado de RMSD (~0,261 nm) da simulação partindo do VEGF indica que a simulação não convergiu para a estrutura experimental. A estrutura cristalográfica deste mutante mostra que, na interface entre os monômeros, quatro resíduos sofrem mudanças conformacionais drásticas em suas cadeias laterais.<sup>20</sup> Estes resíduos são His27, Glu30, Ile29 e Leu32. As

reorientações das cadeias laterais desses resíduos, na melhor das hipóteses, ocorreriam na escala de tempo de ps a ns, mas como estes resíduos estão na interface e impedidos espacialmente, tempos muito maiores são esperados e estes eventos não seriam observados na escala de tempo da simulação. Esta pode ser uma possível explicação para o alto valor de RMSD encontrado.

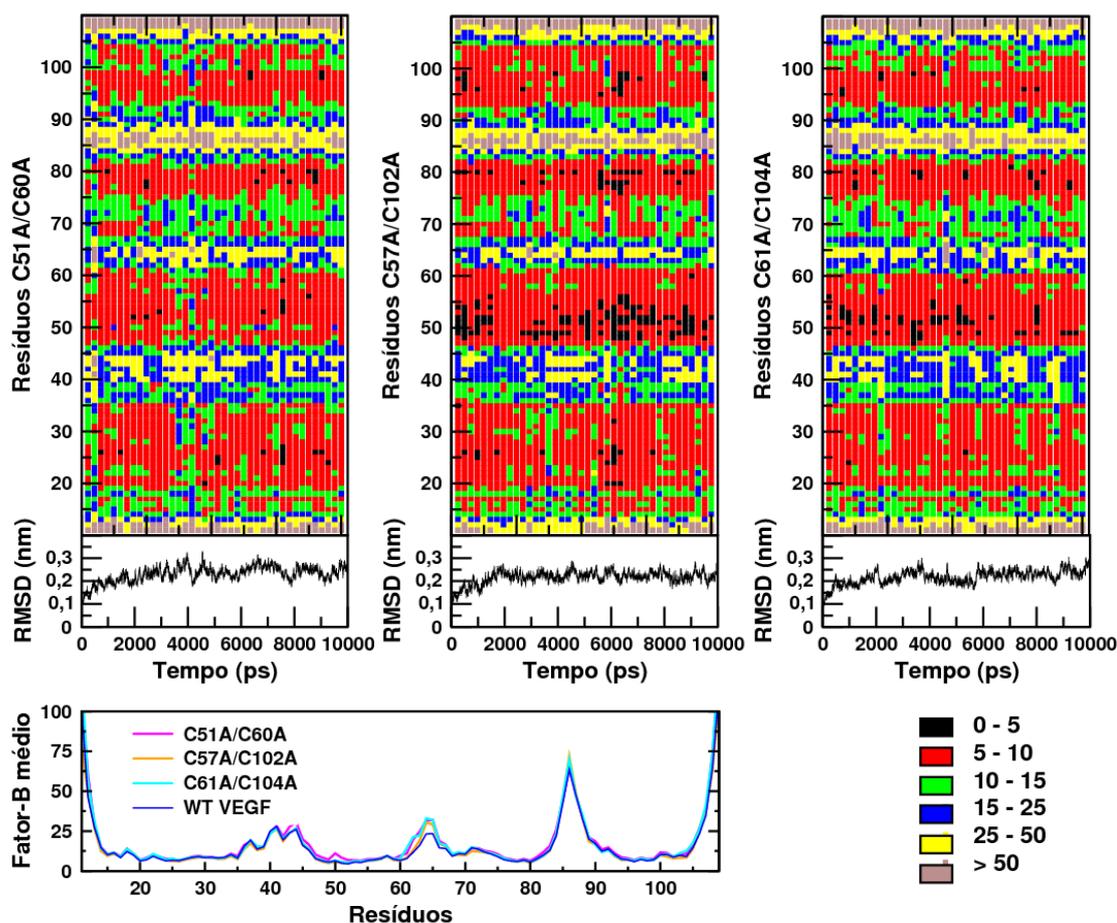
A Tabela 2 mostra os números médios e os desvios padrão de ligações de hidrogênio obtidos de 2500 configurações sobre os últimos 5 ns das trajetórias. Ligações de hidrogênio foram definidas segundo critério geométrico: (i) distância de corte entre os átomos doador e receptor de 0,35 nm; e (ii) ângulo de corte receptor-doador-hidrogênio de 30°. Os pares de grupos analisados foram: (i) proteína/proteína; (ii) cadeia-principal/cadeia-principal; (iii) cadeia-lateral/cadeia-lateral; (iv) cadeia-1/cadeia-2 (entre cadeias); (v) cadeia-1/cadeia-1; e (vi) cadeia-2/cadeia-2. O número de ligações de hidrogênio proteína-proteína variou de um valor mínimo de 126,0, para o C61A\_C104A, a um valor máximo de 133,7, para o C61A\_C104A<sup>§</sup>. Este resultado mostra que as diferentes estruturas iniciais da dinâmica molecular (isto é, uma proveniente do VEGF e uma do cristal do mutante) para o mesmo mutante levam aos resultados mais discrepantes. Como descrito anteriormente, uma possível interpretação deste resultado é a necessidade de reorganização das cadeias laterais localizadas na interface da estrutura proveniente do VEGF. Isto é reforçado quando se nota que os números de ligações de hidrogênio entre cadeias (cadeia-1/cadeia-2), cujos valores médios correspondem a 8,0 e 12,8 para os sistemas C61A\_C104A e C61A\_C104A<sup>§</sup>, respectivamente, são bem diferentes entre os dois sistemas. É possível que, com um tempo de simulação maior, C61A\_C104A se aproxime de C61A\_C104A<sup>§</sup>. A comparação dos sistemas C51A\_C60A com C51A\_C60A<sup>§</sup> e C57A\_C102A com C57A\_C102A<sup>§</sup> permite afirmar que as simulações que partiram do VEGF convergem de forma bem razoável para as simulações que partiram da estrutura dos respectivos cristais. As estruturas com uma ponte, C51A\_C60A\* e C51S\_C60S\*, possuem valores próximos dos valores calculados para o WT VEGF. Isto sugere que a mutação de uma única ponte não afeta drasticamente o perfil de ligações de hidrogênio.

