

Expressão e purificação do domínio 2 dos receptores 1 e 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial: estudos de interação com o peptídeo anti-VEGF (DGA)PCAIWF por RMN

BIANCA RIZO VENTURA GUSMÃO

Rio de Janeiro

2019



Bianca Rizo Ventura Gusmão

Expressão e purificação do domínio 2 dos receptores 1 e 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial: estudos de interação com o peptídeo anti-VEGF (DGA)PCAIWF por RMN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Cristiane Dinis Ano Bom (IQ – UFRJ) Coorientador: Fabio Ceneviva Lacerda de Almeida (IBqM – UFRJ)

Rio de Janeiro

Gusmão, Bianca Rizo Ventura

Expressão e purificação do domínio 2 dos receptores 1 e 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial: estudos de interação com o peptídeo anti-VEGF (DGA)PCAIWF por RMN

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2019.

Orientador: Cristiane Dinis Ano Bom

Coorientador: Fabio Ceneviva Lacerda de Almeida

 Estrutura de proteínas. 2. Fatores de crescimento vascular e endotelial. 3. Peptídeos.
Câncer 4. Ressonância Magnética Nuclear. 5. *Phage Display*. 6. Angiogênese. I. Ano Bom, Cristiane Dinis (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Bianca Rizo Ventura Gusmão

Expressão e purificação do domínio 2 dos receptores 1 e 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial: estudos de interação com o peptídeo anti-VEGF (DGA)PCAIWF por RMN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovada em

Prof^a adjunta Cristiane Dinis Ano Bom (DBq/IQ/UFRJ

Prof associado Fabio Ceneviva Lacerda Almeida (IBqM/UFRJ)

Prof^a associada Luzineide Wanderley Tinoco (IPPN/UFRJ)

Prof^a associada Andrea Cheble de Oliveira (IBqM/ UFRJ)

Prof^a associada Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso (DBq/IQ/UFRJ)

Dedico esta dissertação à amiga Márcia de Oliveira Dias, *in memoriam*, pelos momentos que passamos juntas e por seus ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agrade aos meus pais por todo apoio e dedicação constante. Obrigada "papinho" e "maminha" por estarem sempre ao meu lado, mesmo quando não sou a pessoa mais agradável do mundo. Amo vocês infinito!

Os segundos da lista são meus avós, meu exemplo diário de luta e perseverança, conquitarm tanto ao longo dos anos, que olhando para trás parece história de filme. Obrigada pelo colo e pelos Yakults! Mesmo de longe, tenho vocês sempre comigo.

Um agradecimento especial para as duas Cidas da minha vida, obrigada por sempre se preocuparem comigo.

Aos amigos do LABEP, nem sei o que teria sido essa jornada se vocês não estivessem por perto. Tantos perrengues e humilhações, mas continuamos firmes e fortes! Cadê meus guerreiros?!

'Migos Bia, Léo, Gui, Carol e Luis, a velha-guarda LABEP, não tenho nem como dizer o quanto adoro vocês, gratidão por ter encontrado amigos tão queridos ao longo da graduação e que permanecem comigo.

Aos migos mais recentes, Bruna, Luisinho, João, Danielzinho Carol Matos, Maysa, Nathália e Ariana, obrigada por me amarem assim desse jeitinho ariano.

Um super obrigada ao Rafa, por mesmo de longe ter me ajudado! E ao Leozinho rei das figuras pela enorme ajuda também!

À Cris, minha orientadora e tanto mais que isso, obrigada pelas oportunidades e pelo inentivo! Tenho você num lugar muito especial do meu coração.

Ás professoras Dani e Lúcia, agradeço pelo tempo que passamos juntas, as conversas sempre são muito divertidas!

Agradeço também aos professores Fábio e Ana Paula pelo tempo que passei no final do mestrado no CNRMN, obrigada por terem me recebido tão bem. Não posso deixar de agradecer a todos os alunos do CNRMN, obrigada pelo tempo que passamos juntos.

Gostaria também de agradecer ao meu amigo Gabriel pelo apoio e por todas as conversas que eu só falava e ele só ouvia.

Aos meus padrinhos do coração, Jalile e Renato, por sempre darem um jeito de estarem presentes mesmo de longe, pelos conselhos e por todo o carinho que sinto vindo de Alfenas para o Rio.

Não posso deixar de falar das minhas quase irmães, mas na verdade são primas mesmo, Luiza e Sofia, as flores do meu jardim! Só amor por vocês!

i

E as migas do Cruzeiro que sempre estão prontas para um pastel do Adão, Lara (que só come Waffle de Amsterdã agora), Nath, Claudia e Ciça. Obrigada por ouvirem minhas histórias de experimentos que deram errado e me consolarem com pizza!

Obrigada amiga Vê e amiga Mafê pelos encontros sem planejamento com vinhos e boas histórias. Que seja sempre assim!

E por fim, obrigada Amora e Chopp por me fazerem sorrir mesmo quando os dias não estão lá indo essas coisas. Só vocês para trocarem meu mau humor por alegria!

RESUMO

A interação entre os fatores de crescimento vascular e endotelial (VEGF) e seus receptores (VEGFR) ocorrem de forma específica gerando propriedades biológicas distintas, dentre elas a angiogênese fisiológica e patológica. Os VEGFRs são formados por sete domínios extracelulares do tipo Imunoglobulina, uma região transmembrana e intracelular contendo o domínio tirosina quinase. Os domínios 1, 2 e 3 são importantes para a interação com os VEGFs, especialmente o domínio 2 (D2), sendo este o alvo no desenvolvimento de fármacos. As terapias anti-angiogênicas disponíveis focam na neutralização da interação entre o VEGF e seus receptores ou nas vias ativadas por eles, entretanto, o desafio tem sido evitar a resistência observada aos fármacos já disponíveis. Neste contexto, estudos têm focado no desenho de pequenas moléculas inibitórias para regiões específicas dos receptores. Estudos identificaram o peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF como específico para a interação com o VEGFR3-D2, entretanto, ensaios biológicos mostraram que este tem a capacidade de evitar a neovascularização e retinopatias na presença dos três tipos de VEGFRs, sugerindo que os receptores possuem um sítio de ligação comum. Desta forma, estudos estruturais visando a interação dos VEGFRs e este peptídeo podem ser essenciais para o entendimento da via de sinalização dos VEGFs, bem como, para o desenvolvimento de novas drogas. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a estrutura do domínios 2 dos VEGFR1 (VEGFR1-D2) e VEGFR3 (VEGFR3-D2) e a interação dos mesmos com o peptídeo (DGA)PCAIWF por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). As construções contendo os genes que codificam os VEGFR1-D2 e VEGFR3-D2 foram cedidas pelo Prof. Ricardo Giordano, colaborador deste trabalho, assim como o peptídeo anti-VEGF (DGA)PCAIWF. Para o VEGFR3-D2 foram realizados testes de expressão em diferentes condições. A expressão ótima deste receptor em meio LB e M9 foi alcançada em cepas de E. coli BL21(DE3) a 37°C com indução em D.O_{600nm} 0,7 com 0,2 mM de IPTG por 4 h. A lise celular mostrou a produção de VEGFR3-D2 na fração solúvel e insolúvel. Inicialmente realizamos a purificação da proteína presente na fração solúvel através de cromatografia de afinidade à níquel. Entretanto, estudos realizados através de espectros de 1D-1H RMN mostraram que a proteína não estava enovelada. Assim, o VEGFR3-D2 presente na fração insolúvel foi purificado e diversos protocolos de *refolding* foram testados para a obtenção da proteína de interesse. Entretanto, os espectros 1D-1H RMN das amostras obtidas mostraram que não foi possível obter o VEGFR3-D2 enovelado, impossibilitando os estudos de interação com o peptídeo para este receptor. O VEGFR1-D2 foi expresso na fração insolúvel, re-enovelado e purificado segundo protocolos descritos anteriormente com pequenas alterações. A melhor condição de expressão foi obtida em cepas de E. coli BL21(DE3) a 37°C e indução em D.O_{600nm} 0.7 com 1 mM de IPTG por 4 h. Após duas cromatografias de afinidade à níquel, diversos protocolos de *refolding* e uma cromatografia de exclusão molecular foi possível obter o VEGFR1-D2 enovelado para os estudos estruturais. Os espectros ¹H-¹⁵N-HSQC da proteína foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance 800 MHz em pHs 5,7 e 7,3. e o assinalamento foi realizado através da comparação de dados gerados anteriormente para este receptor (Starovasnik et al., 1999). Para o assinalamento do peptídeo (DGA)PCAIWF foram realizados experimentos de TOCSY e NOESY em um espectrômetro Bruker Advance 800 MHz nos pHs 5,7 e em espectrômetro Bruker Advance em pH 7,3. Os estudos de interação por RMN do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo foram realizados através da análise da perturbação do deslocamento químico (CSP) utilizando os espectros de ¹H-¹⁵N HSQC. Estes resultados indicaram que a interação ocorreu apenas em pH 7,3 e os resíduos que mostraram o maior CSP foram E150, I202, G203, G213, H214, L215 e I229. Os estudos de interação VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo na presença do gadolínio (Gd) mostraram que houve alteração da intensidade do sinal para os resíduos Val 136, Glu 137, Met 138, Glu 144, Cys 158, Ser 162, Ile 165, Thr 166, Leu 174, Asp 175, Lys 182, Ile 194, Arg 196, Lys 200, Cys 207, His 214, Leu 215, Ile 229. Estes dados sugerem que estes resíduos podem estar ligados direta ou indiretamente ao VEGFR1-D2. A análise dos dados de interação obtidos nos dois ensaios mostram que os resíduos, H214, L215 e I229 são monitorados sugerindo que estes três resíduos estejam envolvidos diretamente na interação entre o domínio 2 do VEGFR1 e o peptídeo (DGA)PCAIWF. É interessante notar que a região monitorada no domínio 2 deste receptor não está envolvida na ligação direta ao VEGF podendo ser este o domínio comum de ligação dos diferentes VEGFRs. Este resultado pode levar a novos estudos para o desenvolvimento de novos peptidomiméticos anti-VEGFs.

ABSTRACT

The binding affinity between vascular endotelial growth factors (VEGF) and its receptors (VEGFR) is quite specific, leading to distinguish biological properties, as physiological and pathological angiogenesis. VEGFRs consists of seven extracellular immunoglulin-like domains, a transmembrane region and a intracllular region, wich contain tyrosine-kinase domain. Domains 1, 2 and 3 are key factors for VEGF binding, particularly domain 2 (D2), main target in drug development. Available anti-angiogenic therapies are foccused on neutralizing interaction between VEGF and its receptors or paths activated by them, however, overcome drug resistance already observed in currently available drugs is the major concern in this field. In this sense, researches foccused on design of small inihibitory molecules that could target specific receptor sites. A previous work has identified a anti-angiogenic peptide (DGA)PCAIWF as specific for interaction with VEGFR-3, however, biological experiments revelead that this sintetic peptide coul inhibit neovascularization and retinopathy, targeting all three VEGFRs, suggesting that the receptors share a common binding site. Thus, structural studies directed to VEGFR and this peptide could provide essecial information to understand VEGFs signaling pathway, as for new dugs development. Therefore the goal of this work is study the structure of VEGFR1 (VEGFR1-D2) and VEGFR3 (VEGFR3-D2) domains 2 and its binding interactions with (DGA)PCAIWF peptide by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Constructs containing the genes encoding VEGFR1-D2 and VEGFR3-D2 were sent by Prof. Ricardo Giordano, collaborator of this work, as well as the anti-VEGF peptide (DGA) PCAIWF. VEGFR3-D2 expression tests were performed under different conditions. Optimum expression of this receptor in LB and M9 medium was achieved in E. coli BL21 (DE3) strains at 37 °C with induction at DO_{0.600nm} 0.7 using 0.2 mM IPTG and 4 h of cell growth. Cell lysis showed soluble and insoluble production of VEGFR3-D2. First we performed soluble fraction purification through nickel affinity chromatography. Still, studies carried out using 1D-1 H NMR spectra revealed that the protein was not enveloped. Thus, VEGFR3-D2 insoluble fraction was purified and several refolding protocols were tested for protein sample production. However, obtained samples 1D-¹H NMR spectra showed refolded VEGFR3-D2 could not be obtained, so interaction studies with the peptide was not possible for this receptor. VEGFR1-D2 was expressed in insoluble fraction, refolded and purified according previously described protocols with a few changes. The best

expression condition was obtained E. coli BL21 (DE3) strains at 37 ° C and induction at DO0.600nm 0.7 with 1 mM IPTG and 4 h cell growth. After two nickel affinity chromatographies, various refolding protocols, and molecular exclusion chromatography, the refolded VEGFR1-D2 could be obtained for structural studies. Protein ¹H-¹⁵N-HSQC spectra were acquired on a Bruker Avance 800 MHz spectrometer at pH 5.7 and 7.3 and asignment was achived trought comparison with previously data obtained for this receptor. TOCSY and NOESY experiments were performed on a Bruker Advance 800 MHz spectrometer at pHs 5.7 and Bruker Advance 600 MHz at pH 7.3 for (DGA)PCAIWF peptide. NMR interaction studies of VEGFR1-D2 and VEGFR1-D2 binding to peptide were performed by chemical shift perturbation (CSP) analysis using the 1H-15N HSQC spectra. These results indicate that interaction occurred only at pH 7.3 and residues with highest CSP were, E150, I202, G203, G213, H214, L215 and I229. Other interaction studies carried in the presence of gadolinium (Gd) of free and bound to peptide VEGFR1-D2 showed changes in signal intensity for residues Val 136, Glu 137, Met 138, Glu 144, Cys 158, Ser 162, Ile 165, Thr 166, Leu 174, Asp 175, Lys 182, Ile 194, Arg 196, Lys 200, Cys 207, His 214, Leu 215, Ile 229. These data suggests that these residues migh be involved, directly or indirectly, to VEGFR1-D2 binding. Analysis of the interaction data obtained in the two assays shows that residues H214, L215 and I229 are monitored suggesting that these three residues are directly involved in the interaction between domain 2 of VEGFR1 and the peptide (DGA)PCAIWF. Interaction da analisys, obtained in the two assays, shows H214, L215 and I229 as the residues directly involved in binding interaction between VEGFR1 and the peptide (DGA)PCAIWF domain. Interestingly the region monitored in domain 2 of this receptor is not directly involved in VEGF binding and this might be the common binding domain of distinct VEGFRs. This result might lead to further studies for new anti-VEGF peptidomimetics development.

Índice de Figuras

| Figura 1: Esquema mostrando a constituição estrutural da família dos receptores |
|--|
| tirosina-quinase: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 |
| Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ativação geral dos VEGFRs 10 |
| Figura 3: Ilustração esquemática dos padrões de expressão, especificidade do ligante e |
| efeitos celulares e fisiológicos de cada um dos VEGFRs |
| Figura 4: Estrutura cristalográfica do VEGFA mostrando seu monômero (A) e o |
| homodímero (B) 15 |
| Figura 5: Ilustração da estrutura dimérica dos receptores de VEGF 17 |
| Figura 6: Estrutura cristalográfica do VEGFR1 complexado com VEGF-A18 |
| Figura 7: Estrutura cristalográfica dos domínios 2 e 3 de VEGFR2 complexado com |
| VEGF-C |
| Figura 8: Estrutura cristalográfica dos domínios 2 e 3 de VEGFR2 complexado com |
| VEGF-C |
| Figura 9: Mecanismo de ação das terapias anti-angiogênicas |
| Figura 10: Técnica de <i>Phage-Display</i> |
| Figura 11: Ação do peptídeo PCAIWF in vitro e in vivo |
| Figura 12: Fluxograma da metodologia adotada para o estudo dos domínios 2 dos |
| VEGFR1 e sua interação com o peptídeo (DGA)PCAIWF 30 |
| Figura 13: Fluxograma da metodologia adotada para o estudo dos domínios 2 dos |
| VEGFR3 |
| Figura 14: Mapa do vetor pET-21a |
| Figura 15: Sequências primárias das construções dos domínios 2 dos receptores (A) |
| VEGFR1 e (B) VEGFR3 |
| Figura 16: Curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular |
| Figura 17: SDS-PAGE 15% do teste de expressão do VEGFR3-D2 em meio LB em |
| diferentes condições |
| Figura 18: SDS-PAGE 15% do teste de expressão do VEGFR3-D2 em meio LB em |
| diferentes condições após lise celular |
| Figura 19: SDS-PAGE 15% do teste de expressão do VEGFR3-D2 em meio mínimo em |
| diferentes condições |

| Figura 20: SDS-PAGE 15% do teste de expressão do VEGFR3-D2 em meio LB em |
|---|
| diferentes condições após lise celular 49 |
| Figura 21: SDS-PSGE 15% de lise celular e tratamento da fração solúvel de VEGFR3- |
| D2 |
| Figura 22: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da purificação da fração solúvel de |
| VEGFR3-D2 através de cromatografia de afinidade à níquel |
| Figura 23: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da purificação da fração solúvel do |
| VEGFR3-D2 através de cromatografia de exclusão molecular |
| Figura 24: Espectro unidimensional da amostra solúvel de VEGFR3-D2 53 |
| Figura 25: SDS-PAGE 15% da lise celular e tratamento da fração insolúvel do |
| VEGFR3-D2 |
| Figura 26: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da primeira etapa de purificação da fração |
| insolúvel do VEGFR3-D2 através de cromatografia de afinidade a níquel 55 |
| Figura 27: Cromatografia e SDS-PAGE 15% da segunda etapa de purificação do |
| VEGFR3-D2 após os diferentes protocolos de <i>refolding</i> |
| Figura 28: Espectros unidimensionais de Hidrogênio dos protocolos de Refolding do |
| VEGFR3-D2 |
| Figura 29: SDS-PAGE 15% da expressão de VEGFR1-D2 em meio mínimo marcado |
| com ¹⁵ N |
| Figura 30: SDS-PAGE 15% da lise celular do VEGFR1-D2 na presença de ureia 61 |
| Figura 31: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da primeira etapa de purificação do |
| VEGFR1-D2 por cromatografia de afinidade à níquel62 |
| Figura 32: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da segunda etapa de purificação do |
| VEGFR1-D2 após o refolding por cromatografia de afinidade à níquel |
| Figura 33: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da terceira etapa de purificação do |
| VEGFR1-D2 após o refolding por cromatografia de exclusão molecular 64 |
| Figura 34: Espectro unidimensional de VEGFR1-D2 |
| Figura 35: Espectro ¹ H- ¹⁵ N HSQC do VEGFR1-D2 obtido em pH 5,7 a 25°C em |
| espectrômetro Bruker Avance 800 MHz67 |
| Figura 36: Espectro ¹ H- ¹⁵ N HSQC do VEGFR1-D2 obtido em pH 7,3 a 25°C em |
| espectrômetro Bruker Avance 800 MHz |
| Figura 37: Espectro unidimensional do peptídeo DGAPCAIWF |
| Figura 38: Espectro ¹ H- ¹ H TOCSY do peptídeo (DGA)PCAIWF em pH 5,7 (rosa) e 7,3 |
| (azul) a 25°C realizado em espectrômetro Bruker Avance 800 MHz |

