

PREDIÇÃO IN SILICO DE NOVO MODO DE INTERAÇÃO ENTRE FIBRONECTINA E VLA-4

Jean Vieira Sampaio¹, Beatriz Chaves², João Hermínio Martins da Silva³

¹Universidade Federal do Ceará, (jeanjvs@gmail.com)

²Fundação Oswaldo Cruz, (beatriz.chaves@ioc.fiocruz.br)

³Fundação Oswaldo Cruz, (joao.martins@fiocruz.br)

Resumo

A interação entre a fibronectina e a integrina VLA-4 tem sido cada vez mais estudada por sua influência em processos oncogênicos. Alguns medicamentos atualmente disponíveis são capazes de bloquear essa interação, mas não de forma específica, o que pode levar a efeitos imunossupressores indesejados. Este trabalho busca elucidar um possível novo modo de interação entre a fibronectina e a integrina VLA-4. A metodologia empregada foi o *docking* molecular usando modelos tridimensionais cristalográficos dessas moléculas. Os resultados sugerem que o fragmento de fibronectina FNIII-14 interage em um sítio distinto de VCAM-1 e de outros fragmentos de fibronectina. Isso torna possível desenvolver um biofármaco capaz de modular a interação entre VLA-4 e fibronectina de forma específica, evitando alguns dos efeitos imunossupressores associados aos fármacos existentes no mercado.

Palavras-chave: VLA-4; Fibronectina; Docking; In silico

Área Temática: Inovações e Tecnologias na Biologia Celular

Modalidade: Trabalho completo

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação excessiva de células anormais. Esta proliferação pode levar à morte de células saudáveis próximas e afetar tecidos distantes, caso estas células anormais alcancem a corrente sanguínea. É esperado que o câncer se torne a principal causa de mortes mundialmente ainda no século XXI, o que implica na extrema importância de desenvolver estudos sobre os processos oncogênicos e a criação de meios de contê-los (BRAY et al., 2018).

Um dos fatores que torna o câncer tão perigoso é a série de mecanismos que as células

tumorais usam para potencializar o seu crescimento e para resistir a ataques do sistema imunológico. Esses mecanismos têm sido um grande alvo de estudos, por conta da possibilidade de se criar fármacos capazes de inibir o funcionamento desses mecanismos. Um dos mecanismos mais estudados é a angiogênese, processo no qual células tumorais estimulam a criação de novos vasos sanguíneos capazes de nutrir o tumor. Por conta da vascularização do tumor causada por esse mecanismo, acaba sendo facilitada a metástase, onde células do tumor entram na corrente sanguínea e levam ao surgimento de novos tumores em tecidos distantes do tumor primário (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Estudos recentes sugerem que os processos de angiogênese e metástase sofrem influência de interações entre integrinas do tipo VLA-4 (receptores transmembranares presentes em diversas células, como os leucócitos) e a fibronectina (componente da matriz extracelular). Um fármaco capaz de modular essa interação poderia, portanto, ajudar a combater o crescimento do tumor e diminuir a probabilidade de uma metástase (DE LA FUENTE et al., 1999; KAPLAN et al., 2005; SCHLESINGER; BENDAS, 2015).

No entanto, o único fármaco atualmente disponível capaz de bloquear essa interação é o Natalizumab, um anticorpo monoclonal que possui um forte efeito imunossupressor, podendo causar Leucoencefalopatia Progressiva Multifocal, doença neurodegenerativa potencialmente fatal (HAANSTRA et al., 2013; POLMAN et al., 2006). Esse efeito está relacionado ao fato de que o Natalizumab age se ligando ao epítipo B da subunidade $\alpha 4$ da VLA-4 (que é composta pelas subunidades $\alpha 4$ e $\beta 1$), região importante não só para a interação desse receptor com a fibronectina, mas também com vários outros ligantes, como VCAM-1 (YU; SCHÜRPF; SPRINGER, 2013). A presença de um anticorpo nessa região dificulta essas interações e, portanto as diversas funções celulares que dependem delas, sendo destacadas a adesão e transmigração endotelial de leucócitos, processos fundamentais para o sistema imune (ESCUADERO, 1998; MITTELBRUNN et al., 2004; MUÑOZ et al., 1996).