**Tabela 2.** Número médio e desvio padrão de ligações de hidrogênio

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

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

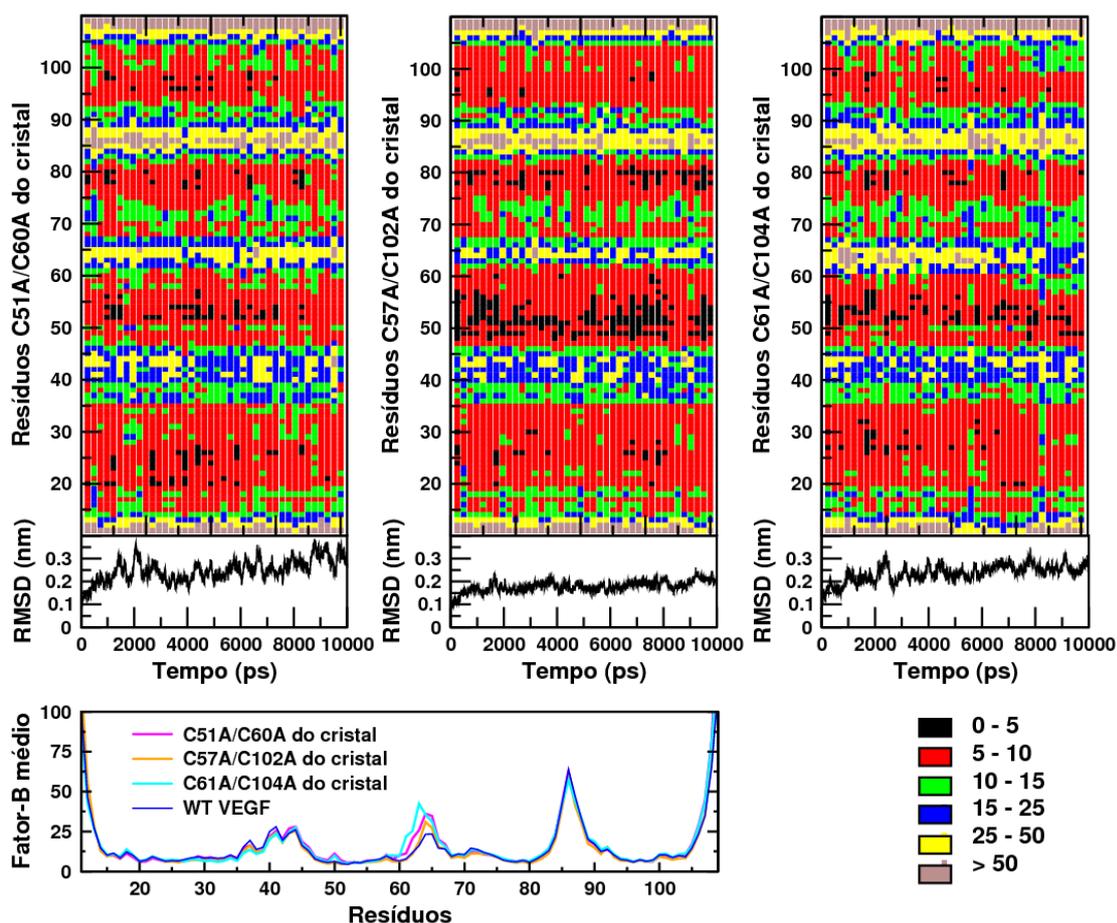
<sup>§</sup> Estruturas que tiveram como ponto de partida as estruturas cristalográficas.



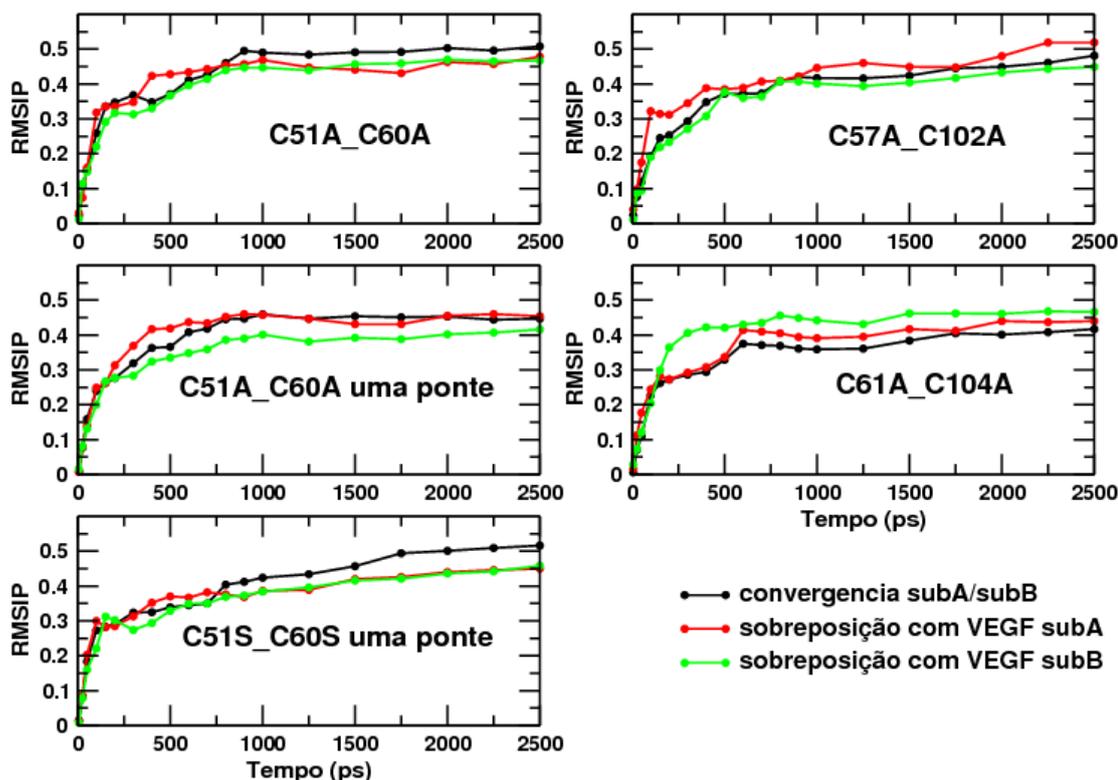
**Figura 5.** Os três painéis na parte superior da figura mostram a evolução temporal dos fatores-B coletados de janelas consecutivas de 250 ps. O painel da esquerda refere-se ao C51A/C60A, o do meio ao C57A/C102A e o da direita ao C61A/C104A. Os valores referem-se à média entre as duas cadeias. As intensidades dos fatores-B são dadas pela legenda no canto inferior direito. Abaixo de cada painel está um gráfico de RMSD calculado sobre os átomos de Ca. O RMSD médio de todos os 40 blocos aparece no painel inferior esquerdo