Figura 39: TOCSY do peptídeo DGAPCAIWF em pH 5,7 (rosa) e 7,3 (azul)......71 Figura 39: Região expandida do espectro ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 durante a titulação em concentrações crescentes do peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF.40

Figura 41: Espectro ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo anti-Figura 42: Mapeamento da região de interação entre o VEGFR1-D2 e o peptídeo antiangiogênico (DGA)PCAIWF em pH 5,7 na presença de gadolínio......78 Figura 43: Mapeamento da região de interação entre o VEGFR1-D2 e o peptídeo anti-Figura 44: Estrutura cristalográfica do VEGFR1-D2 ligado ao homodímero de VEGF-A mostrando os resíduos monitorados pelo gadolínio quando na presença do peptídeo Figura 45: Estrutura cristalográfica do VEGFR1-D2 ligado ao homodímero de VEGF-A mostrando os resíduos monitorados via CSP quando na presença do peptídeo Figura 46: Esquema mostrando os resíduos monitorados pelos estudos de interação entre o VEGFR1-D2 e o peptídeo (DGA)PCAIWF através dos estudos de CSP e Figura 48: Orientações assumidas pelos spins nucleares sob ação de um campo magnético externo B₀: estado de menor energia (α) e estado de maior energia (β). 92 Figura 51: Espectro unidimensional (1D) 1H de ressonância magnética nuclear da Figura 52: Transferência da magnetização entre os átomos no experimento ¹H-¹⁵N Figura 53: Transferência da magnetização entre os átomos no experimento ¹H-¹H

Índice de Tabelas

| Tabela 1: Principais reagentes utilizados no trabalho | 28 |
|--|-------|
| Tabela 2: Proteínas utilizadas como padrão para o cálculo da curva de calibraçã | io da |
| cromatografia de Gel filtração e a relação massa molecular vs. volume de eluição | 40 |

Lista de abreviaturas

- APS Persulfato de amônio
- BSA Albumina de soro bovino
- CSP Variação de deslocamento químico
- **D1-7** Domínio de 1 a 7
- **DO** Densidade Óptica
- EDTA Ácido etilenodiaminotetraacético
- $\boldsymbol{Gd}-\boldsymbol{Gadolinio}$
- HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence
- HUVEC Human umbilical vein endothelial cells
- Ig-like Imunoglobulina-like
- IPTG Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
- LB Meio de cultivo Luria-Bertani
- NOE Nuclear Overhauser Effect
- **NOESY** Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
- PCR Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
- PIGF Fator Placentário de crescimento vascular e endotelial
- RMN Ressonância Magnética Nuclear
- RTK Recepttores tirosina-quinase
- SDS Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida
- sFlt1 Receptor solúvel 1 dos fatores de crescimento vascular e endotelial
- **TEMED** N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina

TOCSY – *Total Correlation Spectroscopy*

- VEGF Fatores de crescimento vascular e endotelial
- **VEGF-A** Fator de crescimento vascular e endotelial A
- VEGF-B Fator de crescimento vascular e endotelial B
- VEGF-C Fator de crescimento vascular e endotelial C
- VEGF-D Fator de crescimento vascular e endotelial D
- VEGF-E Fator de crescimento vascular e endotelial E
- **VEGF-F** Fator de crescimento vascular e endotelial F
- VEGFR-1 Receptor 1 dos fatores de crescimento vascular e endotelial
- VEGFR-2 Receptor 2 dos fatores de crescimento vascular e endotelial
- VEGFR-3 Receptor 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial
- VEGFR1-D2 Domínio 2 do Receptor 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial
- VEGFR3-D2 Domínio 2 do Receptor 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial

<u>Sumário</u>

| 1- | – INTRODUÇÃO | 1 |
|-------|---|-----|
| | 1.1 Vasculogênese e Angiogên | ese |
| | | 1 |
| | 1.2 – Patologia da angiogênese | 2 |
| | 1.3 – Família dos fatores de Crescimento Vascular e Endotelial | 3 |
| | 1.4- Receptores dos Fatores de Crescimento Vascular e Endotelial | 8 |
| | 1.5 – Estrutura tridimensional dos VEGFs e seus receptores | 13 |
| | 1.5.1 – Estrutura tridimensional dos VEGFs | 14 |
| | 1.5.2 – Estrutura tridimensional dos VEGFRs | 16 |
| | 1.6 – Terapias Anti-angiogênese | 21 |
| | 1.7 – Peptídeos inibidores de VEGF | 23 |
| 2 | - OBJETIVO | 27 |
| | 2.1- Objetivo geral | 27 |
| | 2.2 – Objetivos específicos | 27 |
| 3 - | - MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| | 3.1 – Materiais | 28 |
| | 3.1.1 – Cepas | 28 |
| | 3.1.2 –Peptídeo (DGA)PCAIWF | 28 |
| | 3.1.3 – Reagentes | 28 |
| | 3.2 – Métodos | 30 |
| | 3.2.1 - Fluxograma da metodologia utilizada para o estudo dos recepto | res |
| de VI | EGF | 30 |
| | 3.2.2 – Construção dos VEGFR1-D2 e VEGFR3-D2 | 31 |
| | 3.2.3 – Transformação dos genes VEGFR1-D2 e VEGFR3-D2 | 32 |

| 3.2.4 – Expressão do VEGFR3-D2 33 |
|--|
| 3.2.5 – Lise celular do VEGFR3-D2 |
| 3.2.6 – Purificação do VEGFR3-D2 |
| 3.2.7 – Expressão de VEGFR1-D2 em meio mínimo (M9) 37 |
| 3.2.8 – Lise celular de VEGFR1-D2 |
| 3.2.9 – Purificação de VEGFR1-D2 |
| 3.2.10 - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 40 |
| 3.2.11 – Preparo de amostras padronizadas para SDS-PAGE 41 |
| 3.2.12 – Dosagem de proteínas |
| 3.2.13 – Ressonância magnética Nuclear |
| 4 – RESULTADOS |
| 4.1 - VEGFR3-D2 |
| 4.1.1 – Expressão do domínio 2 do VEGFR3 em meio LB e M9 44 |
| 4.1.2 – Lise celular: fração solúvel do VEGFR3-D2 50 |
| 4.1.3 – Purificação do VEGFR3-D2 a partir da fração solúvel 51 |
| 4.1.4 – Avaliação do VEGFR3-D2 após a purificação por RMN unidimensional |
| 4.1.5 – Lise celular da fração insolúvel de VEGFR3-D2 54 |
| 4.1.6 – Purificação do VEGFR3-D2 a partira da fração insolúvel 55 |
| 4.1.7 – Avaliação dos protocolos de refolding do VEGFR3-D2 por RMN unidimensional |
| 4.2 – VEGFR1-D2 |
| 4.2.1 - Expressão do VEGFR1-D2 em meio mínimo marcado com $^{15}\mathrm{N}\dots$ 60 |
| 4.2.2 – Lise celular do VEGFR1-D261 |
| 4.2.3 – Purificação e refolding do VEGFR1-D2 marcado com 15N 61 |

| 4.2.4 – Avaliação do refolding do VEGFR1-D2 por RMN 65 |
|--|
| 4.6 – Estudos de interação: ¹ H- ¹⁵ N HSQC de VEGFR1-D2 livre 66 |
| 4.3 – Assinalamento do peptídeo anti-VEGF: (DGA)PCAIWF 69 |
| 4.4 – Interação de VEGFR1-D2 com DGAPCAIWF 71 |
| 4.5 – Monitoramento da interação do VEGFR1-D2 com o peptídeo anti- |
| angiogênico (DGA)PCAIWF com a utilização de Gadolínio 77 |
| 5 – DISCUSSÃO |
| 6 – CONCLUSÃO |
| 7 – ANEXO |
| 7.1 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 90 |
| 7.2 – Experimentos de RMN 94 |
| 8.2.1 – Experimentos bidimensionais homonucleares e heteronucleares 95 |
| $8.2.1.1 - {}^{1}H - {}^{15}N - HSQC$ |
| 8.1.2.2 - ¹ H- ⁵ H-TOCSY |
| 8.1.2.3 - ¹ H- ⁵ H-NOESY |
| 8.2 – Atribuição dos espectros de RMN |
| 8 – REFERÊNCIAS 100 |

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Vasculogênese e Angiogênese

A formação de novos vasos sanguíneos pode ocorrer devido à ação de diversos mecanismos (Fruttiger, 2002). Entretanto, é sabido que o desenvolvimento dos vasos sanguíneos ocorre através de dois processos consecutivos, vasculogênese e angiogênese (Demir *et al.*, 2007). Durante a fase embrionária, a vasculogênese dá origem ao coração do feto, ainda muito primitivo, e ao primeiro plexo vascular, dentro do próprio embrião e em regiões externas circundantes com formação de membranas. Durante a formação do primeiro plexo vascular é possível observar sinais de remodelagem da rede vascular, ou seja, o número e/ou a localização dos seguimentos vasculares são rearranjados de forma a facilitar a adaptação, sem qualquer expansão demasiada da rede vascular. Além disso, em outras regiões, vasos sanguíneos originalmente extensos são extintos, podendo ser substituídos por novos vasos, de menor largura e extensão e em maior quantidade, o que gera uma rede vascular cada vez mais densa e com maior capacidade de irrigação de tecidos. Dessa forma, o plexo primário é transformado em um segundo plexo, com uma estrutura muito mais complexa que o anterior (Patan, 2000).

O processo de desenvolvimento das redes vasculares em sistemas cada vez mais densos e complexos é fomentado via angiogênese, no qual os vasos dos grandes troncos vasculares ramificam-se e distribuem-se. Em suma, a angiogênese caracteriza o aparecimento de vasos neoformados que surgem a partir de vasos pré-existentes, um processo mantido durante toda a vida do indivíduo, respondendo, sempre que necessário, a alterações na demanda de oxigenação tecidual. Nesse contexto, tão importante quanto à propagação da vascularização quando há déficit de oxigênio e nutrientes em determinado tecido, é o regresso à estabilidade após a correção da demanda adicional, com diminuição de vasos neoformados e controle da angiogênese na região. Assim, situações prejudiciais ao desenvolvimento celular resultantes de excesso de oxigênio disponível nos tecidos, como estresse oxidativo e formação de radicais livres de oxigênio, podem ser evitadas (Oliveira *et al.*, 2010). Ao passo que o desenvolvimento, remodelação e regeneração de tecidos adultos só ocorrem devido a estímulos angiogênicos capazes de gerar, a partir de células endoteliais, vasos sanguíneos com as mais diversas morfologias e funções dentro do organismo.

Assim, a angiogênese, concomitante ao desenvolvimento e a regeneração tecidual, depende de processos rigidamente controlados de proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência das células endoteliais. Consequentemente, a disfunção do sistema de regulação das células endoteliais é uma característica marcante de muitas doenças, como nos casos de crescimento de tumores e metástases, que se mostram altamente dependentes de processos anti-angiogênicos desregulados (Mustonen *et al.*, 1995).

1.2 – Patologia da angiogênese

A angiogênese é um processo fisiológico fundamental e necessário para o desenvolvimento, reprodução e reparo de tecidos e ocorre em resposta a situações de isquemia local. A angiogênese patológica, também conhecida como neovascularização, está associada a condições de doença, incluindo retinopatias, artrite, psoríase e câncer (Li *et al.*, 2000; Folkman, 1995).

O desenvolvimento tumoral é iniciado a partir de um pequeno grupo de células anormais, onde há um balanço entre proliferação de células tumorais e apoptose. Como nos estágios iniciais, o tumor não possui uma fonte sanguínea própria, seu desenvolvimento fica restrito a áreas com circulação de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento vascular e endolteliais (VEGFs). Dessa forma, os tumores se desenvolvem apenas em tecidos vascularizados e tem a capacidade de infiltrar esses tecidos, formando mosaicos, nos quais há células tumorais e células endoteliais vasculares completamente normais. À medida que o tumor amplia de tamanho, a cooperação vascular atende apenas regiões periféricas da massa tumoral, gerando hipóxia em porções centrais do tumor. A situação de hipóxia induz a expressão de genes proangiogênicos, comos os VEGFs. Essa fase inicial de crescimento limitado pode durar meses ou até anos (Holmgren *et al.*, 1995; Holash *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000).

Quando as células tumorais são capazes de secretar fatores de crescimento angiogênicos, a produção de VEGFs é substancial e constante, tornando o desenvolvimento da doença mais rápido. Neste contexto, a partir do momento que a angiogênese é iniciada, há a expansão exponencial do tumor que invade tecidos em regiões específicas. Assim, as células tumorais produzem fatores de crescimento angiogênicos, o que aumenta a vascularização local, gerando maior circulação de oxigênio e nutrientes, condições essenciais para o crescimento das células cancerígenas. Além disso, canais neovasculares permitem a metástase das células tumorais (Li *et al.*, 1997; Raj *et al.*, 1996; Liotta *et al.*, 2000).

A colônia de tumores gerada a partir de células metastáticas se expande até o volume máximo que pode ser sustentado pela vascularização do hospedeiro, até que o tumor possa ser auto-suficiente em termos de angiogênese. O estabelecimento do fenótipo angiogênico do tumor depende da produção em excesso dos fatores de crescimento angiogênicos pelo mesmo, de forma a superar os inibidores angiogênicos do próprio organismo. Existem cerca de 20 inibidores angiogênicos endógenos identificados, como angiostatina e endostatina. Embora os mecanismos de ação de muitos inibidores endógenos permaneçam mal definidos, a inibição da migração, proliferação de células endoteliais e indução de apoptose das mesmas, são os mais descritos. Acredita-se que o efeito supressor desses inibidores endógenos no crescimento de tumores incipientes é sobreposta por concentrações altas e constantes de agentes pró-angiogênicos que promovem a neovascularização de tumores (Li, 2000).

1.3 – Família dos fatores de Crescimento Vascular e Endotelial

Desde a sua descoberta, em 1983, os fatores de crescimento vascular e endotelial (VEGFs) surgiram como os mais importantes reguladores da formação de vasos sanguíneos, tanto em condições normais de saúde, quanto em patologias. Sendo assim, os VEGFs são caracterizados não só como elementos cruciais durante a vasculogênese embrionária e angiogênese, como também principais autores da neovascularização de tumores malignos, em casos de câncer e outras doenças (Holmes e Zachary, 2005).

Os VEGFs são mitógenos altamente específicos voltados para as células endoteliais vasculares. Atualmente, há sete isoformas de VEGF descritas geradas através de *splicing* alternativo a partir de um único gene de VEGF. Essas isoformas diferem em sua massa molecular e em suas propriedades biológicas. A expressão dos VEGFs é observada nos mais diversos tecidos, sendo essencial para formação, funcionalidade e manutenção da vascularização. É possível observar a expressão potencializada desses fatores em resposta a situações de hipóxia. Entretanto, a sua expressão desregulada contribui para o desenvolvimento de tumores e o surgimento de outras doenças relacionadas à angiogênese anormal. Consequentemente, a inibição da sinalização de VEGF pode diminuir e/ou impedir o desenvolvimento de uma ampla variedade de tumores (Hoeben *et al.*, 2004).

A família dos fatores de crescimento vascular e endotelial é composta pelos membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e PIGF (Fator de crescimento placentário), os quais compartilham um domínio específico em comum, denominado motivo *cystine knot* que contem 8 resíduos de cisteína capazes de formar pontes de sulfeto intra- e intermoleculares (Neufeld *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 1999).

O VEGF-A foi o primeiro membro da família dos VEGFs a ser descoberto, concentrando assim, o maior número de informações. Inicialmente, foi destacado por sua potente habilidade de promover melhorias na permeabilidade vascular (Senger *et al.*, 1983; Dvorak, 2006). Posteriormente, estudos realizados com camundongos mostraram que a falta de um único gene de VEGF-A é letal para o desenvolvimento embrionário (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996).

A baixa expressão constitutiva de VEGF-A pode ser observada em diversos tecidos de organismos adultos. Níveis mais altos de expressão de VEGF-A ocorrem em vários tipos de epitélio adulto, particularmente em células da região visceral dos glomérulos renais, córtex adrenal, mama, pulmão e em macrófagos e miócitos cardíacos (Brown et al., 1995; Berse et al., 1992; Maharaj et al., 2006). Além disso, a superexpressão desse fator de crescimento pode ser identificada na angiogênese fisiológica, associada ao desenvolvimento de folículos ovarianos e corpo lúteo e na formação de osso endocondral (Beck et al, 1997; Philipps et al, 1990; Yancopoulos, 2000). Cabe ressaltar que o VEGF-A é considerado o principal indutor da angiogênese patológica, sendo superexpresso na grande maioria dos carcinomas humanos e animais (Brown et al, 1997). Nesse contexto, células malignas são capazes de expressar VEGF-A após a formação de tumores sólidos. Entretanto, a expressão aumentada de VEGF-A, e consequente indução da angiogênese, é comum em algumas lesões pré-malignas, como lesões precursoras de carcinomas da mama e do colo do útero (Guidi et al, 1995; Guidi et al, 1997). Em casos como esses, a expressão de VEGF-A aumenta diretamente de acordo com a progressão das células malignas. O papel de VEGF-A na angiogênese voltada para tumores benignos ainda não é bem definido, principalmente pela falta de estudos voltados para essa área (Brown et al, 1996). De forma geral, o VEGF-A é super expresso na cicatrização de feridas, inflamação crônica e potencialmente em todos os outros tipos de angiogênese patológica (Nagy et al, 2002; Nagy et al, 2006; Dvorak et al, 2007).

Uma vez expresso, o gene do VEGF-A pode sofrer *splicing* alternativo em células humanas, gerando em torno de 165 isoformas, que diferem no tamanho da

cadeia polipeptídica e na forma de ligação a células e matrizes endoteliais (Nagy *et al*, 2007).