Estudos da década de 1990 mostraram que a VLA-4 (e outras integrinas $\alpha 4$) possui um outro epítipo na subunidade $\alpha 4$, denominado epítipo A, cujo bloqueio também provoca a inibição da interação entre VLA-4 e fibronectina, mas sem afetar a interação entre VLA-4 e VCAM-1. Porém, ao contrário da interação entre VCAM-1 e o epítipo B, não se sabe como exatamente ocorre a interação entre fibronectina e o epítipo A de VLA-4, sendo desconhecidos os resíduos de aminoácidos, ou mesmo a subunidade da fibronectina responsável pela interação nessa região do receptor. A falta de informações a respeito das características dessa interação

dificulta a criação e otimização de novos anticorpos (MUÑOZ et al., 1996; PULIDO et al., 1991).

Estudos experimentais mostraram que o bloqueio deste epítipo impede que este interaja com o fragmento FN-40 da fibronectina, composto pelas subunidades FNIII-12, 13, 14, e CS-1. Sabe-se que o fragmento CS-1 é responsável pela interação da fibronectina com o epítipo B, por conta da presença da sequência LDV (sequência de aminoácidos composta de leucina, aspartato e valina). As outras três subunidades presentes nesse fragmento compõem uma região da fibronectina denominada Hep-II, que possui duas sequências capazes de interagir com VLA-4: PRARI e IDAPS (consistindo em prolina-arginina-alanina-arginina-isoleucina e isoleucina-aspartato-alanina-prolina-serina, respectivamente), ambas presentes na subunidade FNIII-14 (CLEMENTS et al., 1994; MISSIRLIS et al., 2017; SHARMA, 1999). É possível, portanto, que a subunidade FNIII-14 da fibronectina interaja diretamente com o epítipo A de VLA-4.

Nos últimos anos, a popularização do uso de ferramentas de bioinformática tem permitido estudos aprofundados a respeito de interações proteína-proteína e o desenvolvimento de novos fármacos de forma mais rápida e com menor custo. As diversas metodologias *in silico* (baseadas em ferramentas computacionais) usadas nesse campo científico permitem obter uma série de dados a respeito de interações proteína-proteína antes mesmo da reprodução das mesmas em laboratório, permitindo que haja um direcionamento melhorado destes experimentos, o que leva à redução dos custos relacionados a insumos laboratoriais (TARI, 2012). A técnica de *docking*, por exemplo, permite, entre outras coisas, prever computacionalmente o modo de interação entre proteínas, algo que antes seria possível apenas com a aplicação de técnicas experimentais de alto custo, como a cristalografia por raios-x (ZHANG et al., 2016).

Este trabalho busca analisar um novo modo de interação entre a fibronectina e o epítipo A de VLA-4, utilizando para isso métodos *in silico*, como o *docking*, sendo testada aqui a hipótese de que a subunidade FNIII-14 é a responsável por essa interação.

2 MÉTODO

Neste trabalho, foi feito o *docking* das estruturas tridimensionais da subunidade FNIII-14 da fibronectina com 4 modelos representando diferentes estados conformacionais da

“cabeça” da VLA-4 (parte do receptor responsável pela interação com ligantes). Os modelos da “cabeça” da VLA-4 foram produzidos por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz, sendo um dos modelos (denominado “model”) representativo de uma estrutura produzida inicialmente através de técnicas de modelagem comparativa e posterior minimização energética. Os outros 3 modelos (states 1, 2 e 3) representam estados conformacionais deste modelo inicial que foram observados ao longo de uma dinâmica molecular. Em todos os esses modelos, o epítipo A é localizado nos resíduos de 1 a 100 (VASCONCELOS, 2017). O modelo de FNIII-14 foi obtido a partir de uma estrutura cristalográfica presente no banco de dados PDB (código 3R8Q). Neste modelo, as sequências IDAPS e PRARI localizam-se nos resíduos de 183 a 187, e de 203 a 213, respectivamente.