Os fatores-B dos átomos de Ca foram calculados sobre 40 blocos de 250 ps com intervalos de tempo de 2 ps. Em cada bloco, foi efetuada a média dos fatores-B. A média dos fatores-B entre os monômeros foi também obtida. A Figura 6 mostra a evolução temporal dos fatores-B para as simulações de C51A/C60A, C57A/C102A e C61A/C104A e a Figura 7, para as simulações C51A/C60A<sup>§</sup>, C57A/C102A<sup>§</sup> e C61A/C104A<sup>§</sup> (simulações de estruturas provenientes do cristal de cada mutante). É possível notar em todos os mapas que os valores de fator-B convergem razoavelmente. Gráficos de RMSD foram colocados abaixo de cada painel de fator-B para dar uma idéia do período de tempo em que cada bloco foi coletado. O painel inferior mostra a média dos fatores-B sobre os 40 blocos em comparação com a média calculada

para o WT VEGF. A região compreendida entre os resíduos 60 e 70 (região que contém a alça-2) é a mais afetada pelas mutações, que aumentam as flutuações atômicas nessa região. Comparando as Figuras 6 e 7, é possível observar as diferenças causadas pelas estruturas iniciais nas flutuações atômicas da região da alça-2. As simulações que partiram da estrutura modificada do VEGF (Figura 6) apresentam valores menores de fator-B do que as simulações que partiram das estruturas dos cristais (Figura 7). Em outro trabalho, foi mostrado que as flutuações atômicas dos resíduos pertencentes a alça-2 são, significativamente, aumentadas perante a complexação com ligantes e receptores.



**Figura 6.** Os três painéis na parte superior da figura mostram a evolução temporal dos fatores-B coletados de janelas consecutivas de 250 ps. O painel da esquerda refere-se ao C51A/C60A<sup>§</sup>, o do meio ao C57A/C102A<sup>§</sup> e o da direita ao C61A/C104A<sup>§</sup>. Os valores referem-se à média entre as duas cadeias. As intensidades dos fatores-B são dadas pela legenda no canto inferior direito. Abaixo de cada painel está um gráfico de RMSD calculado sobre os átomos de Ca. O RMSD médio de todos os 40 blocos aparece no painel inferior esquerdo



**Figura 7.** Gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo para as simulações dos mutantes construídos a partir da estrutura do VEGF. As linhas contínuas correspondem à sobreposição entre autovetores do mesmo sistema, mas de diferentes subpartes de 2500 ps. As linhas não-contínuas correspondem à sobreposição dos autovetores dos mutantes com o WT VEGF

A matriz de covariância  $3N \times 3N$  foi calculada e diagonalizada considerando os átomos da cadeia principal e excluindo os resíduos terminais (os cinco primeiros e últimos resíduos). A raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP: “*root mean square inner products*”) (equação 1) foi calculada entre intervalos crescentes da primeira metade da etapa de análise das simulações (de 5000 ps até 7500 ps) com a segunda metade (de 7500 ps até 10000 ps) envolvendo o subespaço composto pelos primeiros 10 autovetores (que foram considerados aqui como o subespaço essencial).<sup>37-39</sup>