O PIGF foi descoberto logo após a identificação do VEGF-A. Devido ao splicing alternativo do transcrito primário do PIGF, há pelo menos quatro isoformas de PIGF humano (PIGF 1-4), que diferem em termos de suas propriedades de secreção, interação e no tamanho da cadeia polipeptídica (Maglione et al., 1993, Cao et al., 1997; Yang et al., 2003). A expressão do PIGF pode ser observada logo no início do desenvolvimento embrionário. Exatamente por isso, esse fator de crescimento foi originalmente identificado na placenta, sendo responsável, durante essa fase, pelo controle do crescimento e diferenciação celular de trofoblastos (conjunto de células capazes de formar uma camada externa em torno do embrião, que mais tarde dará origem à placenta) (Khalig et al., 1996). Após o desenvolvimento embrionário a expressão de PIGF ocorre em diferentes órgãos incluindo, coração, pulmão, tireóide, músculo esquelético e tecidos adiposos, com exceção do pâncreas e dos rins (Persico et al., 1999; Voros et al, 2005 2005). A função deste fator ainda é motivo de debate, mas sabe-se que o mesmo promove respostas referentes ao metabolismo, sobrevivência, migração e proliferação celular. Nesse contexto, estudos realizados em camundongos nocaute do gene do PIGF não mostraram efeitos vasculares aparentes, indicando que o PIGF não é essencial para a angiogênese fisiológica. Por outro lado, o PIGF desempenhou papel crucial na indução da angiogênese associada a eventos patológicos em adultos, como isquemia, crescimento tumoral, inflamação e estímulo à cicatrização de feridas (Ribatti, 2008).

O VEGF-B foi o terceiro membro da família dos VEGFs a ser descrito, sendo um dos menos caracterizados. O VEGF-B é expresso em vários tecidos com destaque para o coração e músculo esquelético, e como outros VEGFs, também existe em duas isoformas (Fischer *et al.*, 2008). As duas isoformas de VEGF-B, VEGF-B₁₆₇ e VEGF-B₁₈₆, ocorrem através de *splicing* alternativo e ambas são capazes de gerar dímeros interligados por pontes de sulfeto (Li *et al.*, 2000). Estudos capazes de determinar especificamente a função biológica do VEGF-B ainda não foram possíveis devido à dificuldade na obtenção da proteína recombinante, já que após a expressão, o VEGF-B se mantém ligado a matriz extracelular, sendo necessária a implementação de protocolos de extração (Olofsson *et al.*, 1999). Por isso, a função exata desse VEGF ainda não foi elucidada, entretanto é evidente que ambas as isoformas têm papel significativo na regulação do crescimento de vasos sanguíneos e cardiomiócitos no coração, metabolismo do tecido e sobrevivência celular. Além disso, estudos recentes realizados em torno do sistema nervoso central mostraram que o VEGF-B atua na proteção contra degeneração neuronal. De forma geral, parece que este fator de crescimento possui importância na proteção de determinados tecidos, como em casos de insuficiência cardíaca e degeneração neuronal (Bry *et al.*, 2014).

O VEGF-C é expresso em diversos tecidos adultos, sendo os níveis mais altos de produção observados no coração, placenta, ovário, intestino delgado e glândula tireóide. Entretanto, durante o desenvolvimento embrionário, a expressão ocorre em regiões, onde há o surgimento e crescimento de vasos linfáticos a partir de veias embrionárias (Joukov et al., 1996, Joukov et al., 1997; Witzenbichler et al., 1998). A estrutura primária do VEGF-C possui uma região central conservada e característica dos membros da família dos VEGFs, apresentando 30% de identidade em relação ao VEGF-A (Joukov et al, 1996; Lee at al, 1996). Entretanto, o VEGF-C possui extensões na cadeia polipeptídica nas regiões N- e C-terminal, que não são observadas nos VEGF-A, VEGF-B e PIGF. Inicialmente, o VEGF-C é secretado como um homodímero unido por uma ponte dissulfeto. Durante sua biossíntese, ocorre o processamento proteolítico da sequência de aminoácidos, secretando uma proteína madura que consiste essencialmente no domínio de homologia dos VEGFs, ou seja, a molécula formada contém o motivo cystine knot, que é encontrado nos membros da família dos VEGFs e em outros fatores de crescimento (Joukov et al., 1997). O VEGF-C estimula a mitose e a migração de células endoteliais, além de aumentar a permeabilidade vascular. Além disso, estudos mostram que VEGF-C parece atuar, durante a embriogênese, na formação dos sistemas vasculares venoso e linfático, assim como na manutenção do sistema linfático em adultos (Jeltsch et al., 1997). Estranhamente, a expressão heteróloga de VEGF-C em tecidos epiteliais gera hiperplasia dos vasos linfáticos sem efeitos acentuados nos vasos sanguíneos. Em compensação, estudos realizados in vivo, apontam o VEGF-C como um agente pro-angiogênico (Ferrara et al., 1999).

O VEGF-D é expresso em muitos tecidos adultos incluindo pulmão, coração, músculo esquelético, cólon e intestino delgado, possui similaridades significativas em relação ao VEGF-C (Li *et al.*, 2001). Assim como VEGF-C, o VEGF-D é sintetizado na forma de um precursor proteico, sendo necessário processamento proteolítico nas regiões N e C-terminal, a fim de gerar uma molécula biologicamente funcional (Stacker *et al.*, 1999). Em relação à função biológica, foi demonstrado, através de estudos de interação, que o VEGF-D exibe especificidades de ligação, necessárias para

desempenho da função biológica, semelhantes àquelas observadas para VEGF-C. Entretanto, estudos realizados *in vivo*, com camundongos, mostraram que nesses animais, o VEGF-D é capaz de se ligar apenas a VEGFR-3, sugerindo que o VEGF-D tenha uma função diferenciada em camundongos e humanos (Baldwin *et al.*, 2001). Esse tipo de comportamento é incomum dentro da família dos VEGFs. Por serem fatores altamente homólogos e conservados evolutivamente, era esperado que assumissem características similares de ligação aos receptores independente da espécie. Além disso, o VEGF-D é capaz de atuar no estímulo à proliferação de células endoteliais, e mostra propriedades angiogênicas *in vitro* e *in vivo* (Marconcini *et al.*, 1999). De forma geral, a literatura sugere que o VEGF-D atua nos processos de angiogênese e linfangiogênese, estando envolvido na regulação do crescimento e diferenciação do endotélio linfático e dos vasos sanguíneos, como o VEGF-C (Achen *et al.*, 1998).

O VEGF-E é um homólogo de VEGF codificado pelo vírus orf e outros parapoxvírus. Esses fatores de crescimento específicos possuem aproximadamente 30% de identidade com a cadeia polipeptídica e um alto grau de identidade estrutural em relação ao VEGF-A. Além disso, o VEGF-E é um potente mitógeno que estimula a proliferação de células endoteliais humanas *in vitro* (Cébe-Suarez *et al*, 2008).

O VEGF-F foi isolado e caracterizado a partir de veneno de cobra mostrando baixa atividade angiogênica e alta capacidade de induzir permeabilidade vascular. A expressão do VEGF-F ocorre no tecido do veneno e o fator é secretado no fluido venenoso, sendo o primeiro caso de uma proteína da família de VEGFs que é secretada pelos tecidos para fora do organismo. Este dado, sugere que a função biológica deste fator de crescimento não está ligada ao aumento da permeabilidade vascular endógena, e sim, a indução da permeabilidade vascular nas regiões locais de ataque nos animais alvo. Como o VEGF-F isoladamente não apresenta características tóxicas, considera-se que a permeabilidade vascular gerada pelo fator de crescimento em questão auxilia na circulação e eficácia das toxinas inoculadas nos animais alvo (Takahashi, 2004).

Em suma, os fatores de crescimento vascular endotelial estão entre os agentes reguladores mais importantes na formação de vasos sanguíneos e linfáticos durante o desenvolvimento embrionário, na cicatrização de feridas e na manutenção da homeostase dos sistemas vascular e linfático em organismos adultos (Kurz *et al.*, 2003; Ferrara *et al.*, 2004). Os VEGFs são predominantemente produzidos por células endoteliais, hematopoiéticas e do tecido conjuntivo em resposta a situações de hipóxia,

necessidade de vascularização e diferenciação (Cébe-Suarez *et al.*, 2006). Após a descoberta inicial da existência dos VEGFs, foram identificados alguns receptores específicos desses fatores, inicialmente através de estudos de ligação e *cross-linking* e, depois pela identificação dos genes que codificam os receptores tirosina-quinase (Neufeld *et al.*, 1999). Sendo assim, as funções biológicas dos polipetídeos dos VEGFs são mediadas através da ligação a três receptores tirosina-quinase (RTKs), conhecidos como VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (Shibuya *et al.*, 1990; Terman *et al.*, 1991; Koch *et a.l*, 2012).

1.4- Receptores dos Fatores de Crescimento Vascular e Endotelial

Os receptores dos fatores de crescimento vascular e endotelial (VEGFRs), associados a seus ligantes específicos (VEGFs) possuem papel essencial na regulação da angiogênese e linfangiogênese.

Os VEGFRs são pertencentes à família dos receptores tirosina-quinase (RTK) e possuem três proteínas representantes: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. A estrutura dos três receptores é bem conservada e característica, composta por uma região extracelular responsável pela ligação com os VEGFs, que inclui 7 domínios do tipo imunoglobulina-like (Ig-*like*); uma região transmembrana e um domínio tirosina-quinase, localizado na porção intracelular (Figura 1).



Figura 1: Esquema mostrando a constituição estrutural da família dos receptores tirosinaquinase: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3.

Os três receptores, VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 são constituídos por sete domínios do tipo imunoglobulina na região extracelular (representados pelos círculos em cinza); a região transmembrana; e um domínio tirosina-quinase (representado pelos quadrados cinza) (Adaptado de Shibuya *et al.*, 2009).

De forma semelhante a outros RTKs, a ativação dos receptores dos VEGFs se inicia através da interação entre a molécula dimérica do VEGF e o domínio extracelular do receptor. Essa interação promove a dimerização do receptor, seguida da fosforilação dos resíduos de tirosina presentes na porção intracelular dos VEGFRs (Figura 2). Como consequência, uma variedade de moléculas de sinalização é recrutada, dando origem a grandes complexos moleculares que ativam vias celulares distintas. Essas vias regulam respostas, como permeabilidade vascular, sobrevivência, migração e proliferação de células endoteliais (Simons *et al.*, 2016).



Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ativação geral dos VEGFRs

Um dímero do VEGF ligado covalentemente (verde) liga-se aos domínios 1-3 dos VEGFRs (azul) conduzindo a homodimerização de dois monômeros receptores. Esta interação VEGF-VEGFR acontece de forma específica para cada tipo de receptor. Interações adicionais entre os domínios *Ig-like* 4 a 7 de cada um dos monômeros ocorrem de forma cruzada, os domínios transmembranares e os domínios intramembranares estabilizam o complexo VEGF-VEGFR resultando na ativação da quinase e a autofosforilação dos resíduos de tirosina (azul claro e escuro) (Adaptado de Stuttfeld e Ballmer-Hoefer, 2009).

O VEGFR-1 é expresso em miócitos e macrófagos e existe em duas formas principais, na forma solúvel (sFlt1) e a ligada à membrana VEGFR-1. A forma solúvel de VEGFR-1, também conhecida como Flt-1 solúvel (sFlt-1), é gerada por *splicing* alternativo e não possui os domínios transmembrana e citoplasmático caracteríticos dos receptores de VEGF, estando presente na circulação de forma geral. Entretanto, a expressão de sFlt-1 ocorre em células endoteliais, monócitos e placenta (Kendall et, al, 1996).

Assim como VEGFR-1, sFlt-1 possui alta afinidade de ligação ao VEGF-A, e é capaz de interagir com outros dois membros da família dos VEGFs: PLGF e VEGF-B. O sFlt-1 funciona como um antagonista de VEGF e PlGF, regulando negativamente a ação desses fatores de crescimento. Este efeito é observado porque inicialmente, os fatores VEGF-A, VEGF-B e PlGF se ligam ao sFlt-1 sendo impedidos de interagirem diretamente com seus receptores específicos, e consequentemente, não há a indução de qualquer mecanismos de sinalização (Di Marco *et al.*, 2009; Shibuya, 2013). Como o VEGF é um promotor bem conhecido da angiogênese e um regulador endógeno da integridade endotelial, compostos como sFlt-1, são caracterizados como anti-VEGF, pois são capazes de gerar disfunção endotelial, diminuem a angiogênese, prejudicam o

reparo dos vasos sanguíneos e linfáticos, além de aumentarem a concentração de proteínas na urina (Maynard *et al*, 2003). Cabe ressaltar, que a superexpressão de sFlt-1 na placenta tem sido descrita como um fator de risco para pré-eclâmpsia, que é a principal complicação renal que pode surgir durante a gravidez (Levine *et al.*, 2004).

A forma completa do VEGFR-1 possui baixa atividade do domínio quinase, não sendo necessário para a funcionalidade das células endoteliais. Dessa forma, o VEGFR-1 desempenha um papel importante na regulação negativa do VEGFR-2, através do sequestro do ligante específico em comum, o VEGF-A. Além disso, a interação de VEGFR-1 com seus ligantes específicos (VEGF-A, VEGF-B e PIGF) gera funções biológicas bastante distintas, como transporte de ácidos graxos e regulação de angiogênese patológica (Koch *et al.*, 2012). É importante destacar que a região de ligação aos VEGFs está localizada na porção extracelular do receptor. Nesse contexto, estudos que realizaram a deleção dos domínios transmembrana e intracelular de VEGFR1 (Barleon *et al.*, 1997) sugeriram que o reconhecimento local do ligante VEGF está localizado nos primeiros três domínios Ig-*like*. Estes estudos demonstraram também que a glicosilação não é um pré-requisito para a ligação de alta afinidade do VEGF a VEGFR-1 (Fung *et al.*, 1998; Wiesmann *et al.*, 1997).

Trabalhos desenvolvidos utilizando camundongos nocaute para o gene do VEGFR-1 mostraram que os animais morriam durante o desenvolvimento embrionário devido ao crescimento excessivo e desorganização da distribuição de vasos sanguíneos. Estes dados sugerem que o VEGFR-1 funcione como um controle negativo da angiogênese durante a fase embrionária, sendo necessário para a manutenção do equilíbrio apropriado entre os reguladores positivos e negativos (Fong et al., 1995; Hiratsuka et al., 2005). Sendo assim, os ligantes específicos do VEGFR-1, os VEGF-B e PIGF, têm funções muito distintas. No caso do VEGF-B, o encontramos em células endoteliais do coração, sendo capaz de controlar a revascularização do miocárdio isquêmico. Em condições excepcionais, o VEGF-B tem como função a captação de ácidos graxos nas células endoteliais, uma situação muito crítica para órgãos com alto estresse metabólico, como por exemplo, o coração (Li et al, 2008 e Hagberg et al., 2010). Estudos mostram que o PIGF não compensa a função biológica desempenhada pelo VEGF-B tanto in vitro quanto in vivo (Hagberg et al., 2010). Nesse contexto, animais deficientes em VEGF-B sobrevivem ao desenvolvimento, mas apresentam redução do tamanho do coração e comprometimento da recuperação após isquemia cardíaca (Bellomo et al., 2000; Aase et al., 2001). Assim como os outros ligantes de

VEGFR-1, o PIGF também é dispensável para a angiogênese fisiológica embrionária e adulta (Carmeliet *et al.*, 2001), mas promove angiogênese patológica em várias doenças (Fischer *et al.*, 2008).

A complexidade das funções biológicas desempenhadas pelo VEGFR-1 e seus ligantes é embasada pelo fato desse receptor ser expresso por uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo células tumorais humanas (Schwartz *et al.*, 2010).

O VEGFR-2 é o principal receptor de VEGF-A, além de possuir mais três ligantes específicos: os VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E. A interação dos receptores com os ligantes específicos ocorre através da interação com os domínios Ig-*like* 2 e 3 (McColl *et al.*, 2003). Nesse contexto, experimentos de deleção realizados com o VEGFR-2, mantendo apenas a porção solúvel do receptor, mostraram que apenas os domínios 2 e 3 são críticos para a interação com o ligante (Fuh, *et al.*, 1998).

A interação de VEGFR-2 com seus ligantes é essencial para a formação e manutenção das células endoteliais funcionais durante o desenvolvimento embrionário e em organismos adultos, tanto em condições fisiológicas e patológicas (Koch *et al.*, 2012). Assim como VEGFR-1, VEGFR-2 também possui uma forma solúvel (sVEGFR2), que está presente em vários tecidos, tais como a pele, coração, baço, rim, ovário e no plasma sanguíneo. Essa forma solúvel é capaz de se ligar ao VEGF-C, o que impede a interação deste com o VEGFR-3, inibindo consequentemente a proliferação de células endoteliais linfáticas (Albuquerque *et al.*, 2009).

O VEGFR-2 é expresso em células endoteliais vasculares e seus precursores embrionários, apresentando maiores níveis de expressão durante a vasculogênese e angiogênese embrionária (Millauer *et al.*, 1993; Oelrichs *et al.*, 1993; Quinn *et al.*, 1993) e durante processos patológicos associados à neovascularização como angiogênese tumoral (Plate *et al.*, 1999; Millauer *et al.*, 1994). Acredita-se que o VEGFR-2 seja o principal facilitador dos efeitos do VEGF-A na diferenciação, proliferação, migração e formação de vasos sanguíneos. Sendo assim, o VEGFR-2 funciona como um agente mediador dos estímulos de permeabilidade e crescimento celulares induzidos pelos VEGFs. Nesse contexto, a maioria das funções do VEGFR-2 está relacionada à angiogênese (Guo *et al.*, 2010).

O VEGFR-3 é expresso em células endoteliais linfáticas e venosas, seus ligantes específicos são os VEGF-C e VEGF-D, e a ativação desse receptor gera respostas na regulação da linfangiogênese (Joukov *et al.*, 1997; Stacker *et al.*, 1999). Estudos mostraram que o VEGFR-3 possui papel importante não só no que diz respeito à

linfangiogênese, mas como na formação de vasos sanguíneos em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Kaipainen *et al.*, 1995).

Conforme descrito acima, as sete classes de VEGF são capazes de se ligar, de forma independente e sobreposta, a três receptores tirosina-quinase, também conhecidos como VEGFRs. Apesar de possuirem estruturas bastante semelhantes, a interação de cada um dos VEGFRs com seus ligantes específicos gera funções biológicas diferentes para cada um dos complexos formados. VEGFR-1 é crítico para o desenvolvimento de células hematopoiéticas, enquanto VEGFR-2 possui papel fundamental no desenvolvimento de células endoteliais e vasculares e o VEGFR-3 é o principal responsável no desenvolvimento de células endoteliais linfáticas. A figura 3 ilustra cada uma das possíveis interações do VEGF e seus receptores e as funções biológicas desempenhadas após a interação.





Os VEGFs são capazes de interagir de forma específica e independente com seus receptores RTK. Os padrões de expressão de cada um dos receptores estão indicados na figura, assim como a especifidade de ligação dos VEGFs a cada receptor, e a função biológica a ser desempenhada pelo complexo VEGF-VEGFR (Adaptado de Holmes *et al.*, 2007).

1.5 – Estrutura tridimensional dos VEGFs e seus receptores

1.5.1 – Estrutura tridimensional dos VEGFs

O papel fisiológico e patológico dos VEGFs ocorre após a interação destes com seus receptores específicos e com a subsequente ativação dos mesmos (Shibuya, 2013).