O *docking* foi realizado com o uso do servidor de *docking* cego ClusPro. O ClusPro é um programa de *docking* cego, onde não há uma conformação específica sendo favorecida por meio de dados fornecidos pelo usuário (em contraste a programas de *docking* dirigido). Este programa baseado em servidor online gera uma série de estruturas diferentes para o complexo proteico, que são classificadas por duas pontuações principais: número de membros do cluster e o *lowest energy* do cluster. O número de membros de um cluster representa o número de estruturas individuais em um grupo de estruturas (ou cluster) com conformações semelhantes entre si. O *lowest energy*, ou LE, é o valor da energia do complexo de menor energia presente nesse cluster (BRENKE et al., 2012; KOZAKOV et al., 2018; VAJDA et al., 2017; ZANTO et al., 2011). Um estudo demonstrou que o ClusPro é capaz de prever corretamente poses de *docking* envolvendo integrinas com alto grau de confiança quando o cluster de menor LE tem um LE pelo menos 5% mais baixo que o do cluster com segundo menor LE. Os pesquisadores chamaram isso de “A regra dos 5% do ClusPro” (CHAVES et al., 2020). Por isso, nesse trabalho foram considerados confiáveis apenas os resultados onde o cluster com menor LE atende à “regra dos 5% do ClusPro”.

Os resultados foram analisados com ajuda do servidor COCOMAPS, capaz de detectar os contatos entre os resíduos das duas moléculas que compõem o complexo proteico. Ele foi usado para determinar quais resíduos de FNIII-14 estão interagindo com VLA-4 e em que região de VLA-4 esta interação está ocorrendo, e dar informações adicionais a respeito dos tipos de interações envolvidos e sobre quais regiões do ligante (FNIII-14) estão interagindo com quais regiões do receptor (VLA-4) (VANGONE et al., 2011). Também foi usado na análise dos resultados e na produção de imagens da estrutura do complexo o programa de visualização PyMOL. Esse programa permitiu calcular as áreas de interface entre o epítipo A de VLA-4 e

as regiões de FNIII-14 que contêm as sequências PRARI e IDAPS através do uso da função `get_area`. Valores de área de interação próximos de zero indicariam a ausência de uma interação entre essas regiões (SCHRÖDINGER, LLC, 2015). Foram consideradas apenas as interações de FNIII-14 com a subunidade $\alpha 4$, pois a subunidade $\beta 1$ não é relevante para a potencial interação, dado que os efeitos do bloqueio do epítopo A também foram verificados em integrinas com e sem essa subunidade (SÁNCHEZ-MADRID et al., 1986).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Docking

O *docking* de FNIII-14 com os quatro modelos de VLA-4 no ClusPro produziu os resultados mostrados na Tabela 1. Os valores mostrados na tabela representam a pontuação das estruturas de menor e segunda menor energia presentes nos respectivos clusters, que por sua vez são identificados pelos números entre parênteses.

Tabela 1. Resultados dos *dockings* de FNIII-14 com VLA-4 no ClusPro.

Modelo de VLA-4	1º Lowest Energy (cluster)	2º Lowest Energy (cluster)	Diferença $\geq 5\%$?
Model	-788,8 (4)	-783,7 (15)	Não
State 1	-850,2 (6)	-812,0 (1)	Não
State 2	-840,2 (0)	-787,7 (1)	Sim
State 3	-741,8 (4)	-693,4 (0)	Sim

Fonte: Autores, 2021.

Quando o fragmento FNIII-14 foi submetido a *docking* com os modelos de VLA-4 “Model” e “State 1”, a diferença entre o menor LE e o segundo menor LE observados entre os clusters de estruturas produzidos foi menor que 5%. Por isso, estes resultados não foram considerados confiáveis e não foram analisados de forma mais aprofundada.

Quando o fragmento FNIII-14 foi submetido a *docking* com os modelos de VLA-4 “State 2” e “State 3”, a diferença entre o menor LE e o segundo menor LE observados entre os clusters de estruturas produzidos foi maior que 5%, sendo estes resultados considerados confiáveis. Por atenderem a regra dos 5% do ClusPro, as estruturas dos dois complexos de

FNIII-14/VLA-4 representativos dos clusters com menor LE destes resultados foram analisadas as seguir.