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

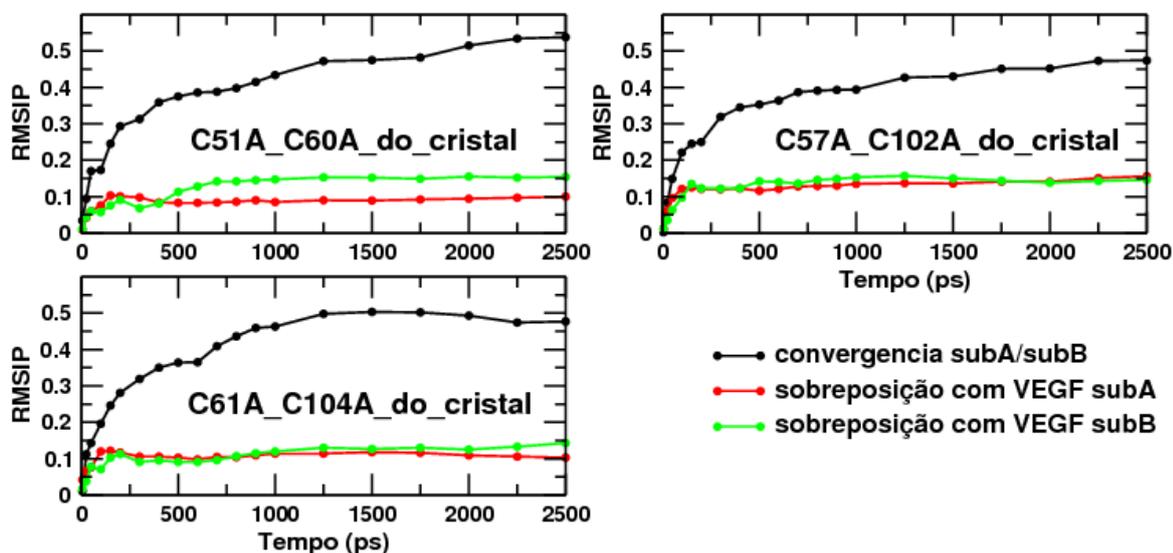
**Equação 1**

Nessa equação,  $\boldsymbol{\eta}_i$  e  $\mathbf{v}_j$  são autovetores da primeira e da segunda metades, respectivamente. Com a finalidade de evitar correlações, foram comparados apenas os autovetores obtidos da primeira metade com os autovetores obtidos da segunda metade. A *Rev. Virtual Quim.* |Vol 3| |No. 1| |37-50|

Figura 8 mostra os gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo para as simulações dos mutantes construídos a partir da estrutura do VEGF. Observa-se em todos os gráficos a convergência dos autovetores para um RMSIP de  $\sim 0,5$ . Observa-se, também, que existe alta sobreposição dos autovetores dos mutantes com os autovetores do VEGF nativo. Em princípio, isto indica que existe um alto grau de correlação dinâmica dos mutantes comparado ao VEGF nativo, apesar de existirem pequenas diferenças estruturais e diferenças nas flutuações atômicas da alça-2 entre os mutantes e o VEGF. Entretanto, a Figura 9, que mostra gráficos de RMSIP para as simulações dos mutantes construídos a partir das estruturas cristalográficas, descreve um comportamento bem diferente. Para esses sistemas, a convergência dos autovetores é observada para valores de RMSIP de  $\sim 0,5$ , mas a sobreposição com os autovetores do VEGF nativo é negligenciável (valores próximos a 0,1). Em outras palavras, no caso das simulações feitas a partir de estruturas cristalográficas, o comportamento dinâmico é bem

diferente do VEGF nativo. Este resultado mostra que existe uma alta dependência das correlações nas flutuações atômicas com a estrutura inicial e que, a convergência dessa correlações e consequente “perda

da memória da estrutura inicial” deve ocorrer em escalas de tempo muito maiores.