A estrutura tridimensional de VEGF-A foi determinada através da técnica de cristalografia de raios X, inicialmente com resolução de 2.5 Å (Muller *et al.*, 1997a) e posteriormente refinada para a resolução de 1.9 Å (Muller *et al.*, 1997b). A estrutura em cristal de VEGF-A mostra um homodímero, organizado em um arranjo antiparalelo, e as subunidades monoméricas estão ligadas covalentemente por duas pontes de sulfeto intermoleculares. Cada monômero é composto por uma folha β central, que inclui quatro fitas β antiparalelas, uma α -hélice localizada na porção N-terminal da cadeia polipeptídica, e três regiões de *loop* que interligam as porções menos flexíveis da molécula, como folhas β e α -hélices, além, do domíno *cystine-knot*, caracterítico dos VEGFs (Figura 4). Apesar das folhas β estarem expostas ao solvente, a interface monômero-monômero é predominantemente formada por um núcleo hidrofóbico (Muller, 1997; Starovasnik *et al.*, 1999; Dvorak, 2003).



Figura 4: Estrutura cristalográfica do VEGFA mostrando seu monômero (A) e o homodímero (B). Em (A) podemos observar a estrutura do monômero do VEGF, formada por duas pequenas α -hélices, 4 folhas β centrais (β 1, β 3, β 5 e β 6) e 3 pequenas folhas β (β 2, β 4 e β 7) com o domínio característico *cysteine knot* localizado na região das folhas β 4 e β 7, e os três *loops* indicados. Em (B) podemos observar a estrutura dimérica do VEGF, na qual os monômeros se organizam de forma antiparalela. As 3 pontes dissulfeto intramoleculares estão destacadas em preto e as intermoleculares, em azul (PDB 2VPF) (Adaptado de Hoeben *et al.*, 2004).

A estrutura de VEGF-A ligado a VEGFR-1 ou VEGFR-2 é muito semelhante à conformação dessa molécula em sua forma livre, apenas algumas pequenas diferenças são observadas nos *loops* 1 e 3 (Wiesmann, . *et al.*, 1997). Estudos estruturais mais aprofundados descreveram a presença de duas regiões englobadas pelo domínio de ligação do VEGF-A a seus receptores, e cada uma delas desempenha papel determinante no que diz repeito à interação do VEGF-A com os VEGFR-1 ou VEGFR-2. A região composta por aminoácidos básicos é a principal responsáveis pela ligação ao VEGFR-2, enquanto que a região composta por resíduos ácidos se liga fortemente ao receptor VEGFR-1. A evidência de duas regiões de ligação, localizadas nas extremidades da estrutura dimérica de VEGF-A, capazes de interagir seletivamente com cada receptor caracteriza um mecanismo para a dimerização dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 (Keyt *et al.*, 1996). Cabe ressaltar que dados estruturais e de mutagênese corroboram esses resultados, indicando que a região de interação possui alta

flexibilidade, sendo importante para a formação do complexo tanto com VEGFR-1, quanto VEGFR-2 (Muller *et al.*, 1997).

Estudos estruturais do PIGF mostram que este possui grande semelhança estrutural, com algumas pequenas variações observadas para os resíduos da região N-terminal, localizados nos *loops* 1 e 3, que são as regiões com maior variabilidade conformacional (Iyer *et al.*, 2001).

Os VEGF-C e VEGF-D possuem extensões na porção C-terminal e N-terminal, assim como possuem o motivo *cystine-knot* presente em sua conformação tridimensional, sugerindo a presença de uma sub-família dentro dos VEGFs.

O VEGF-F possui em torno de 50% de identidade de sequencia primária em comparação ao VEGF-A. Além disso, possui a porção C-terminal composta por resíduos majoritariamente básicos, formando uma região C-terminal menor do que aquela descrita para os VEGFs (Yamazaki *et al.*, 2005).

1.5.2 – Estrutura tridimensional dos VEGFRs

Conforme descrito anteriormente, os receptores de VEGF pertencem à classe V da família dos RTKs, formando uma subfamília de três receptores transmembrana, que possuem sete domínios extracelulares do tipo Ig-*like* (D1-D7), um domínio transmembrana e um domínio tirosina-quinase intracelular. A interação específica com os respectivos ligantes ocorre, principalmente, com o domínio extracelular 2 (D2). Para o VEGFR1 foi observado que há um aumento da afinidade de ligação quando os domínios 1 (D1) e 3 (D3) também participam da interação (Wiesmann *et al.*, 1997; Fuh *et al.*, 1998; Leppänen *et al.*, 2010). No caso do VEGFR2 os estudos estruturais mostraram que o D3 participa da interação junto com o D2. Para o VEGFR-3, o D1 é necessário para a interação do receptor com VEGF-C e VEGF-D, entretanto o papel exato deste domínio permanece ainda incerto (Figura X) (Jeltsch *et al.*, 2006; Leppänen *et al.*, 2011).


Figura 5: Ilustração da estrutura dimérica dos receptores de VEGF

Ilustração esquemática da estrutura dimérica dos VEGFRs e os principais domínios envolvidos na dimerização dos receptores VEGFR-1 (azul), VEGFR-2 (vermelho) e VEGFR-3 (verde) quando na presença do seu ligante específico (Retirado de Koch *et al.*, 2010).

Atualmente existem estruturas por cristalografia de raio x para o VEGFR-1 complexado com VEGF-A com resolução de 4 angstroms (Figura xA) (Markovic-Muller *et al*, 2016), assim como estruturas cristalográficas resolvidas apenas para o domínios 2 de VEGFR-1 ligado ao VEGF-B e PIGF (Leppanen *et al*, 2010; Leppanen *et al*, 2013; Brozzo *et al*, 2012). De forma geral, a literatura sugere que a função biológica desempenhada pelo VEGFR-1 está essencialmente ligada a sua porção extracelular, sendo a sinalização do domínio tirosina-quina menos importante. Dessa forma, estudos de deleção realizados para este receptor mostraram que o segundo domínio Ig-*like* é necessário e suficiente para ancoragem de VEGF (Barleon *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1997; Wiesmann *et al.*, 1997; Davis-Smyth *et al.*, 1996). Além disso, não só para VEGFR-1 foi demonstrado que a interface de interação entre ligante e receptor está diretamente ligada ao domínio 2, mas também para o VEGFR-2 sugerindo que existe uma região de ligação bem conservada entre membros da familia de receptores de PDGF (Fuh *et al.*, 1998; Mahadevan *et al.*, 1995).



Figura 6: Estrutura cristalográfica do VEGFR1 complexado com VEGF-A.

Representação da estrutura cristalográfica do complexo VEGF-A/VEGFR1. O homodímero VEGF-A é mostrado em laranja e roxo, e as duas cadeias do receptor VEGFR-2 são coloridas em amarelo e ros. As glicosilações são mostradas círculos cinza . . O homodímero D7 mostrado em cinza foi posicionado sobrepondo VEGFR-1D2-7/VEGF-A a VEGFR-1 D1-6/VEGF-A VEGF-C liga-se à interface VEGFR-2 entre os domínios 2 e 3 (Retirado de Muller et al., 2017) (PDB: 5T89).

A estrutura dos domínios 2 e 3 do VEGFR-2 ligado ao VEGF-A foi resolvida através de técnicas de microscopia eletrônica e a estrutura do complexo VEGFR2-D23-VEGF-C foi resolvida por cristalografia de raio-x com resolução de 2,7 angstroms (Ruch *et al*, 2007 e Leppänen *et al*, 2009). Para o VEGFR-2, os domínios 2 e 3 são os que estão envolvidos na interação com o ligante, sendo o D2 o principal deles. Cabe ressaltar que os dados estruturais mostraram que a estrutura dimérica do VEGFR-2 é estabilizada através da interação dos domínios 4 e 7 de cada um dos monômeros deste receptor (Di Stasi *et al.*, 2010).



Figura 7: Estrutura cristalográfica dos domínios 2 e 3 de VEGFR2 complexado com VEGF-C.

Representação da estrutura cristalográfica do complexo VEGF-C / VEGFR2-D2-D3. O homodímero VEGF-C é mostrado em laranja e verde, e as duas cadeias do receptor VEGFR-2 são coloridas em cinza. As glicosilações e as pontes de dissulfeto são mostradas em linhas roxas e amarelas, respectivamente. VEGF-C liga-se à interface VEGFR-2 entre os domínios 2 e 3 (Retirado de Leppänen et al., 2010) (PDB: 2XIW).

A estrutura do VEGFR-3 ligado ao VEGF-C foi determinada através de cristalografia de raio-x com resolução de 4,2 angstroms (Leppänen *et al*, 2013). Especificamente, a estrutura de VEGFR-3 possui duas características que não seguem os padrões previstos para os RTKs. A primeira diferença está no domínio extracelular de VEGFR-3, que possui uma ponte de sulfeto unindo dois dos sete domínios *Ig-like*

presentes na porção extracelular da proteína, o que não ocorre nos VEGFR-1 e VEGFR-2 (Koch *et al.*, 2012). A segunda está na sequência primária do receptor, mais especificamente na porção C-terminal da cadeia polipeptídica dos VEGFs está um resíduo de tirosina essencial para a sinalização, Y1175 em VEGFR-2 e Y1169 em VEGFR-1. Entretanto, esse resíduo não é conservado no VEGFR-3, sugerindo uma diferença na sinalização. Além disso, descobriu-se que doenças relacionadas ao sistema linfático são geradas por mutações no gene VEGFR-3, particularmente no domínio tirosina-quinase. Essas mutações causam uma diminuição na atividade da porção quinase presente no domínio intracelular e na sinalização, indicando que a linfangiogênese adequada em humanos é dependente da atividade do domínio tirosina-quinase de VEGFR-3 (Karkkainen *et al*, 2001, Irrthum *et al*, 2000, Karkkainen *et al*, 2000 e Ghalamkarpour *et al*, 2006) (Figura 8).





A a estrutura cristalográfica do complexo VEGFR3-D1D2/VEGF-C e o homodímero de VEGFR3 D4-D5 estão mostradas na figura. Em azul e amarelo podemos observar os domínios D2, D4 e D5 do VEGFR3. Em cinza o domínio D2 do VEGFR3 e em laranja o VEGF-C. Os domínios de Ig 1-5 (D1-D5), os loops de VEGF-C 1-3 (L1-L3) e a hélice N-terminal (α N) e as regiões de glicolsilaão (em azul) estão destacadas. (Retirado de Leppänen et al., 2013) (PDB: 4BSK).

A comparação entre as estruturas dos VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 mostram que os VEGFRs compartilham uma interface de interação ao ligante conservada no domínio 2 (D2). Portanto, é essencial entender a natureza exata da interação entre os receptores dos VEGF e seus ligantes através de estudos estruturais. Dessa forma, será possível entender os mecanismos moleculares da interação VEGF-VEGFRs e os processos de angiogênese e linfanogênese gerados pelo domínio tirosinaquinase intracelular. Apesar de poucas informações estruturais acerca da interface de interação entre os VEGFs e seus receptores, o entendimento do papel essencial que esses fatores desempenham nas vias de sinalização de processos agiogênicos tanto fisiológicos quanto patológicos, deu origem a diversas propostas de terapias antiangiogênicas utilizadas atualmente.

1.6 – Terapias Anti-angiogênese

As terapias que visam o impedimento dos processos de angiogênese são uma modalidade consolidada no tratamento moderno antitumoral, implementadas para diversas patologias associadas à vascularização. De forma geral, como já descrito anteriormente, a angiogênese tumoral ocorre a partir de um sistema complexo que envolve a migração e proliferação de células endoteliais, remodelação da matriz extracelular e interação de células não hematopoiéticas derivadas de órgãos sanguíneos (Clarke *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o sistema VEGF-VEGFR é considerado único, pois consiste em um número muito limitado de moléculas que são essenciais no processo de regulação da angiogênese. Estudos mostram que alguns VEGFs, tais como PIGF, VEGF-C e VEGF-D, assim como o receptor VEGFR-3 parecem estar parcialmente envolvidos na angiogenese patológica, como nos casos de vascularização tumoral. Por outro lado, os tumores que já estão em fase de metástase expressam níveis mais elevados de VEGF-C e VEGF-D, sugerindo que esses ligantes, junto com o VEGFR-3, desempenham um papel importante na migração de células tumorais (Shibuya, 2011 e Ferrara *et al*, 2004).

Atualmente, as abordagens mais comuns utilizadas na inibição da interação VEGF-VEGFR incluem duas metodologias principais que se diferenciam quanto ao foco de atuação: os domínios extracelular ou intracelular dos receptores de VEGF. A primeira metodologia, visando o domínio extracelular, envolve a utilização de anticorpos monoclonais ou receptores solúveis que tenham a capacidade de inibir ou

bloquear a interação dos VEGFs ao seu receptor específico. Por outro lado, a segunda metodologia, prevê a utilização de pequenas moléculas que inibem a fosforilação do domínio tirosina-quinase e, consequentemente, impeçam a ativação da via de sinalização dos processos angiogênicos gerada pelo domínio intracelular dos VEGFRs (Weis *et al.*, 2011).

A Food and Drug Administration (FDA), órgão do governo dos Estados Unidos com a função de controlar os alimentos e medicamentos, através de diversos testes e pesquisas e que é considerado referência mundial nesse tema, já liberou a utilização de diversos medicamentos baseados nos métodos de atuação descritos acima. Alguns exemplos incluem: bevacizumab, ziv-aflibercept, ambos com ação anti-VEGF e diversas pequenas moléculas inibidoras de RTKs, como sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib e regorafenib (Figura 9) (Kopetz *et al.*, 2010; Lieu *et al.*, 2013).



Figura 9: Mecanismo de ação das terapias anti-angiogênicas.

Resumo dos mecanismos gerais de ação para os medicamentos ziv-Aflibercept, bevacizumab, ramucirumab que atuam na porção extracelular dos RTKs e pequenas moléculas inibidoras do domínio tirosina-quinase, sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib e regorafenib, também utilizadas em terapias anti-angiogênicas (Adaptado de Clarke *et al*, 2013).

Entretanto, a utilização desses medicamentos no tratamento da angiogênese patológica, apresentam problemas no que diz respeito a sua eficácia. Por exemplo, no caso de bevacizumab, nem todos os pacientes melhoram durante o tratamento, e a duração da resposta do medicamento frente à inibição da angiogênese patológica pode ser muito variada em cada indivíduo. Além disso, a sobrevida global dos pacientes que adotaram esse tratamento foi baixa para vários casos de vascularização patológica, incluindo câncer de mama e pulmão (Arnold et al., 2012). A heterogeneidade nos desfechos clínicos que envolvem terapias direcionadas ao sistema VEGF-VEGFR pode ser justificada pelas alterações observadas nas vias angiogênicas de cada paciente justificadas pelo modo de ação, nem sempre eficaz, dos medicamentos disponíveis (Fischer et al., 2008). Dentro desse quadro, medicamentos como ziv-Aflibercept, bevacizumab, ramucirumab são altamente específicos e funcionam bloqueando a interação do ligante com apenas um tipo de receptor de VEGF (VEGFR-1 ou VEGFR-2), contribuindo para a dificuldade da efetividade do tratamento. Já as pequenas molécula inibidoras de RTKs, a exemplo: sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib e regorafenib possuem baixa especificidade e baixa permeabilidade celular, o que dificulta seu acesso a região intramembranar e consequentemente, sua eficácia. Dessa forma, muitos pacientes desenvolvem resistência durante o tratamento antiangiogênico (Van Cutsem et al., 2012; Ramlau et al., 2012; Arnold et al., 2012).

1.7 – Peptídeos inibidores de VEGF

Embora as terapias antiangiogênicas direcionadas à inibição de formação do complexo VEGF-VEGFR tenham mostrado algum sucesso e aumentado a sobrevida de pacientes com câncer, ainda há questões a serem resolvidas. Como descrito anteriormente, muitos pacientes não respondem à terapia e a maioria dos pacientes que desenvolvem alguma resposta inicial, acabam desenvolvendo resistência ao longo do tratamento (Ellis *et al*, 2008). Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos de ação desses agentes proangiogênicos e anti-angiogêncios é necessária, o que por consequência, ampliaria a eficácia dessas terapias (Ellis *et al*, 2008; Giordano *et al.*, 2009). Além disso, o desenvolvimento de novas moléculas capazes de inibir o mecanismo de sinalização gerado pelos VEGFs e seus receptores de forma seletiva e eficiente pode superar algumas das dificuldades associadas aos inibidores angiogênicos atualmente utilizados em terapias (Fischer *et al.*, 2008).

Nesse contexto, diversos estudos vêm sendo realizados por diferentes grupos de pesquisa no intuito de buscar moléculas altamente eficazes para interagir de forma específica ou não com os diferentes receptores de VEGF (Giordano *et al.*, 2005, 2010; Michaloski *et al.*, 2016).

Uma metodologia utilizada na obtenção de ligantes específicos para alvos moleculares é o Phage-Display. Esta técnica é baseada em engenharia genética de bacteriófagos associada a ciclos consecutivos de seleção guiada por antígenos e propagação de fagos (Barbas, 2001). Em 2005, Giordano e colaboradores foram capazes de, a partir de uma biblioteca randômica de peptídeos e utilizando a técnica de Phage-Display, identificar um peptídeo cíclico capaz de interagir especificamente com VEGFR1 e inibir a ligação desse receptores com VEGFs. Sendo assim, a técnica permite a seleção in vitro de moléculas de qualquer especificidade, facilitando a produção recombinante de reagentes para uso em laboratórios de pesquisa e diagnósticos clínicos, assim como para produtos farmacêuticos (Lee et al., 2007). Sendo assim, a técnica se inicia através da construção de uma biblioteca polipeptídica, e os peptídeos pertencentes a essa biblioteca são associados a bacteriófagos. Em seguida, os fagos da biblioteca são incubados com a molécula alvo imobilizada, a fim de permitir a seleção por afinidade a peptídeos expostos que são apresentados por fagos com proteínas alvo de ligação. Após essa etapa, lavagens são realizadas para eliminar os fagos não ligados ou que possuíram ligação não-específica com os alvos. Ao final das lavagens, os fagos que se ligaram de forma específica são eluídos e amplificados, sendo utilizados para ciclos adicionais de seleção, até que permaneçam somente os peptídeos que interagiram especificamente com os alvos (Figura 10) (Hammers et al., 2012).



Figura 10: Técnica de Phage-Display.

Em (A) a estrutura da biblioteca peptídica associada a bacteriófagos e em (B) as etapas envolvidas no processo: o alvo é imobilizado (1), os fagos com a biblioteca peptídica exposta são colocados em contato com o alvo (2), é feita uma lavagem para a retirada dos fagos inespecíficos (3), e uma posterior eluição daqueles com a mais alta afinidade pelo alvo (4); o fago eluído é amplificado (5) e o processo de *biopanning* é realizado várias vezes até que permaneçam os fagos de maior afinidade (Adaptado de Christensen *et al.*, 2001; Michaloski *et al.*, 2016).