3.2 Análise da pose com modelo State 2

3.2.1 Área de Interface

Foi calculada a área de interface entre as sequências PRARI e IDAPS de FNIII-14, e VLA-4, sendo encontrada uma área de 557,3 Å². A figura 1 mostra a interface de interação entre as regiões PRARI e IDAPS (ambas em laranja) de FNIII-14 (em azul) e o epítipo A (em vermelho) de VLA-4 (em verde).

Figura 1. Detalhe da interação entre FNIII-14 e VLA-4 no complexo com VLA-4 State 2.



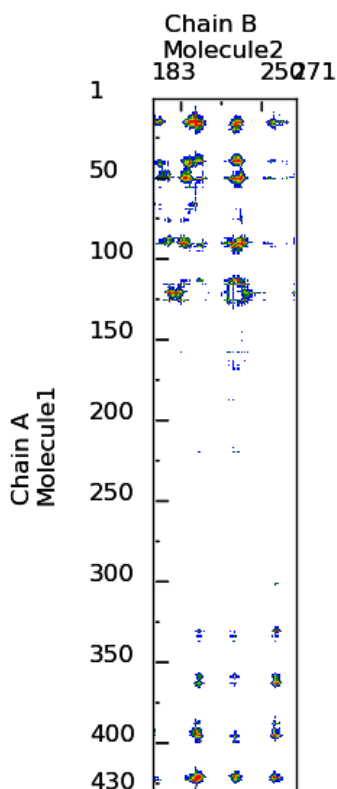
Fonte: Autores, 2021.

3.2.2 Análise de contatos

A análise de contatos desse complexo pelo servidor COCOMAPS produziu as figuras 2 e 3, onde FNIII-14 é denominada “Molecule 2” e a subunidade $\alpha 4$ de VLA-4 é denominada “Molecule 1”. As cores dos pontos representam as distâncias entre os resíduos, com as cores azul, verde, amarelo e vermelho representando distâncias iguais ou menores que 16, 13, 10 e 7

angstroms, respectivamente. Essa análise mostrou que a grande parte das interações entre a FNIII-14 e a VLA-4 envolvia resíduos das sequências IDAPS e PRARI e os resíduos do epítipo A (figura 2). Também foi observado que as interações quase sempre envolviam resíduos hidrofílicos, havendo um número relativamente pequeno de interações hidrofóbica-hidrofóbicas (figura 3).

Figura 2. Mapa de contatos e distâncias entre FNIII-14 e VLA-4 no complexo com VLA-4 State 2.



Fonte: Autores, 2021.

Figura 3. Resumo das interações entre FNIII-14 e VLA-4 no complexo com VLA-4 State 2.

Title	Value
Number of interacting residues Molecule1	50
Number of interacting residues Molecule2	44
Number of hydrophilic-hydrophobic interaction	105
Number of hydrophilic-hydrophilic interaction	90
Number of hydrophobic-hydrophobic interaction	22

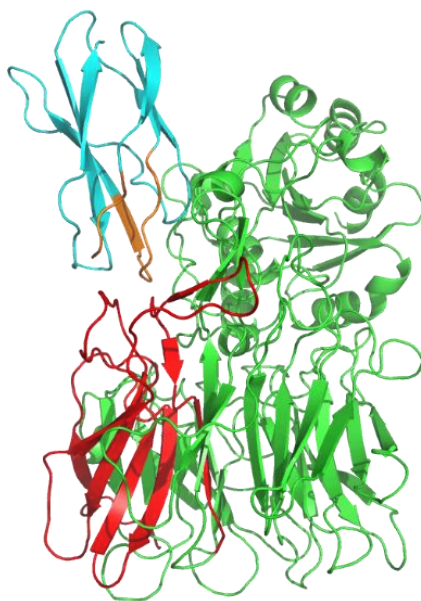
Fonte: Autores, 2021.