**Figura 8.** Gráficos da evolução da raiz quadrada da média dos produtos internos (RMSIP) com o intervalo de tempo para as simulações dos mutantes construídos a partir das suas estruturas cristalográficas correspondentes. As linhas contínuas correspondem à sobreposição entre autovetores do mesmo sistema, mas de diferentes subpartes de 2500 ps. As linhas não-contínuas correspondem à sobreposição dos autovetores dos mutantes com o WT VEGF

## 4. Conclusões

O presente estudo envolveu a análise de oito trajetórias de dinâmica molecular de proteínas modificadas do VEGF, nas quais resíduos de cisteína foram trocados por resíduos de alanina ou serina com o intuito de se investigar a importância das ligações dissulfeto na estrutura e na dinâmica do VEGF. As simulações foram comparadas com a simulação do VEGF nativo publicada anteriormente.<sup>37</sup> Cinco dessas simulações tiveram como ponto de partida a estrutura modificada do VEGF nativo e três tiveram como ponto de partida as respectivas estruturas cristalográficas das proteínas mutantes. A comparação dessas estruturas permitiu uma análise sobre a possibilidade de se refinar estruturas obtidas a partir do VEGF (prever a estrutura cristalográfica dessas proteínas mutantes). Foi possível obter valores de RMSD próximos aos valores obtidos das simulações que partiram das estruturas cristalográficas e, este processo se deu no curto intervalo de tempo de 10 ns. As flutuações atômicas

obtidas a partir dos modelos também se mostraram compatíveis com as flutuações obtidas diretamente das simulações dos cristais e indicaram que a alça-2 é a região mais afetada perante as mutações dos resíduos de cisteína considerados. Tempos de simulação muito maiores devem ser empregados para que as matrizes de covariância converjam satisfatoriamente. De forma geral, a ausência das ligações dissulfeto não provocam mudanças estruturais muito significativas, mas perturba a estrutura dos “pólos” (região que compreende as alças) do VEGF, responsáveis pela ligação ao receptor.<sup>38,39</sup>