Desta forma, Giordano e colaboradores foram capazes de identificar peptídeos inibidores de VEGFR-3 (Michaloski *et al.*, 2016). Inicialmente o grupo determinou um receptor alvo, o VEGFR-3, através do padrão de expressão elevado em células endoteliais especializadas, que têm como função a formação de vasos sanguíneos e migração em direção a regiões com altas concentrações de VEGF (Gerhardt *et al.*, 2003; Herbert *et al.*, 2011). Além disso, dados anteriores demonstraram que o tratamento desse tipo de células endoteliais com anticorpo monoclonal anti-VEGFR-3 preveniu angiogênese da retina (Tammela *et al.*, 2008). Uma vez definido o alvo, a identificação de peptídeos capazes de interagir com VEGFR-3 foi realizada através de *Phage-Display*.

Nesse contexto os autores foram capazes de identificar dois peptídeos que interagiram com VEGFR-3: PCAIWF e WVCSGG (REF). Estudos anteriores realizados por Giordano e colaboradores mostraram que a utilização de peptídeos inibidores de VEGF geram resultados promissores para o tratamento de retinopatias (Giordano *et al.*, 2005, 2010). Sendo assim, para avaliar se o peptídeo sintético

PCAIWF seria capaz de inibir a neovascularização, ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados (Figura 11).



Figura 11: Ação do peptídeo PCAIWF in vitro e in vivo

Em (A) a formação de vasos por HUVECs em Matrigel induzida por VEGF-A ou VEGF-C na presença (PCAIWF) ou ausência (-) de peptídeo PCAIWF e no controle negativo (DMSO) e em (B) imagens de microscopia confocal representando a retina de camundongos com retinopatia induzida (Retirado de Michaloski *et al.*, 2016).

Os resultados mostraram que o peptídeo PCAIWF possui atividade antiangiogênica *in vitro* e nos modelos *in vivo*, sendo capaz de reduzir a vasculogênese em animais com retinopatia induzida. Além disso, estudos realizados pelo mesmo grupo, mostraram que o peptídeo em questão não é específico apenas para VEGFR-3, sendo capaz de neutralizar a ligação dos VEGFs a todos os seus receptores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3). Esse tipo de comportamento sugere que os membros da família de RTKs classe V possuem um sítio de interação em comum, o que pode ser extremamente importante para o desenvolvimento de medicamentos.

Desta forma, o estudo estrutural dos mecanismos de interação dos peptídeos e os diferentes VEGFRs são de extrema importância para o entendimento da via de sinalização de VEGFs, bem como, para o desenho de novas drogas.

2 - OBJETIVO

2.1 - Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é expressar e purificar os domínios 2 dos receptores 1 e 3 dos fatores de crescimento vascular e endotelial e monitorar a interação destes receptores com o peptídeo anti-VEGF (DGA)PCAIWF por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

2.2 – Objetivos específicos

- Determinar a condição ideal de expressão para o domínio 2 do VEGFR1 (VEGFR1-D2) e VEGFR3 (VEGFR3-D2) utilizando diferentes condições;

- Expressar os VEGFR1-D2 e VEGFR3-D2 utilizando meio Luria-Bertani (LB) e meio mínimo (M9);

- Estabelecer o protocolo de purificação e refolding do VEGFR3-D2;

- Expressar e purificar o VEGFR1-D2 marcado com ¹⁵N.

-Assinalar o HSQC editado para ¹⁵N do VEGFR1-D2 em diferentes condições (REF);

- Assinalar o peptídeo DGAPCAIWF com base em espectros de TOCSY e NOESY

 Estudar a interação do peptídeo (DGA)PCAIWF com o VEGFR1-D2 utilizando mudanças no deslocamento químico nos espectros 1H-15N e titulação com o gadolínio através de RMN.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

3.1.1 – Cepas

As células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) foram obtidas no banco de cultura do Laboratório de Bioquímica Estrutural de Proteínas (LaBEP) da UFRJ e utilizadas no processo de transformação. Os plasmídeos contendo os genes VEGFR1-D2 e VEGFR3-D2 foram obtidos através de uma colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Giordano da Universidade de São Paulo.

3.1.2 – Peptídeo (DGA) PCAIWF

Os peptídeos DGAPCAIWF e PCAIWF foram cedidos pelo Professor Ricardo Giordano da Universidade de São Paulo.

3.1.3 – Reagentes

Tabela 1: Principais reagentes utilizados no trabalho

| Reagentes | Fornecedores | |
|---|----------------------|--|
| Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) | Calbiochem | |
| Ácido Glutâmico | Isolar | |
| Acrilamida | Biorad | |
| Ágar | Sigma | |
| Água deuterada | Sigma Aldrich | |
| Ampicilina | Sigma | |
| Arginina | Sigma-aldrich | |
| Bisacrilamida | Biorad | |
| Cloreto de Amônio | Sigma | |
| Cloreto de Amônio marcado com ¹⁵ N | Cambridge | |
| | Isotope Laboratories | |
| Cloreto de Cálcio | Sigma-Aldrich | |

| Cloreto de Sódio | Sigma | |
|---|--------|--|
| Comassie blue G250 | Sigma | |
| Deoxicolato de Sódio | Sigma | |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | Sigma | |
| Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO deuterado) | Sigma | |
| Dodecil sulfato de sódio (SDS) | Sigma | |
| Etanol | Sigma | |
| Fosfato de sódio dibásico | Sigma | |
| Fosfato de sódio monobásico | Sigma | |
| Glicina | Sigma | |
| Glicose | Sigma | |
| Imidazol | Sigma | |
| Isopropilβ-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) | Sigma | |
| Meio de cultura Luria-Bertani (LB) | Sigma | |
| Metanol | Vetec | |
| Padrão de Albumina de soro bovino (BSA) | Biorad | |
| Reagente de Bradford | Sigma | |
| Resina de Níquel - Sepharose | GE | |
| Sulfato de Magnésio | Sigma | |
| Tiamina | Sigma | |
| Tris Base | Sigma | |
| Ureia | Sigma | |
| β-Mercapto-etanol | MPBio | |

3.2 – Métodos

3.2.1 – Fluxograma da metodologia utilizada para o estudo dos receptores de VEGF

O fluxograma abaixo tem como objetivo resumir a metodologia empregada neste trabalho para os dois domínios 2 dos receptores VEGFR1 (figura 12) e VEGFR3 (figura 13).



Figura 12: Fluxograma da metodologia adotada para o estudo dos domínios 2 dos VEGFR1 e sua interação com o peptídeo (DGA)PCAIWF



Figura 13: Fluxograma da metodologia adotada para o estudo dos domínios 2 dos VEGFR3

A clonagem foi realizada pelo grupo do professor Ricardo Giordano da USP, que gentilmente nos cedeu plasmideos contendo o gene de VEGFR1-D2 ou VEGFR3-D2.

Para que a clonagem fosse realizada, foi realizada uma reação em cadeia polimerase (PCR) utilizando, para amplificação, o plasmídeo pDONR223, contendo, toda a região codificante do gene VEGFR-3 ou, do gene VEGFR-1 em conjunto com primers específicos tanto para VEGFR1-D2, quanto VEGFR3-D2. Em seguida, para a subclonagem, os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição NdeI e XhoI e então ligados ao vetor de expressão pET21a com o auxílio da enzima T4 DNA ligase. A figura 14 ilustra o vetor de expressão utilizado para subclonagem.



Figura 14: Mapa do vetor pET-21a.

A figura mostra o vetor pET21a destacando todas as enzimas de restrição possíveis de serem utilizadas, a região da origem de replicação (f1 origin) e o promotor de superexpressão LacI, indutivel por IPTG. As setas indicam a região das enzimas de restrição utilizadas na etapa de subclonagem (NdeI e XhoI).

A sequência primária de VEGFR1-D2 contem 110 aminoácidos, com peso molecular e pI estimados de 12,72 KDa e pI 7,13 respectivamente. Já a proteína VEGFR3-D2 possui 103 aminoácidos com peso molecular 11,89 KDa e pI 5,43, dados obtidos através da ferramenta virtual ProtParam. Além disso, ambas as sequências possuem a adição de uma cauda com seis Histidinas (His₆) no N-terminal (Figura 15). A escolha da adição da cauda de histidina ao final da cadeia polipeptídica diz respeito a uma estratégia adotada para as etapas de purificação posteriores, que incluem Cromatografias de Afinidade a Níquel.

A) VEGFR1-D2

M S D T G R P F V E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y K T N Y L T H R Q T N T I **L E H H H H H H**

B) VEGFR3-D2

MEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLVSIPGLNVTL RSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALY LQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELLEHHHHHH

Figura 15: Sequências primárias das construções dos domínios 2 dos receptores (A) VEGFR1 e (B) VEGFR3.

Em (A) observamos a sequência primária da construção do domínio 2 da proteína VEGFR1 e em (B), a sequência primária do domínio 2 de VEGFR3. Em azul é mostrada a sequência primária das proteínas, em vermelho está destacada a cauda de histidina e em preto os aminoácidos expressos pela construção do próprio vetor.

3.2.3 – Transformação dos genes VEGFR1-D2 e VEGFR3-D2

As células competentes BL21 (DE3) e DH5 α foram transformadas com as construções pET21a-VEGFR1-D2 e pET21a-VEGFR3-D2 através de choque térmico. Inicialmente, 1 µL de DNA foi adicionado a 200 µL de células competentes e levado ao banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, a célula foi mantida em banho maria a 42°C por 90 segundos, passando novamente por mais 10 minutos em banho de gelo. Ao final dessa etapa, 800 µL de meio LB foram adicionados às células competentes

transformadas e estas foram incubadas a 37°C em agitador rotatório a 200 rpm por 1 hora. O inóculo foi plaqueado em meio LB ágar contendo o antibiótico específico (ampicilina 100 µg/mL) e a placa incubada a 37°C por aproximadamente 16 h. Em seguida, uma colônia de bactéria foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubada a 37°C sob agitação a 200 rpm por 16 h. Após esse período, 15% de glicerol foi adicionado a cultura bacteriana sendo esta fracionada em alíquotas de 1 mL e estocadas a -20°C para utilização posterior da cultura de glicerol . Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar.

3.2.4 – Expressão do VEGFR3-D2

3.2.4.1 – Teste de expressão VEGFR3-D2 em LB e meio mínimo

Inicialmente, o domínio 2 do VEGFR3 foi expresso em meio LB (0,5% de extrato de lêvedo, 1% de triptona e 0,5% NaCl). Como passo inicial para os testes de expressão, 10 μ L de uma alíquota do estoque de glicerol da cepa de *E. coli* BL21 (DE3) contendo a construção de interesse foram vertidos em 5 mL de meio LB líquido contendo 100 μ g/mL de ampicilina. O pré-inóculo foi incubado a 37°C por 16 horas em agitador rotatório a 200 rpm. Após esse período, parte do crescimento foi repicado em 50 mL de meio LB na presença de 100 μ g/mL de ampicilina, permanecendo a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até alcançar a D.O_{600nm} de 0,7. Nesta fase, o indutor IPTG foi adicionado na concentração de 0,2 ou 1 mM e a expressão foi mantida em três temperaturas diferentes: 18°C, 25°C e 37°C. Alíquotas de 2 mL foram retiradas antes da indução e após a indução com 1, 2, 3, 4 e 16 h. Essas alíquotas foram centrifugadas a 8000 x g, 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi armazenado para monitorar a expressão das proteínas totais presentes na fração solúvel e insolúvel através de SDS-PAGE 15%.

O mesmo protocolo realizado para os testes de expressão em meio LB foi utilizado para o meio mínimo M9 incluindo os métodos de análise para o monitoramento da melhor condição de expressão.

Com a melhor condição de expressão determinada foi possível escalonar a produção do VEGFR3-D2 para volumes maiores de meio mínimo (500 mL ou 1L), utilizando de forma proporcional, o protocolo descrito acima, visando a produção da proteína duplamente marcada.

3.2.5 – Lise celular do VEGFR3-D2

Após a etapa de crescimento bacteriano, a solução foi centrifugada e o preciptado formado passou por uma etapa de lise celular, a fim de extrair todas as moléculas, inclusive a proteína de interesse, produzidas durante a etapa de crescimento. Para isso, o preciptado celular foi ressuspedido em tampão fosfato de sódio 20 mM com adição de 50 mM de NaCl e submetido a um passo de sonicação. Dessa forma, a parede celular é rompida e o meio intracelular extravasa para o sobrenadante. Ao final dessa etapa, as frações solúvel e insolúvel da lise celular foram avaliadas via SDS-PAGE 15% (dado não mostrado) e foi possível observar que grande parte da expressão de VEGFR3-D2 se encontrava na porção insolúvel. Entretanto, uma pequena concentração de VEGFR3-D2 estava presente na porção solúvel. Dessa forma, decidimos avaliar duas formas de produção de extrato bruto contendo VEGFR3-D2: lise celular focando na fração insolúvel.

3.2.5.1 - Lise celular da fração solúvel de VEGFR3-D2

Ao final da etapa de crescimento celular e expressão, a solução bacteriana foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C e as células obtidas foram ressuspendidas em tampão em tampão fosfato de sódio 20 mM com adição de 50 mM de NaCl e 16 μ g/mL de Lisozima. A solução foi incubada em banho de gelo por 30 minutos, e após esse período as células foram lisadas por sonicação em ciclos de 30 segundos *on* e 59 segundos *off*, com 100 W de potência e 30% de amplitude em um tempo total de 15 minutos. Ao final deste processo, o lisado foi centrifugado a 8000 g por 30 minutos a 4°C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante aplicado nas etapas de purificação seguintes.

3.2.5.2 – Lise celular da fração insolúvel do VEGFR3-D2

A cultura bacteriana proveniente da expressão do domínio 2 do VEGFR3 foi centrifugada a 10000 x g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em tampão de lise, 50 mM de Tris-Cl, pH 8,0 contendo 50 mM de NaCl. As células foram lisadas por sonicação em ciclos de 30 segundos *on* e 59 segundos *off*, com 100 W de potência e 30% de amplitude em um tempo total de 15

minutos. O lisado foi centrifugado a 8.000 x g por 30 minutos a 4°C e o pellet formado foi lavado com tampão 50 mM de Tris-Cl, pH 8,0 contendo 0,5% de Triton X-100, 100 mM de NaCl e 1 mM de EDTA. A solução foi novamente centrifugada a 8000 x g por 30 minutos a 4°C. O precipitado formado foi ressuspendido em tampão fosfato 20 mM pH 8,0 contendo 8 M de uréia, 100 mM de NaCl e 5 mM β -mercaptoetanol e incubado por 16 h em temperatura ambiente. Após esse período, a solução passou por uma etapa de centrifugação como a realizada nos passos anteriores e o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi utilizado como extrato bruto para a primeira etapa de purificação.

3.2.6 – Purificação do VEGFR3-D2

3.2.6.1 – Purificação da fração solúvel do VEGFR3-D2

Com o objetivo de alcançar alto grau de homogeneidade e pureza da amostra, dois passos cromatográficos foram realizados para a fração solúvel do VEGFR3-D2.

Inicialmente uma cromatografia de afinidade a níquel foi realizada utilizando a coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare) acoplada ao sistema de purificação ÄktaPrime Plus (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM com adição de 50 mM NaCl pH 7,3 e o extrato bruto proveniente da etapa de lise celular foi aplicado na coluna com um fluxo de 0,5 mL/min. Após esse período a coluna foi lavada com 50 mL do mesmo tampão utilizado na etapa de equilíbrio e a eluição foi realizada após a lavagem da coluna com tampão fosfato de sódio 20 mM com adição de 50 mM NaCl e 800 mM de Imidazol pH 7,3 com adição de 800 mM de Imidazol. As etapas de lavagem foram realizadas utilizando um fluxo de 2 mL/min.

O segundo passo de purificação foi realizado através de cromatografia de exclusão molecular. As frações coletadas na etapa anterior foram concentradas utilizando um CENTRICON (3.000 Da, Millipore) para um volume final de 3 mL e aplicadas em coluna HiLoad 16/600 superdex 75 (GE) equilibrada em tampão fosfato de sódio 20 mM com adição de 50 mM NaCl pH 7,3. A corrida foi realizada a um fluxo de 1 mL/min em sistema de purificação ÄKTA Explorer (GE/Pharmacia). Através da curva de calibração da coluna foi possível avaliar se o volume de eluição da amostra era o esperado para VEGFR3-D2 (Figura 13 e Tabela 2). As alíquotas referentes aos picos de

eluição de ambas as cromatografias foram retirados para a dosagem de proteína e para o monitoramento da purificação através de SDS-PAGE 15%.

3.2.6.2 - Purificação da fração insolúvel de VEGFR3-D2

A primeira etapa de purificação da fração insolúvel do VEGFR3-D2 consistiu em uma cromatografia de afinidade a níquel. Para isso, foi utilizada uma coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare), acoplada ao sistema de purificação ÄktaPrime Plus (GE Healthcare), e equilibrada em tampão 20 mM de fosfato de sódio, pH 8,0, com a adição de 8 M de uréia, 100 mM de NaCl e 5 mM de β -Mercaptoetanol. O sobrenadante da lise celular foi aplicado na coluna utilizando um fluxo de 0,5 mL/min. A lavagem da coluna foi feita utilizando novamente o mesmo tampão em a um fluxo de 2 mL/min. Posteriormente, a coluna foi submetida a um gradiente linear de 0 a 100% de tampão 20 mM de fosfato de sódio, pH 8,0 com a adição de 8 M de uréia, 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol e 1 M de Imidazol , ou seja, um gradiente linear de imidazol de 0 a 1 M, mantendo o fluxo de 2 mL/min. Alíquotas de 1 mL foram coletadas durante o processo de purificação. O perfil de eluição das proteínas presentes na amostra foi acompanhado por absorbância a 280 nm e, em seguida, monitorado através de SDS-PAGE 15%.

As frações contendo VEGFR3-D2, provenientes da primeira etapa cromatográfica, foram identificadas por SDS PAGE 15%, reunidas e dosadas. Posteriormente, seguindo o protocolo de *Refolding*, previamente descrito por Alexandre Rodrigues, 2016, a amostra em questão foi gotejada lentamente em tampão fosfato de sódio 20 mM com adição de 50 mM de NaCl e 5 mM de β - Mercatoetanol pH 7,3, mantendo a proporção de 50 µg de proteína para 1 L de tampão de *Refolding*. Durante o processo de *Refolding* foram necessárias diversas modificações no protocolo inicial, para isto foram testados diversos tampões, sempre a base de tampão fosfato de sódio 20 mM com adição de 50 mM de NaCl e 5 mM de β - Mercatoetanol pH 7,3 adicionando novas substâncias a fim de favorecer o enovelamento proteico (50 mM Arginina, Ácido Glutâmico e Glicina; 0,2% de SDS ou 0,1% de Deoxicolato de Sódio).