3.3 Análise da pose com modelo State 3

3.3.1 Área de Interface

A área de interface calculada para este complexo foi de 521,8 Å². A figura 4 mostra a interface de interação entre as regiões PRARI e IDAPS (ambas em laranja) de FNIII-14 (em azul) e o epítipo A (em vermelho) de VLA-4 (em verde).

Figura 4. Detalhe da interação entre FNIII-14 e VLA-4 no complexo com VLA-4 State 3.

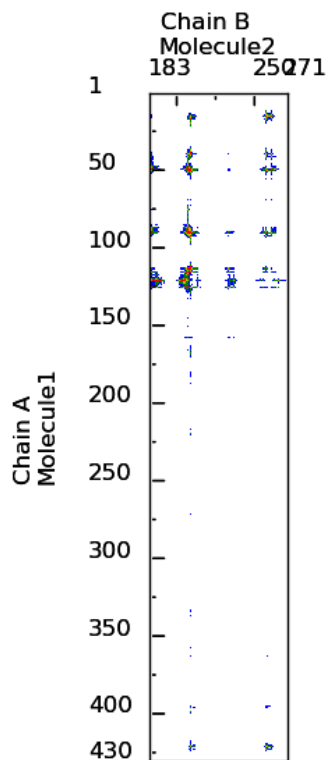


Fonte: Autores, 2021.

3.3.2 Análise de contatos

Novamente, a análise com o servidor COCOMAPS mostrou que grande parte das interações entre a FNIII-14 e a VLA-4 envolvia resíduos das sequências IDAPS e PRARI e os resíduos do epítipo A (figura 5). Assim como no complexo com a VLA-4 State 2, foi observado que as interações quase sempre envolviam resíduos hidrofílicos, havendo um número similarmente pequeno de interações hidrofóbica-hidrofóbicas (figura 6).

Figura 5. Mapa de contatos e distâncias entre FNIII-14 e VLA-4 no complexo com VLA-4 State 3.



Fonte: Autores, 2021.

Figura 6. Resumo das interações entre FNIII-14 e VLA-4 no complexo com VLA-4 State 3.

Title	Value
Number of interacting residues Molecule1	25
Number of interacting residues Molecule2	21
Number of hydrophilic-hydrophobic interaction	37
Number of hydrophilic-hydrophilic interaction	44
Number of hydrophobic-hydrophobic interaction	6

Fonte: Autores, 2021.

3.3 Discussão

As análises mostraram que os complexos produzidos pelo docking de FNIII-14 tanto com a VLA-4 State 2 como com a State 3 possuíam características de interação semelhantes. Nos dois casos, resíduos das sequências IDAPS e, especialmente, PRARI de FNIII-14 interagiam predominantemente com resíduos do epítipo A de VLA-4. O predomínio de

interações envolvendo resíduos hidrofílicos é consistente com a hipótese de que estas sequências são importantes para a interação entre a fibronectina e a VLA-4, dado que a maioria dos aminoácidos que fazem parte destas sequências são capazes de formar pontes salinas ou ligações de hidrogênio.

Em ambos os casos, resíduos da região da sequência PRARI tenderam a produzir contatos mais proeminentes que os da sequência IDAPS, indicando que esta sequência pode ser a mais importante entre as duas (Figuras 2 e 5). Isso corrobora os resultados obtidos por um estudo que observou que os resíduos 89 e 90 do epítipo A são de grande importância para a interação FN-40/VLA-4, dado que estes resíduos específicos são carregados eletronicamente e, portanto, capazes de formar pontes salinas com as argininas (R) da sequência PRARI (MUÑOZ et al., 1996). Estes resultados também estão de acordo com um estudo experimental que atribuiu à sequência PRARI uma maior importância sobre efeitos causados pelo fragmento Hep-II em células *in vitro* do que a sequência IDAPS (GONZALEZ et al., 2009).