## Referências Bibliográficas

- 1 Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M. S.; Wildiers, H.; Van Oosterom, A. T.; de Bruijn, E. A. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 2 Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- <sup>3</sup> Leung, D. W.; Cahianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N. *Science* **1989**, *246*, 1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>4</sup> Plouet, J.; Schilling, J.; Gospodarowicz, D. *EMBO J.* **1989**, *8*, 3801. [[PubMed](#)]
- <sup>5</sup> Compernelle, V.; Brusselmans, K.; Acker, T.; Hoet, P.; Tjwa, M.; Beck, H.; Plaisance, S.; Dor, Y.; Keshet, E.; Lupu, F.; Nemery, B.; Dewerchin, M.; Van Veldhoven, P.; Plate, K.; Moons, L.; Collen, D.; Carmeliet, P. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>6</sup> Gerber, H.-P.; Dixit, V.; Ferrara, N. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>7</sup> Gerber, H.-P.; McMurtrey, A.; Kowalski, J.; Yan, M.; Keyt, B. A.; Dixit, V.; Ferrara, N. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 30336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>8</sup> Clauss, M.; Gerlach, M.; Gerlach, H.; Brett, J.; Wang, F.; Familletti, P. C.; Pan, Y. C.; Olander, J. V.; Connolly, D. T.; Stern, D. *J. Exp. Med.* **1990**, *172*, 1535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>9</sup> Broxmeyer, H. E.; Cooper, S.; Li, Z. H.; Lu, L.; Song, H. Y.; Kwon, B. S.; Warren, R. E.; Donner, D. B. *Int. J. Hematol.* **1995**, *62*, 203. [[PubMed](#)]
- <sup>10</sup> Gabrilovich, D. I.; Chen, H. L.; Girgis, K. R.; Cunningham, H. T.; Meny, G. M.; Nadaf, S.; Kavanaugh, D.; Carbone, D. P. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>11</sup> Hattori, K.; Dias, S.; Heissig, B.; Hackett, N. R.; Lyden, D.; Tateno, M.; Hicklin, D. J.; Zhu, Z.; Witte, L.; Crystal, R. G.; Moore, M. A. S.; Rafii, S. *J. Exp. Med.* **2001**, *193*, 1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>12</sup> Gerber, H.-P.; Malik, A. K.; Solar, G. P.; Sherman, D.; Liang, X. H.; G., M.; Hong, K.; Marsters, J. C.; Ferrara, N. *Nature* **2002**, *417*, 954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Harvey, V. S.; Dvorak, H. F. *Science* **1983**, *219*, 983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>14</sup> Dvorak, H. F.; Brown, L. F.; Detmar, M.; Dvorak, A. M. *Am. J. Pathol.* **1995**, *146*, 1029. [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Roberts, W. G.; Palade, G. E. *J. Cell. Sci.* **1995**, *108*, 2369. [[PubMed](#)]
- <sup>16</sup> Ku, D. D.; Zaleski, J. K.; Liu, S.; Brock, T. A. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, H586. [[PubMed](#)]
- <sup>17</sup> Yang, R.; Thomas, G. R.; Bunting, S.; Ko, A.; Ferrara, N.; Keyt, B.; Ross, J.; Jin, H. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1996**, *27*, 838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>18</sup> Muller, Y. A.; Christinger, H. W.; Keyt, B. A.; Devos, A. M. *Structure* **1997**, *5*, 1325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> Pötgens, A. J. G.; Lubsen, N. H.; Van Altena, M. C.; Vermeulen, R.; Bakker, A.; Schoenmakers, J. G. G.; Ruiten, D. J.; De Waal, R. M. W. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32879. [[PubMed](#)]
- <sup>20</sup> Muller, Y. A.; Heiring, C.; Misselwitz, R.; Welfle, K.; Welfle, H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>21</sup> Barford, D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>22</sup> Ishikawa, H.; Kim, S.; Kwak, K.; Wakasugi, K.; Fayer, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>23</sup> Tidor, B.; Karplus, M. *Proteins* **1993**, *15*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>24</sup> Moghaddam, M. E.; Naderi-Manesh, H. *Proteins* **2006**, *63*, 188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>25</sup> Venclovas, C.; Zemla, A.; Fidelis, K.; Moulton, J. *Proteins* **2001**, *45*, 163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>26</sup> Schonbrun, J.; Wedemeyer, W. J.; Baker, D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>27</sup> Mark, A. E.; Fan, H. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>28</sup> Pan, B.; Li, B.; Russell, S. J.; Tom, J. Y. K.; Cochran, A. G.; Fairbrother, W. J. *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>29</sup> Berendsen, H. J. C.; Van Der Spoel, D.; Vandrunen, R. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43. [[CrossRef](#)]
- <sup>30</sup> Lindahl, E.; Hess, B.; Van Der Spoel, D. *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 306. [[CrossRef](#)]
- <sup>31</sup> Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6474. [[CrossRef](#)]
- <sup>32</sup> Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. In *Intermolecular forces*; Pullman, B.E., ed.; Dordrecht: N. L., 1981, pp. 331-342.
- <sup>33</sup> Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. J. *Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463. [[CrossRef](#)]
- <sup>34</sup> Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577. [[CrossRef](#)]
- <sup>35</sup> Hockney, R. W. *Methods Comput. Phys.* **1970**, *9*, 136.
- <sup>36</sup> Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Dinola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684. [[CrossRef](#)]

<sup>37</sup> Horta, B. A. C.; Cirino, J. J. V.; De Alencastro, R. B. *Proteins* **2007**, *67*, 517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>38</sup> Horta, B. A. C.; Cirino, J. J. V.; de Alencastro, R. B. *J. Mol. Graph. Model.* **2008**, *26*, 1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>39</sup> Horta, B. A. C.; Sodero, A. C. R.; de Alencastro, R. B. *J. Mol. Graph. Model.* **2009**, *28*, 287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]