Após o *Refolding*, a segunda etapa de purificação foi realizada através de uma nova cromatografia de afinidade a níquel utilizando a mesma coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare), acoplada ao sistema de purificação ÄktaPrime Plus (GE Healthcare), na qual o β-mercaptoetanol proveniente da etapa de *refolding*, foi retirado

através de grandes volumes de lavagem. Nessa etapa a coluna foi equilibrada com 20 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,3 acrescido de 50 mM de NaCl. A amostra foi aplicada na coluna a um fluxo de 1 mL/min em 3 corridas distintas. O objetivo era evitar a sobrecarga da coluna de níquel. Em seguida, a coluna foi lavada com o mesmo tampão utilizado na etapa de equilíbrio com um fluxo de 2 mL/min, e para eluição da proteína foi acrescido 800 mM de Imidazol ao tampão. Após essa etapa, a amostra foi submetida a uma *desalting* (Disposable PD-10 Desalting Columm - GE Healthcare), para a retirada do imidazol, uma vez que essa substância causa interferência em diversas análises da proteína, inclusive para os estudos estruturais por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3.2.7 – Expressão de VEGFR1-D2 em meio mínimo (M9)

O processo de expressão, lise celular e purificação do domínio 2 do VEGFR1-D2 foi realizado com a inserção de pequenas modificações segundo o protocolo descrido por Alexandre Rodrigues, 2016.

Para a expressão de VEGFR1-D2, 10 μ L da cultura de glicerol foram adicionados a 2 mL de meio LB com a adição de 100 μ g/mL de ampicilina e incubados a 37°C com agitação constante a 200 rpm por 7 h. Após esse período, 200 μ L do inóculo foram repicados em 25 mL de meio M9 contendo 100 μ g/mL de ampicilina e incubados a 37°C sob agitação a 200 rpm por 16 h. Em seguida, os 25 mL do préinóculo foram vertidos em 500 mL de meio M9 isotopicamente marcado com ¹⁵N, contendo 100 μ g/mL de ampicilina, e incubado a 37°C sob agitação a 200 rpm até que a densidade ótica a 600 nm (D.O_{600nm}) atingisse aproximadamente 0,6. Neste momento, a expressão do VEGFR1-D2 foi induzida através da adição de 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Após a adição de IPTG, a cultura bacteriana foi crescida por 4 h a 37°C mantendo agitação constante a 200 rpm. Ao final deste tempo de expressão do VEGFR1-D2, a cultura foi centrifugada a 8000 x g por 20 min a 4°C e o precipitado foi armazenado em freezer -20°C enquanto o sobrenadante foi descartado. Todo o monitoramento da expressão proteica foi analisado através de SDS-PAGE de 15%.

Cabe ressaltar, que para o caso de expressão da proteína isotopicamente marcada, houve a adição do cloreto de amônio marcado com ¹⁵N.

3.2.8 – Lise celular de VEGFR1-D2

As células obtidas na etapa de expressão foram ressuspendidas em tampão PBS pH 7,8 (50 mM de fosfato de sódio e 150 mM de cloreto de sódio) na proporção de 1g de massa úmida para 20 mL de tampão (REF). A primeira etapa de lise celular foi realizada por sonicação (10 ciclos de 30 segundos *on* a 225 W com 59 segundos *off* para resfriamento) em banho de gelo. O extrato obtido foi centrifugado a 8000 x g por 20 minutos a 4°C. Em seguida, o pellet foi ressuspendido em tampão PBS pH 7,8 com adição de 8 M de uréia e 10 mM de β -mercaptoetanol e incubado por 16 h a temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi centrifugada a 8000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado na primeira etapa de purificação enquanto o pellet foi descartado. Todo o monitoramento da lise celular foi realizado através de SDS-PAGE de 15%.

3.2.9 – Purificação de VEGFR1-D2

Para obtenção da proteína solúvel e em alto grau de homogeneidade, foram implementados três passos cromatográficos associados a um protocolo de *refolding*. Todas as etapas cromatográficas foram realizadas em sistema de purificação ÄKTA Explorer (GE/Pharmacia).

A primeira etapa de purificação foi realizada através de uma cromatografia de afinidade a níquel em coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare) com eluição por redução de pH. Inicialmente a coluna foi equilibrada em tampão PBS pH 7,8 com adição de 8 M uréia e 10 mM de β-mercaptoetanol. O extrato bruto foi aplicado na coluna a uma vazão de 0,5 mL/min, seguido de três etapas de lavagem de 20 mL cada, a uma vazão de 2 mL/min. Para isso, foram utilizando os tampões PBS pH 7,8; PBS pH 6,0 e Acetato pH 3,0 respectivamente. Todos os tampões continham 8 M uréia e 10 mM de β-mercaptoetanol. A eluição do VEGFR1-D2 ocorreu em um pico único logo no início da lavagem com tampão pH 3,0, o pico foi coletado em frações de 1 mL cada e monitorados através de SDS-PAGE 15%.

Posteriormente, o protocolo de *refolding* foi realizado através da diluição das alíquotas do pico de eluição da primeira etapa de purificação, que foram gotejadas lentamente em 1 L de tampão PBS pH 8,0 com adição de 10 mM de β-mercaptoetanol em agitação constante e banho de gelo segundo protocolo descrito por Redondo, 2016.

A segunda etapa de purificação foi efetuada através de uma cromatografia de afinidade a níquel com eluição isocrática. A coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare) foi equilibrada com tampão PBS pH 8,0 com adição de 0,05 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após o equilíbrio, a solução contendo o *refolding* da proteína foi aplicada à coluna a uma velocidade de 2 mL/min seguida de uma lavagem com 20 mL de tampão PBS pH 8,0 com adição de 0,05 mM de EDTA. Cabe ressaltar, que somente neste momento é retirado o β -mercaptoetanol. Ao final do processo, um degrau de 800 mM de Imidazol foi implementado para eluição da proteína de interesse. Cabe ressaltar que este passo foi subdividido com o objetivo de não ultrapassar o limite de saturação da coluna HisTrap HP (GE Healthcare). Dessa forma, o 1 L de solução de *refolding* foi purificado em três etapas do mesmo passo cromatográfico.

Alíquotas referentes aos picos de eluição foram coletadas e utilizadas para realizar o passo final de purificação em cromatografia de exclusão molecular. Esta etapa foi efetuada em coluna HiLoad 16/600 superdex 75 (GE) equilibrada em tampão PBS pH 7,3 ou 5,7.

Para o caso específico da cromatografia em pH 5,7, as alíquotas obtidas no segundo passo de purificação foram reunidas em uma única amostra, que foi previamente dialisada em 4 L de tampão PBS pH 5,7 com adição de 0,05 mM de EDTA por 3 h. Após este procedimento, a amostra foi concentrada em sistema CENTRICON (3000 Da, Millipore) até o volume final de 3 mL que foi aplicado na coluna HiLoad 16/600 superdex 75 (GE). Já no caso da cromatografia de exclusão molecular realizada a pH 7,3, a amostra não necessitou passar pela etapa de diálise, sendo apenas concentrada, também em sistema CENTRICON (3000 Da, Millipore) para 3 mL de volume final e aplicada na coluna mencionada.

A corrida cromatográfica foi realizada a um fluxo de 1 mL/min. A curva de calibração da coluna foi utilizada como referência para analisar o volume de eluição esperado para a proteína de interesse (Figura 16 e Tabela 2).



Figura 16: Curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular.

O gráfico correlaciona a massa das proteínas, previamente conhecidas, com o volume de eluição das mesmas para a coluna de gel filtração Superdex 75. As proteínas utilizadas como padrão foram albumina de soro bovino (BSA) (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), quimiotripsinogênio (25 kDa) e a RNAse A (13,7 kDa).

Tabela 2: Proteínas utilizadas como padrão para o cálculo da curva de calibração da cromatografia de gel filtração e a relação massa molecular *vs.* volume de eluição.

| Proteína | Massa Molecular (Da) | Log da massa molecular | Volume de eluição (mL) | Kav (razão de eluição) |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| RNAse A | 13700 | 4,14 | 77,98 | 0,44 |
| Quimotripsinogênio A | 25000 | 4,40 | 69,83 | 0,33 |
| Ovoalbumina | 43000 | 4,63 | 59,18 | 0,19 |
| BSA | 67000 | 4,83 | 53,17 | 0,11 |

3.2.10 - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises qualitativas das técnicas cromatográficas utilizadas para obtenção da fração purificada da proteínaforam realizadas através da eletroforese desnaturante, utilizando gel de poliacrilamida 15 % (p/v). A eletroforese foi executada em temperatura ambiente com intensidade de corrente elétrica de 25 mA por gel de poliacrilamida de acordo com o método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). A eletroforese foi realizada em sistema miniprotean da Bio-Rad utilizando o tampão 50

mM de Tris-HCl, pH 8,3; 150 mM de glicina e 0,1% (p/v) de SDS (tampão de corrida). Em cada amostra foram adicionados 5 μ L de tampão de amostra (12,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 25 mM de β -mercaptoetanol, 0,5% de SDS, 0,25% de azul de bromofenol e 2,5% de Glicerol) e 15 μ L destas foram aplicados nos géis. Estes foram corados com solução de *Coomassie brilliant blue* 0,1% em metanol/ácido acético/água na proporção 45/10/45 (v/v/v) e descorados utilizando solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). O padrão de peso molecular utilizado foi o padrão *Pierce Unstained Protein MW Marker* (Thermo Scientific).

3.2.11 – Preparo de amostras padronizadas para SDS-PAGE

No caso específico de géis de teste de expressão padronizados, as alíquotas recolhidas ao longo do ensaio foram centrifugadas a 8000 g a 4 °C por 10 min, o pellet formado foi acrescido de 500 μ L de tampão de lise e o volume foi sonicado por 1 min (ciclos de 10 segundos a 225 W com 10 segundos de resfriamento). Após a lise, a alíquota foi dosada, a fim de cada amostra aplicada no gel contivesse exatos 10 μ g de proteínas totais. O volume correspondente foi preciptado por acetona, centrifugado a 20000 g a 4 °C por 30 min, acrescido de 10 μ L de tampão de amostra Tris-HCl 12,5 mM, β -mercaptoetanol 25 mM, SDS 0,5%, Azul de bromofenol 0,25%, Glicerol 2,5% (pH 6,8) aplicado nos géis de poliacrilamida.

3.2.12 – Dosagem de proteínas

A concentração das amostras proteicas foi estimada através do método colorimétrico realizado em placa de 96 poços utilizando o reagente *Pierce 660 nm Protein Assay* (Thermo Scientific). Foram adicionados 150 μ L do reagente a um volume de 10 μ L de proteína e as dosagens foram realizadas em triplicata. Após 5 minutos de reação na ausência de luz, a absorbância das amostras foi medida a 660 nm utilizando um leitor de placas modelo Victor TM X5 (Perkin Elmer). Os valores de concentração das amostras de proteína foram calculados a partir de uma curva padrão feita com albumina bovina sérica (BSA) na faixa de 0,025 a 2 mg/mL.

3.2.13 – Ressonância magnética Nuclear

3.2.13.1 – Monitoramento da estrutura de VEGFR3-D2

Espectros de RMN unidimensionais de hidrogênio foram adquiridos para monitorar a eficácia dos protocolos de *Refolding* do VEGFR3-D2. Para isso, utilizamos amostras oriundas de cada protocolo de *refolding* testado contendo 50 μ M de VEGFR3-D2 não marcadas. O enovelamento proteico foi avaliado a partir de espectros unidimensionais coletados a uma temperatura de 25°C e com uma resolução de 8192 em *F*2 com 256 acumulações.

3.2.13.2 – Assinalamento de VEGFR1-D2

Os espectros bidimensionais ${}^{1}\text{H}{}^{15}\text{N}$ HSQC do receptor VEGFR1-D2 (100 μ M) purificado e isotopicamente marcado com ${}^{15}\text{N}$ foram coletados em um espectrômetro Bruker 800 MHz a 25°C em tampão PBS nos pHs 5,7 e pH 7,3 contendo 10% de D₂O (v/v). Os espectros HSQC tiveram resolução de 128 pontos em F1 e 1024 em F2 com 64 acumulações. Os espectros de RMN foram adquiridos e processados com o auxílio dos programas Topspin 3.1 (Bruker Biospin) e a análise dos dados de RMN foi realizada utilizando o programa CCPN (<u>http://www.ccpn.ac.uk/software/analysis</u>). O assinalamento foi feito por comparação, utilizando como base o trabalho de Starovasnik *et al.*, 1999.

3.2.13.3 – Peptídeo DGAPCAIW

Os espectros de TOCSY e NOESY do peptídeo DGAPCAIWF (3 mM) foram adquiridos em um espectrômetro Bruker 800 MHz a 25°C em tampão PBS pH 5,7 e 7,3 com adição de 0,05 mM de EDTA e 10% de D₂O (v/v). Inicialmente foram realizados experimentos unidimensionais para o monitoramento do comportamento do peptídeo em solução (dados não mostrados), coletados utilizando uma resolução de 8192 em F2 com 128 acumulações. Para o assinalamento do peptídeo, os espectros tanto os experimentos de NOESY quanto o TOCSY foram adquiridos com uma resolução de 512 pontos em F1 e 4096 em F2, com 48 acumulações e 128, respectivamente. Os espectros de RMN foram adquiridos e processados com o auxílio dos programas Topspin 3.1 (Bruker Biospin) e a análise dos dados de RMN foi realizada utilizando o programa CCPN (http://www.ccpn.ac.uk/software/analysis).

3.2.13.4 – Interação entre VEGFR1-D2 e DGAPCAIWF

Para que a interface de interação entre VEGFR1-D2 e o peptídeo DGAPCAIWF fosse monitorada utilizamos o Gadolínio (Gd), que é funciona como uma sonda interna, sendo capaz de se ligar a regiões da estrutura proteica que estão expostas ao solvente (Brasch *et al.*, 1984). Dessa forma, na presença do ligante alguns picos deixam de estar expostos ao solvente, não sentindo assim, a presença do Gd. Desta forma, espectros ¹H¹⁵N-HSQC são obtidos da proteína livre e ligada, contendo em ambos os casos, concentrações crescentes de Gd. Desta forma, é possível observar modificações no padrão de intensidade de sinal de resíduos envolvidos na interação com o ligante.

A solução estoque do complexo de Gadolíneo ([Gd(DTPA-BMA)] - GE Life Science) foi cedida pelo professor Fábio Almeida do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear da UFRJ. Para monitorar a acessibilidade do peptídeo DGAPCAIWF, experimentos unidimensionais e ¹H¹⁵N-HSOC do VEGFR1-D2 livre (100 µM) e ligado ao peptídeo (200 µM) contendo concentrações crescentes de Gd (0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 mM) foram adquiridos em um espectrômetro BRUKER 800 MHz na temperatura de 25°C em tampão PBS com adição de 0,005 mM de EDTA em pH 5,7 e 7,3. Os experimentos unidimensionais foram coletados utilizando uma resolução de 8192 em F2 com 128 acumulações e os HSQCs tiveram resolução de 128 pontos em F1 e 1024 em F2 com 64 acumulações. Os espectros de RMN foram adquiridos e processados com o auxílio dos programas Topspin 3.1 (Bruker Biospin) e a análise dos de **RMN** foi realizada utilizando dados 0 programa **CCPN** (http://www.ccpn.ac.uk/software/analysis).

4 – RESULTADOS

Para a melhor compreensão dos dados referentes aos receptores dividiremos a seção de resultados em duas partes. Inicialmente descreveremos os resultados para o domínio 2 do VEGFR3, e posteriormente, para o domínio 2 do VEGFR1.

4.1 - VEGFR3-D2

4.1.1 – Expressão do domínio 2 do VEGFR3 em meio LB e M9

Os testes de expressão do domínio 2 do VEGFR-3 foram realizados em meio LB, e posteriormente, em meio mínimo visando a produção da proteína marcada isotopicamente com ¹⁵N e ¹³C para os estudos estruturais por RMN. Inicialmente foram avaliados dois parâmetros: temperatura e concentração de indutor. A expressão do VEGFR3-D2 foi realizada a 18°C, 25°C e 37°C utilizando duas concentrações diferentes de IPTG: 0,2 e 1 mM. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliação da expressão total de proteínas em cada uma das condições testadas (Figura 17).



Figura 17: SDS-PAGE 15% do teste de expressão do VEGFR3-D2 em meio LB em diferentes condições.

Em (A) o teste de expressão foi realizado com 0,2 mM de IPTG e em (B) com 1,0 mM de IPTG nas temperaturas de 18°C, 25°C e 37°C, respectivamente. Para efeitos comparativos os géis foram normalizados pela concentração de proteína (10 µg de proteína em cada fração). (PM) Padrão de peso molecular; alíquotas retiradas: (1) antes da indução da expressão, (2) 1 h após indução, (3) 2 h após indução, (4) 3 h após indução, (5) 4 h após indução, (6) 16 h após indução. A seta evidencia a expressão da proteína VEGFR3-D2 na massa molecular esperada (11,89 kDa).

Os resultados mostraram a maior expressão do VEGFR3-D2 nas temperaturas de 25 e 37°C não sendo observadas diferenças significativas independente da concentração de IPTG utilizada na etapa de indução. Entretanto, o mesmo resultado não foi observado para a temperatura de 18°C que mostrou baixa expressão da proteína quando induzida com 0,2 mM de IPTG e uma maior produção da mesma quando induzida com 1 mM do indutor (Figura 16).

Para avaliar a presença do VEGFR3-D2 nas frações solúvel e insolúvel, o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado após a lise celular (Figura 18).



Figura 18: SDS-PAGE 15% do teste de expressão do VEGFR3-D2 em meio LB em diferentes condições após lise celular.

Os resultados mostram o teste de expressão realizado com 0,2 mM de IPTG (A) e 1,0 mM de IPTG (B) nas temperaturas de 18°C, 25°C e 37°C, respectivamente. Para efeitos comparativos os géis foram normalizados pela concentração de proteína (10 µg de proteína em cada fração). (PM) Padrão de peso molecular; as alíquotas no gel representam a fração solúvel e insolúvel, respectivamente: (1 e 2) antes da indução da expressão, (3 e 4) 1 h após indução, (5 e 6) 2 h após indução, (7 e 8) 3 h após indução, (9 e 10) 4 h após indução, (11 e 12) 16 h após indução. A seta evidencia a expressão da proteína VEGFR3-D2 na massa molecular esperada (11,89 kDa).