4 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com a hipótese de que a subunidade FNIII-14 da fibronectina é a responsável pela interação desta com o epítipo A da integrina VLA-4, com ambos os complexos viáveis produzidos por docking apresentando esta interação. O destaque da sequência PRARI da fibronectina como um elemento importante para essa interação pode facilitar o desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibi-la de forma específica, uma abordagem inédita no tratamento do câncer. No entanto, esses resultados são limitados, sendo necessários testes mais aprofundados para testar melhor essa hipótese, como, por exemplo, a realização de simulações de dinâmica molecular e de testes laboratoriais *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BRENKE, R. et al. Application of asymmetric statistical potentials to antibody-protein docking. **Bioinformatics**, v. 28, n. 20, p. 2608–2614, 2012.
- CHAVES, B. et al. Guidelines to Predict Binding Poses of Antibody-Integrin Complexes. **ACS Omega**, v. 5, n. 27, p. 16379–16385, 2020.

doity.com.br/conais2021

CLEMENTS, J. M. et al. Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 8, p. 2127–2135, 1994.

DE LA FUENTE, M. T. et al. Fibronectin interaction with $\alpha 4\beta 1$ integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: Correlation with Bcl-2 and Bax. **Leukemia**, v. 13, n. 2, p. 266–274, 1999.

ESCUADERO, E. Differential Effects 1 and of Antibodies Epitopes to Vascular of the Integrin Adhesion in HgCl₂- Distinct Induced Nephritis in Brown. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 10, p. 1881–1891, 1998.

GONZALEZ, J. M. et al. Identification of the active site in the heparin II domain of fibronectin that increases outflow facility in cultured monkey anterior segments. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, n. 1, p. 235–241, 2009.

HAANSTRA, K. G. et al. Antagonizing the $\alpha 4\beta 1$ Integrin, but Not $\alpha 4\beta 7$, Inhibits Leukocytic Infiltration of the Central Nervous System in Rhesus Monkey Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 5, p. 1961–1973, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

KAPLAN, R. N. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 820–827, 2005.

KOZAKOV, D. et al. HHS Public Access. v. 12, n. 2, p. 255–278, 2018.

MISSIRLIS, D. et al. Fibronectin promotes directional persistence in fibroblast migration through interactions with both its cell-binding and heparin-binding domains. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

MITTELBRUNN, M. et al. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11058–11063, 2004.

MUÑOZ, M. et al. A region of the integrin VLA $\alpha 4$ subunit involved in homotypic cell aggregation and in fibronectin but not vascular cell adhesion molecule-1 binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 5, p. 2696–2702, 1996.

POLMAN, C. H. et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, 2006.

PULIDO, R. et al. Functional evidence for three distinct and independently inhabitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4: Correlation with distinct $\alpha 4$ epitopes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 16, p. 10241–10245, 1991.

SÁNCHEZ-MADRID, F. et al. VLA-3: A novel polypeptide association within the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization. **European Journal of Immunology**, v. 16, n. 11, p. 1343–1349, 1986.

SCHLESINGER, M.; BENDAS, G. Contribution of very late antigen-4 (VLA-4) integrin to cancer progression and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 34, n. 4, p. 575–591, 2015.

SCHRÖDINGER, LLC. **The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.8.** [s.l.:

SHARMA, A. Crystal structure of a heparin-and integrin-binding segment of human fibronectin. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 6, p. 1468–1479, 1999.

TARI, L. W. **Structure-Based Drug Discovery**. IX ed. New York: Humana Press, 2012.

VAJDA, S. et al. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 3, p. 435–444, 2017.

VANGONE, A. et al. COCOMAPS: A web application to analyze and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes. **Bioinformatics**, v. 27, n. 20, p. 2915–2916, 2011.

VASCONCELOS, D. C. A. Desenvolvimento de Novos Potenciais Antagonistas de Integrinas da Família $\beta 1$ através de Docking Molecular e Desenho de novo. **Instituto Oswaldo Cruz**, 2017.

YU, Y.; SCHÜRPF, T.; SPRINGER, T. A. How Natalizumab Binds and Antagonizes $\alpha 4$ Integrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 45, p. 32314–32325, nov. 2013.

ZANTO, T. P. et al. NIH Public Access. v. 46, n. 4, p. 564–574, 2011.

ZHANG, Q. et al. Recent Advances in Protein-Protein Docking. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 1, p. 1586–1594, 2016.