Os resultados mostraram que a expressão do VEGFR3-D2 manteve o perfil anterior. A expressão da proteína a 18°C só é observada quando a indução é realizada com 1 mM de IPTG. Vale ressaltar que a melhor condição de expressão do VEGFR3-D2 tanto na fração solúvel quanto na insolúvel foi encontrada para as temperaturas de 25 e 37°C independente da concentração de indutor. Desta forma, visando o menor custo de produção do VEGFR3-D2, decidimos que a melhor condição de expressão da proteína seria a 25°C ou 37°C com 0,2 mM de IPTG. Quanto a temperatura de crescimento, a literatura mostra que a produção destes receptores de VEGF geralmente estão nas frações insolúveis, ou seja, nos corpos de inclusão, necessitando assim, de protocolos de *refolding* para a obtenção da proteína. Assim, escolhemos adotar a temperatura de 37°C para o crescimento bacteriano evitando que parte da produção proteica esteja presente na fração solúvel, como evidenciado no SDS-PAGE 15% (Figura 17-25°C). Ao compararmos a expressão da proteína ao longo do tempo é possível verificar que os melhores tempos de indução ocorrem após as 4 h e 16 h. Como não foi observada diferença significativa na produção da proteína de interesse entre os dois tempos avaliados, para a otimização no processo de expressão proteica, o tempo de 4 h após a indução foi escolhido como padrão.

Assim, a melhor condição de expressão do VEGFR3-D2 em LB foi o crescimento celular em *E. coli* BL21(DE3) a 37°C e adição de 0,2 mM de IPTG em D.O_{600nm} de 0,7 para indução da expressão por 4 h.

Como pontuado anteriormente, um dos objetivos deste trabalho consiste na determinação estrutural e da dinâmica do domínio 2 do VEGFR3 por RMN, visto que sua estrutura possui baixa resolução atômica (Leppänen *et al.*, 2013). Para isto, a proteína precisa ser isotopicamente marcada e sua produção realizada em meio mínimo (M9). Dessa forma, os testes de expressão do VEGFR3-D2 foram realizados seguindo a metodologia empregada para os testes de expressão em LB. Os testes de expressão do VEGFR3-D2 em M9 das proteínas totais (Figura19) e da concentração de proteína na fração solúvel e insolúvel após a lise (Figura 20) foram realizados em diferentes temperaturas e concentração de IPTG.



Figura 19: SDS-PAGE 15% do teste de expressão do VEGFR3-D2 em meio mínimo em diferentes condições

Em (A) o teste de expressão foi realizado com 0,2 mM de IPTG e em (B) com 1,0 mM de IPTG nas temperaturas de 18°C, 25°C e 37°C, respectivamente. Para efeitos comparativos os géis foram normalizados pela concentração de proteína (10 µg de proteína em cada fração). (PM) Padrão de peso molecular; alíquotas retiradas: (1) antes da indução da expressão, (2) 1 h após indução, (3) 2 h após indução, (4) 3 h após indução, (5) 4 h após indução, (6) 16 h após indução. A seta evidencia a expressão da proteína VEGFR3-D2 na massa molecular esperada (11,89 kDa).

Os resultados mostraram que a indução com 1mM de IPTG promove a super expressão do VEGFR3-D2 em todas as temperaturas testadas, enquanto que a indução com 0,2 mM de IPTG mostrou expressão proteica somente a 37°C. Cabe ressaltar que os melhores tempos foram observados após a indução por 4 e 16 h, exceto para a expressão da proteína a 37°C induzida com 1 mM de IPTG que se mostrou parecida a partir de 2h de indução.

Para avaliar a concentração do VEGFR3-D2 nas frações solúvel e insolúvel foi realizada a lise celular e os resultados indicaram o mesmo perfil observado para as proteínas totais (Figura 20).



Figura 20: SDS-PAGE 15% do teste de expressão do VEGFR3-D2 em meio LB em diferentes condições após lise celular.

Os resultados mostram o teste de expressão realizado com 0,2 mM de IPTG (A) e 1,0 mM de IPTG (B) nas temperaturas de 18°C, 25°C e 37°C, respectivamente. Para efeitos comparativos os géis foram normalizados pela concentração de proteína (10 µg de proteína em cada fração). (PM) Padrão de peso molecular; as alíquotas no gel representam a fração solúvel e insolúvel, respectivamente: (1 e 2) antes da indução da expressão, (3 e 4) 1 h após indução, (5 e 6) 2 h após indução, (7 e 8) 3 h após indução, (9 e 10) 4 h após indução, (11 e 12) 16 h após indução. A seta evidencia a expressão da proteína VEGFR3-D2 na massa molecular esperada.

Cabe ressaltar que a expressão a 25°C e a 37°C utilizando 1 mM de IPTG para indução da expressão do VEGFR3-D2 foram muito similares. Entretanto, com o objetivo de diminuir os custos adotamos como a melhor condição de expressão do VEGFR3-D2 em meio mínimo o crescimento a 37°C com a adição de 0,2 mM de IPTG em D.O_{600nm} de 0,7 e indução da expressão por 4 h.

4.1.2 – Lise celular: fração solúvel do VEGFR3-D2

Apesar da literatura indicar a utilização de *refolding* para a produção destes receptores, os nossos resultados mostraram que era possível obter parte da proteína na fração solúvel. Sendo assim, iniciamos a produção do VEGFR3-D2 a partir da fração solúvel da lise celular visando facilitar as etapas posteriores para obtenção da proteína. Desta forma, testamos diversos protocolos de lise celular, sendo o melhor resultado observado para o método que combinava a ação da lisozima associada à lise celular realizada em sonicador (Figura 21).



Figura 21: SDS-PSGE 15% de lise celular e tratamento da fração solúvel de VEGFR3-D2.

SDS-PAGE 15% da lise celular realizada utilizando lisozima seguida por etapas de sonicação. Este gel mostra o padrão de peso molecular (PM), a fração solúvel (1), fração insolúvel (2) na presença de lisozima. No gel foram aplicados 20 µL das amostras (1) e (2). A seta mostra a região no peso molecular esperado para o VEGFR3-D2 (11,89 kDa).

Apesar do baixo rendimento do VEGFR3-D2 na fração solúvel decidimos prosseguir com a purificação, uma vez que, a obtenção da proteína nessas condições evita a utilização das técnicas de *refolding* ao longo da produção do VEGFR3-D2.

4.1.3 – Purificação do VEGFR3-D2 a partir da fração solúvel

A partir da lise celular, a fração solúvel contendo o VEGFR3-D2 foi submetida ao primeiro passo de purificação que consistiu em uma cromatografia de afinidade a níquel com eluição por degrau de imidazol (Figura 22).



Figura 22: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da purificação da fração solúvel de VEGFR3-D2 através de cromatografia de afinidade à níquel

Em (A) o cromatograma referente à purificação do VEGFR3-D2 através de cromatografia de afinidade a níquel e em (B) SDS-PAGE 15 % mostrando o padrão de peso molecular (PM) e as alíquotas coletadas ao longo do pico de eluição (1 até 10), contendo 20 µL cada. A seta mostra a região no peso molecular esperado para VEGFR3-D2 (11,89 kDa).

Os dados mostraram um pico único de eluição no cromatograma da purificação e as alíquotas correspondentes a esse pico quando monitoradas via SDS-PAGE 15% mostraram que o VEGFR3-D2 saem nas frações 8, 9 e 10, sendo esta última, bem mais pura do que as outras duas. Estas amostras foram aplicadas em uma cromatografia de exclusão molecular sendo este o segundo passo de purificação (Figura 23).



Figura 23: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da purificação da fração solúvel do VEGFR3-D2 através de cromatografia de exclusão molecular.

Em (A) o cromatograma referente à purificação do VEGFR3-D2 através de cromatografia por exclusão molecular e em (B) SDS-PAGE 15% mostrando o padrão de peso molecular (PM) e as alíquotas coletadas correspondentes ao primeiro pico de eluição (1, 2 e 3) e o segundo pico (4, 5 e 6). A seta mostra a região no peso molecular esperado para VEGFR3-D2.

O cromatograma evidenciou dois picos distintos, sendo o pico 1 localizado no volume de eluição esperado para uma proteína de aproximadamente 12 kDa, como é o caso do VEGFR3-D2. Estes dados estão de acordo com a curva de calibração realizada para a cromatografia de exclusão molecular (vide seção 3.2.9).

O monitoramento dos picos evidenciou que o pico 1 corresponde a fração de eluição da proteína VEGFR3-D2, enquanto o pico 2 provavelmente diz respeito a eluição do imidazol presente na amostra e que sai após o volume total da coluna cromatográfica. A amostra obtida ao final do protocolo de purificação estava na concentração de 20 µM.
4.1.4 – Avaliação do VEGFR3-D2 após a purificação por RMN unidimensional

Para verificar se o VEGFR3-D2 purificado estava enovelado foi realizado um espectro unidimensional de hidrogênio através de Ressonância Magnética Nuclear (Figura 24).



Figura 24: Espectro unidimensional da amostra solúvel de VEGFR3-D2.

O espectro unidimensional de RMN de hidrogênio do VEGFR3-D2 evidencia picos finos mostrando uma pequena variação de deslocamento químico geral, mas principalmente, na região amídica (10 a 8 ppm) o que não condiz com uma proteína enovelada de 12 kDa.

O espectro obtido evidencia uma baixa dispersão de deslocamento químico, principalmente na região amídica. Além disso, não é possível observar sinais abaixo de 0 ppm que são específicos de hidrogênios de cadeias alifáticas próximas espacialmente a hidrogênios de cadeias laterais de aminoácidos aromáticos, o que daria indícios de proteína enovelada. Desta forma, este resultado mostra que provavelmente a proteína VEGFR3-D2 solúvel não está enovelada, sendo necessária a utilização da fração insolúvel para os estudos estruturais.

4.1.5 – Lise celular da fração insolúvel de VEGFR3-D2

A lise celular da fração insolúvel do domínio 2 de VEGFR3 foi realizada em três etapas: lise por sonicação seguida de duas lavagens com tampões distintos com o objetivo de retirar a proteína dos corpos de inclusão como também de lavar bem a fração que contém a proteína de interesse. Na primeira etapa, o precipitado celular proveniente do crescimento bacteriano é ressuspendido e lisado por sonicação por 15 minutos (lavagem 1), sendo em seguida centrifugado. Posteriormente, o precipitado formado é lavado com um novo tampão na presença do detergente triton X-100 e o quelante EDTA (lavagem 2). Após a centrifugação o novo precipitado é incubado em tampão desnaturante por 16 h (lavagem 3) para o desenovelamento total da proteína. As alíquotas das frações solúvel e insolúvel das etapas de lise celular e lavagens foram retiradas ao longo do processo e monitoradas por SDS-PAGE 15 % (Figura 25).



Figura 25: SDS-PAGE 15% da lise celular e tratamento da fração insolúvel do VEGFR3-D2.

SDS-PAGE 15% da lise celular das frações solúvel e insolúvel do VEGFR3-D2, respectivamente. As alíquotas aplicadas no gel correspondem ao padrão de peso molecular (PM) e as diferentes lavagens às quais a fração insolúvel contendo a proteína foi submetida. A lavagem 1 (1 e 2) é referente ao tratamento do precipitado após o crescimento bacteriano com tampão Tris-Cl, pH 8,0 e sonicação por 15 minutos; a lavagem 2 (3 e 4) se refere ao tratamento do precipitado após a lavagem 1 com o mesmo tampão na presença do detergente triton X-100 e do quelante EDTA e a lavagem 3 (5 e 6) se refere a solução desnaturante contendo 8 M de ureia e 5 mM de β -mercaptoetanol. Foram aplicados no gel 20 μ L de cada amostra. A seta indica a massa molecular esperada para o VEGFR3-D2 (11,89 kDa)

Os dados mostraram que a proteína VEGFR3-D2 está presente em maior concentração, em solução, após a terceira lavagem quando a condição desnaturante foi

utilizada. Sendo assim, esta amostra foi a escolhida para os passos seguintes, relacionados às etapas de purificação e *refolding*.

4.1.6 – Purificação do VEGFR3-D2 a partira da fração insolúvel

Para obtenção de uma amostra do VEGFR3-D2 homogênea e com alto grau de pureza foram realizadas 3 etapas distintas de purificação. Cabe ressaltar que as etapas de purificação e *refolding* do VEGFR3-D2 já haviam sido descritas anteriormente pelo grupo colaborador (Redondo, 2017 – USP).

A primeira etapa de purificação foi realizada através de uma cromatografia de afinidade a níquel, utilizando como extrato bruto a amostra desnaturada presente na fração solúvel da lavagem 3 (Figura 26).



Figura 26: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da primeira etapa de purificação da fração insolúvel do VEGFR3-D2 através de cromatografia de afinidade a níquel.

Em (A) podemos observar o cromatograma mostrando 2 picos de eluição referentes a purificação do VEGFR3-D2 através de cromatografia de afinidade a níquel (gráfico em azul) e em (B) SDS-PAGE 15 % mostrando o padrão de peso molecular (PM) e as alíquotas coletadas referentes ao pico 1 (1 até 4) e pico 2 (5 até 12). As amostras contém um volume de 20 µL cada. A seta indica a região no peso molecular esperado para VEGFR3-D2.

O cromatograma indicou a presença de dois picos distintos. Estes quando monitorados por SDS-PAGE mostraram que a proteína de interesse está presente em alta concentração no pico 2, o que foi evidenciado nas frações de 5 a 12 (Figura 25). Desta forma, as frações referentes ao pico 2 foram submetidas a uma dosagem proteica, e em seguida, à segunda etapa do processo de obtenção da proteína, que consiste no *refolding* do VEGFR3-D2.

De acordo com o protocolo de *refolding* previamente estabelecido é necessário saber a concentração total do VEGFR3-D2 em solução para que esta seja gotejada lentamente em tampão de *Refolding* (20 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,3; 50 mM de NaCl e 5 mM de β -mercaptoetanol) na proporção de 50 µg de proteína por mililitro de tampão. Cabe ressaltar que as primeiras tentativas de *refolding* usando este protocolo não foram satisfatórias. Sendo assim, modificações nos tampões de *refolding* foram realizadas no intuito de evitar a precipitação imediata da proteína como também em aumentar a quantidade de proteína enovelada. Após o protocolo de *refolding* a proteína é submetida a uma nova etapa de purificação por cromatografia de afinidade a níquel (Figura 27).



Figura 27: Cromatografia e SDS-PAGE 15% da segunda etapa de purificação do VEGFR3-D2 após os diferentes protocolos de *refolding*

Cromatogramas e SDS-PAGE 15% dos diferentes protocolos de *refolding* utilizados para a proteína VEGFR3-D2. Em (A) o *refolding* foi realizado em 20 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,3; 50 mM de NaCl e 5 mM de β -Mercaptoetanol (tampão de *refolding*). Em (B) foi utilizado o tampão de *refolding* com a adição de 0,1% de deoxicolato de sódio. Em (C) foi utilizado o tampão de *refolding* com a adição de 0,2% de SDS e em (D) tampão de *refolding* com a adição de 50 mM dos aminoácidos: arginina, ácido

glutâmico e glicina. No SDS-PAGE 15 % podemos observar o padrão de peso molecular (PM) e os números são as frações coletadas ao longo de cada pico de eluição presente nos diferentes cromatogramas. Foram aplicados no gel 20 µL de cada amostra. A seta indica a região no peso molecular esperado para VEGFR3-D2 (11,89 kDa).

Estes resultados mostraram que o VEGFR3-D2 foi purificado em todas as condições testadas, no entanto, o rendimento da proteína parece ter sido menor quando foi utilizado SDS 0,2 % e os aminoácidos arginina, ácido glutâmico e glicina (Figura tal C e D). No entanto para os protocolos A e B foi possível observar uma boa concentração da proteína de interesse. É importante ressaltar que dependendo da condição de *refolding* utilizada, os géis indicaram a presença de uma banda em aproximadamente 24 kDa, podendo ser esta o dímero deste receptor (Figura 26). A literatura descreve o aparecimento de estados oligoméricos para estes receptores após o *refolding*, inclusive para a fração solúvel (Redondo, 2017 - USP).

Sendo assim, para avaliar se a proteína VEGFR3-D2 estava enovelada nos diferentes protocolos de *refolding* foi necessária a análise estrutural através de RMN. Outros ensaios estruturais como fluorescência intrínseca do triptofano não foram possíveis devido a já conhecida exposição dos resíduos de triptofanos destes receptores para o solvente.

4.1.7 – Avaliação dos protocolos de refolding do VEGFR3-D2 por RMN unidimensional

Como mencionado anteriormente, para darmos prosseguimento aos estudos estruturais é necessário marcar isotopicamente com ¹⁵N e ¹³C do VEGFR3-D2. Para isto é de extrema importância implementar um protocolo de *refolding* e purificação que seja reprodutível. Desta forma, após os resultados anteriores, as amostras de cada uma das purificações foram concentradas e analisadas por RMN. As amostras contendo aproximadamente 20 μ M foram submetidas a experimentos unidimensionais de hidrogênio para avaliar o perfil de enovelamento proteico (Figura 28).



Figura 28: Espectros unidimensionais de Hidrogênio dos protocolos de Refolding do VEGFR3-D2.

O espectro unidimensional de RMN de hidrogênio do VEGFR3-D2 mostra a variação de deslocamento químico e o perfil da proteína em diferentes protocolos de refolding. Em (A) tampão de *refolding*, em (B) foi utilizado o tampão de *refolding* com a adição de 0,1% de deoxicolato de sódio. Em (C) foi utilizado o tampão de *refolding* com a adição de 0,2% de SDS e em (D) tampão de *refolding* com a adição de 50 mM dos aminoácidos: arginina, ácido glutâmico e glicina. Os espectros evidenciam picos finos e uma baixa dispersão de deslocamentos químicos o que não condiz com uma proteína enovelada.

Os espectros obtidos evidenciam uma baixa dispersão de deslocamento químico, em especial, na região amídica, o que demonstra que o VEGFR3-D2 está desenovelado. Da mesma forma que foi observado para o espectro unidimensional de ¹H da fração solúvel, não há sinais abaixo de 0 ppm exceto para o primeiro protocolo onde vemos um pequeno pico nesta região, no entanto, apesar de ser o espectro em que há a maior dispersão de deslocamento químico quando comparado aos outros, ainda assim é muito baixa para a proteína de interesse. Desta forma, este resultado mostra que a proteína VEGFR3-D2 proveniente da fração insolúvel não estava enovelada, mesmo com a utilização de diferentes protocolos de *refolding* (dados não mostrados) sendo necessária uma nova avaliação da clonagem deste receptor.

Assim, para dar prosseguimento ao foco deste trabalho que tem como objetivo estudar a interação de um peptídeo anti-VEGF com os receptores de VEGF, decidimos investir no domínio 2 do VEGFR1.

4.2 – VEGFR1**-**D2

4.2.1 - Expressão do VEGFR1-D2 em meio mínimo marcado com ¹⁵N

A expressão do domínio 2 do VEGFR1 em meio mínimo para estudos estruturais já foi previamente reportada na literatura (Starovasnik *et al.*, 1999; Redondo, 2017). Dessa forma, seguimos o protocolo descrito no qual a expressão do VEGFR1-D2 em meio mínimo marcado isotopicamente com ¹⁵N foi realizada com o crescimento celular utilizando a cepa *E. coli* BL21(DE3) a 37°C com a adição de 1 mM de IPTG em D.O_{600nm} de 0,6 e indução da expressão por 4 h (Figura 29).



Figura 29: SDS-PAGE 15% da expressão de VEGFR1-D2 em meio mínimo marcado com¹⁵N SDS-PAGE mostrando a expressão do VEGFR1-D2 realizada a 37°C com adição de 1 mM de IPTG em D.O_{600nm} 0,6. (PM) Padrão de peso molecular; (1 e 2) amostra antes de induzir e (3 e 4) após a indução por 4 h. Cada fração contém 20 μL de amstra. A seta evidencia a expressão da proteína VEGFR3-D2 na massa molecular esperada.

Os resultados indicaram que a proteína VEGFR1-D2 é altamente expressa após às 4 h de indução, sendo este o protocolo adotado para a produção deste receptor para os estudos estruturais e de interação.

4.2.2 – Lise celular do VEGFR1-D2

A lise celular do VEGFR1-D2 foi realizada por sonicação e incubação por 16 h em tampão desnaturante (PBS, pH 7,8 com adição de 8 M uréia e 10 mM de βmercaptoetanol). Após esse período, as porções solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação e as amostras monitoradas por SDS-PAGE 15% (Figura 30).



Figura 30: SDS-PAGE 15% da lise celular do VEGFR1-D2 na presença de ureia.

SDS-PAGE 15% da lise celular do VEGFR1-D2 por sonicação e tampão desnaturante. Este gel mostra o padrão de peso molecular (PM), a fração solúvel após a desnaturação (2) e a fração insolúvel (3). As frações contém 20 µL cada. A seta mostra a região no peso molecular esperado para o VEGFR1-D2.

Conforme o esperado, o resultado da lise celular na presença de tampão desnaturante mostrou uma grande quantidade da proteína de interesse na fração solúvel, mas também na fração insolúvel. Entretanto, a proteína presente na fração solúvel é suficiente para os estudos estruturais propostos para este trabalho. Desta forma foi possível iniciar as etapas de purificação e *refolding* para este receptor.

4.2.3 – Purificação e refolding do VEGFR1-D2 marcado com 15N

Após a expressão e lise celular, o extrato bruto contendo o VEGFR1-D2 foi submetido a uma primeira etapa de purificação por cromatografia de afinidade a níquel

com eluição da proteína por redução de pH. Em seguida, foi realizado o processo de *refolding* e mais duas etapas de purificação: cromatografia de afinidade a níquel com eluição isocrática do VEGFR1-D2 e cromatografia de exclusão molecular.

Na primeira etapa de purificação por cromatografia de afinidade à níquel, o extrato bruto contendo o VEGFR1-D2 desenovelado é aplicado na coluna, lavado e eluído por redução no pH (Figura 31).



Figura 31: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da primeira etapa de purificação do VEGFR1-D2 por cromatografia de afinidade à níquel

Em (A) podemos observar o cromatograma mostrando um pico de eluição bem definido que corresponde a eluição do VEGFR1-D2 que foi realizada em xx mM de tampão acetado de sódio, pH 3,0 na presença de 8M de ureia e β-mercaptoetanol através da purificação por cromatografia de afinidade a níquel. Em (B) SDS-PAGE 15 % mostrando o padrão de peso molecular (PM) e as frações coletadas referentes ao pico de eluição (1 a 8). As frações contêm 20 µL de amostra cada. A seta indica a região no peso molecular esperado para VEGFR1-D2 (12,72 kDa).

A análise do gel de eletroforese mostrou que houve o enriquecimento do VEGFR1-D2 nas frações coletadas, entretanto, ainda é possível observar a presença de alguns contaminantes de alto peso molecular. É importante pontuar que as amostras aplicadas no gel se mostraram arrastadas durante a corrida de eletroforese devido ao baixo pH das amostras o que acabou interferindo na distribuição homogênea das mesmas.

As amostras enriquecidas com o VEGFR1-D2 foram reunidas para iniciar uma das etapas mais importantes de todo o processo de obtenção da proteína de interesse que é a etapa de *refolding*, que é a retirada da ureia e do β -mercaptoetanol da amostra. Este passo foi realizado através de protocolos previamente descritos na literatura para o

VEGFR1-D2 (Starovasnil *et al.*, 1999; Redondo, 2017), mas com pequenas modificações realizadas pelo nosso grupo. Esta etapa consistiu, inicialmente, na retirada da ureia através da diluição lenta da amostra proveniente da primeira etapa de purificação, em banho de gelo, na proporção de 50 μ g de proteína por mililitro de tampão de *refolding* (tampão PBS, pH 8,0 com adição de 10 mM de β -mercaptoetanol e 0,05 mM EDTA), o que levou a um grande volume de solução ao final do processo. Desta forma, foi necessário dividir a amostra para que a mesma fosse purificada sem perdas excessivas do VEGFR1-D2.

Após o processo de *refolding* parcial aproximadamente 1/3 da solução (330, 330 e 340 mL) foi submetida à cromatografia de afinidade a níquel divididas em três purificações distintas, todas realizadas ao mesmo dia. Dessa forma, somente nesta etapa foi retirado o β -mercaptoetanol e resquícios de uréia presentes na amostra levando ao total reenovelamento do VEGFR1-D2. Após a lavagem o VEGFR1-D2 foi eluído com 800 mM de Imidazol. Cabe ressaltar que os perfis cromatográficos das purificações seguiram o mesmo padrão (Figura 32).





Em (A) podemos observar o cromatograma mostrando um pico de eluição bem definido que corresponde a eluição do VEGFR1-D2 que foi realizada em tampão PBS, pH 8,0 na presença de 800 mM de imidazol através da purificação por cromatografia de afinidade a níquel. Em (B) SDS-PAGE 15 % mostrando o padrão de peso molecular (PM) e as frações coletadas referentes a lavagem com tampão PBS pH 8,0 (1 a 3) e ao pico de eluição (4 a 9) quando na presença do imidazol. As frações aplicadas no gel contem 20 µL cada. A seta indica a região no peso molecular esperado para VEGFR1-D2 (12,72 kDa).

Apesar do enriquecimento do VEGFR1-D2, ainda é possível observar a presença de contaminantes de maior peso molecular nas alíquotas de eluição, o que pode ser associado às frações oligoméricas deste receptor já previamente descritas na literatura (Redondo, 2017). Sendo assim, utilizamos uma terceira etapa de purificação através de cromatografia de exclusão molecular para separar os estados oligoméricos do VEGFR1-D2 (Figura32 A). Ao final da cromatografia de exclusão molecular foi observado um pico único de eluição no volume esperado para uma proteína de aproximadamente 12 kDa. As alíquotas referentes a esse pico foram reunidas e concentradas em uma única amostra no qual tivemos um rendimento final de 100 µM em 500 µL de VEGFR1-D2 (Figura 33 B).



Figura 33: Cromatograma e SDS-PAGE 15% da terceira etapa de purificação do VEGFR1-D2 após o refolding por cromatografia de exclusão molecular

Em (A) podemos observar o cromatograma mostrando um pico bem definido que corresponde ao VEGFR1-D2 no estado monomérico por cromatografia de exclusão molecular. Em (B) SDS-PAGE 15 % mostrando o padrão de peso molecular (PM) e as frações coletadas e concentradas referentes ao pico presente no cromatograma (2). As frações aplicadas no gel contem 20 µL cada. A seta indica a região no peso molecular esperado para VEGFR1-D2 (12,72 kDa).

Sendo assim, para avaliar se a proteína VEGFR1-D2 estava enovelada após o protocolo de *refolding* foi necessária a análise estrutural através de RMN.

4.2.4 – Avaliação do refolding do VEGFR1-D2 por RMN

Para os estudos de interação do VEGFR3-D2 com o peptídeo anti-VEGF previamente selecionado pelo grupo do Prof. Ricardo Giordano é necessário que a proteína esteja isotopicamente marcada com ¹⁵N e que a mesma possua sua estrutura nativa. Desta forma, a amostra foi submetida a experimentos unidimensionais de hidrogênio e bidimensionais editados para ¹⁵N para avaliar o perfil de enovelamento proteico (Figura 34).



Figura 34: Espectro unidimensional de VEGFR1-D2

O espectro unidimensional de RMN de hidrogênio do VEGFR1-D2 evidencia picos bem definidos e uma grande dispersão de deslocamento químicol, mas principalmente, na região amídica (10 a 8 ppm) o que condiz com uma proteína enovelada de aproximadamente 13 kDa.

O espectro mostrado acima evidencia uma grande dispersão de deslocamento químico, principalmente na região amídica. Além disso, é possível observar sinais abaixo de 0 ppm que são específicos de hidrogênios de cadeias alifáticas próximas espacialmente a hidrogênios de cadeias laterais de aminoácidos aromáticos, o também caracteriza uma proteína enovelada. Desta forma, demos prosseguimento aos nossos estudos utilizando a amostra proteína enovelada de VEGFR1-D2.

4.6 – Estudos de interação: ¹H-¹⁵N HSQC de VEGFR1-D2 livre

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹H-¹⁵N HSQC, também descrito como a impressão digital de uma proteína, mostra as correlações dos hidrogênios ligados covalentemente a nitrogênios (¹H-¹⁵N) ao longo da cadeia polipeptídica. Assim, este espectro é capaz de mostrar um pico para cada aminoácido da proteína, com exceção das prolinas, que não possuem hidrogênios amídicos. É importante ressaltar que neste espectro também são observadas as correlações ¹H-¹⁵N presentes em cadeias laterais de alguns aminoácidos, como: triptofanos, argininas, asparaginas e glutaminas. A ampla dispersão de deslocamento químico de um espectro ¹H-¹⁵N HSQC indica que a proteína possui estrutura enovelada sendo possível determiná-la por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Yee et al, 2005).

O espectro do domínio 2 do VEGFR1 isotopicamente marcado com ¹⁵N foi adquirido em um espectrômetro Bruker Avance 800 MHz, na concentração de 100 μ M, em tampão PBS pH 5,7 (Figura 35) e 7,3 (Figura 36) com adição de 0,05 mM EDTA, ambos a 25°C.



Figura 35: Espectro ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 obtido em pH 5,7 a 25°C em espectrômetro Bruker Avance 800 MHz.

O espectro ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 mostrou grande dispersão de deslocamento químico, revelando que a proteína se encontra enovelada após as técnicas de purificação associadas ao protocolo de *Refolding*. Existe uma pequena sobreposição das ressonâncias, principalmente, no centro do espectro entre 8,0 e 9,0 ppm devido a massa molecular da proteína. A concentração final da proteína foi de 100 μ M em tampão PBS com adição de 0,05 mM de EDTA pH 5,7 a 25°C na presença de 10% de D₂O. As letras e números indicam o assinalamento dos aminoácidos presentes na sequência primária do domínio 2 do VEGFR1.



Figura 36: Espectro ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 obtido em pH 7,3 a 25°C em espectrômetro Bruker Avance 800 MHz.

O espectro ${}^{1}\text{H}{-}{}^{15}\text{N}$ HSQC do VEGFR1-D2 mostrou grande dispersão de deslocamento químico mostrando que a proteína se encontra enovelada após as técnicas de purificação associadas ao protocolo de *Refolding*. Existe uma pequena sobreposição das ressonâncias, principalmente, no centro do espectro entre 8,0 e 9,0 ppm devido a massa molecular da proteína. A concentração final da proteína foi de 100 μ M em tampão PBS com adição de 0,05 mM de EDTA pH 7,3 a 25°C na presença de 10% de D₂O. As letras e números indicam o assinalamento dos aminoácidos presentes na sequência primária do domínio 2 do VEGFR1.

Os espectros do VEGFR1-D2 nos dois diferentes pHs apresentaram grande dispersão de deslocamento químico indicando que a proteína está enovelada e pronta para os estudos de interação com o peptídeo anti-VEGF (DGAPCAIWF). O assinalamento do VEGFR1-D2 nos dois pHs foi realizado conforme assinalamento previamente publicado (apenas para pH 5,7) para este receptor (Starovasnik, M.A et al., 1999).

Dos 101 aminoácidos presentes na estrutura primária do VEGFR1-D2, em pH 5,7 somente os resíduos de Ser129, Asp130, Ser140 e as 6 prolinas não foram assinalados no espectro. Em pH 7,3 foi observada uma pequena diminuição do número de picos, o que já é esperado em pHs acima de 6,0 para a região amídica devido a troca com a água, mesmo assim, somente os resíduos de Ser129, Asp 130, Thr 131, Gly151 e Asn 212 e as prolinas não foram assinalados (Figura tal e tal).

Desta forma, com o assinalamento do VEGFR1-D2 realizado foi possível iniciar os estudos de interação com o peptídeo anti-VEGF (DGAPCAIWF).

4.3 – Assinalamento do peptídeo anti-VEGF: (DGA)PCAIWF

Os peptídeos inibidores de VEGFR3, PCAIWF e WVCSGG, foram identificados através de *phage display* por Giordano e colaboradores (Michaloski et al., 2016). Estudos mostraram que o peptídeo sintético PCAIWF possui atividade antiangiogênica, sendo capaz de reduzir a vasculogênese em animais com retinopatia induzida (Michaloski *et al.*, 2016). Além disso, este peptídeo mostrou a capacidade de inibir a ligação dos VEGFs aos seus receptores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) sugerindo a existência de um sítio de interação comum aos membros da família de RTKs classe V. Desta forma, o estudo estrutural dos mecanismos de interação entre o peptídeo PCAIWF e os diferentes VEGFRs podem levar ao desenvolvimento de peptidomiméticos.

O peptídeo sintético PCAIWF nos foi enviado para os estudos de interação com os receptores VEGFR1-D2 e VEGFR3-D2 através de uma colaboração com o Prof. Ricardo Giordano da USP. Entretanto, ensaios prévios indicaram a impossibilidade dos ensaios com este peptídeo devido à insolubilidade do mesmo. Para diminuir este problema, o grupo sintetizou o peptídeo com a adição de 3 resíduos de aminoácidos na região N-terminal (DGA)PCAIWF tornando assim, o peptídeo mais solúvel. Ensaios biológicos realizados pelo grupo do prof. Ricardo Giordano indicaram que o novo peptídeo se manteve ativo (dados não mostrados) não apresentando problemas quanto a atividade anti-angiogênica e solubilidade (Redondo, 2017).

O peptídeo (DGA)PCAIWF mostrou-se solúvel em concentrações acima de 3 mM o que é ótimo para os estudos de assinalamento e interação deste com os receptores de VEGF por RMN (Figura 37). Sendo assim, experimentos homonucleares ¹H-¹H TOCSY (Figura 38) e NOESY (dados não mostrados) foram realizados para o assinalamento do peptídeo (DGA)PCAIWF nos pHs 5,7 e 7,3.



Figura 37: Espectro unidimensional do peptídeo DGAPCAIWF.

O espectro unidimensional de RMN de hidrogênio de DGAPCAIWF evidencia picos bem definidos e uma grande dispersão de deslocamento químico. Em (A) o espectro adquirido a pH 5,7 e em (B), em pH 7,3.



Figura 38: Espectro ¹H-¹H TOCSY do peptídeo (DGA)PCAIWF em pH 5,7 (rosa) e 7,3 (azul) a 25°C realizado em espectrômetro Bruker Avance 800 MHz.

Em (A) espectro ¹H-¹H TOCSY do peptídeo (DGA)PCAIWF e em (B) uma expansão da região dos hidrogênios alfa onde é possível observar picos finos e bem definidos em acordo com a concentração de peptídeo utilizada (3 mM). Os experimentos foram realizados em tampão PBS pH 5,7 (rosa) e 7,3 (azul) a 25°C na presença de 10% de D₂O. As letras e números indicam o assinalamento dos aminoácidos presentes na sequência primária do peptídeo. As setas indicam o aparecimento da duplicidade de alguns sistemas de spin em função do resíduo de prolina (cis-trans).

O peptídeo (DGA)PCAIWF foi totalmente assinalado nos dois diferentes pHs. Cabe ressaltar que foi observado o aparecimento duplicado de alguns sistemas de spin como o caso das duas alaninas e xxxx nos dois pHs, sendo mais pronunciado em pH 7,3. Em ambos pHs não foi possível observar o sistema de spin referente ao ácido aspártico 1. Isto pode ser explicado devido a ser o primeiro aminoácido presente no peptídeo.

4.4 – Interação de VEGFR1-D2 com DGAPCAIWF

Para os estudos de interação entre o peptídeo (DGA)PCAIWF e os receptores de VEGF é necessário que estes estejam enovelados. Entretanto, nossos dados indicaram que somente o VEGFR1-D2 estava enovelado corretamente, sendo este o único receptor a ser estudado na presença do peptídeo.

Para os estudos iniciais de interação o peptídeo (DGA)PCAIWF foi titulado em concentrações crescentes na presença do VEGFR1-D2 em pH 5,7 utilizando um espectrômetro Bruker 800 MHz. Este dado foi obtido pelo grupo do professor Ricardo Giordano da Universidade de São Paulo (Figura 39).



Deslocamento químico¹ H (ppm)

Figura 39: Região expandida do espectro ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 durante a titulação em concentrações crescentes do peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF.40

O espectro mostra a sobreposição dos ¹H-¹⁵N HSQCs do VEGFR1-D2 na presença de concentrações crescentes de (DGA)PCAIWF em pH 5,7. A proporção proteína:peptídeo foi realizada da seguinte forma 1:0 (preto), 1:2 (roxo), 1:4 (verde), 1:6 (azul escuro), 1:8 (vermelho), 1:10 (azul claro), 1:12 (marrom) e 1:14 (rosa). Alguns picos não mostraram modificação em seu deslocamento químico (seta vermelha) enquanto outros picos mostram uma grande diferença de deslocamento (setas pretas) conforme o aumento da concentração de peptídeo indicando a interação entre peptídeo e proteína.

Os dados indicaram que alguns resíduos mostram diferenças de deslocamento químico grandes mesmo em baixas concentrações de peptídeo (1:2) mostrando assim que há a interação entre o VEGFR1-D2 e o peptídeo (DGA)PCAIWF. Outros picos no espectro não mostram diferenças de deslocamento químico indicando que a interação acontece em regiões específicas do receptor. Além disso, a condição de saturação não foi alcançada, mesmo a uma proporção 1:14 (proteína:peptídeo), pois alguns resíduos continuam apresentando variação de deslocamento químico mesmo nessa condição.

Com base nestes resultados, após o assinalamento do VEGFR1-D2 iniciamos o monitoramento dos resíduos do receptor que interagem com o peptídeo (DGA)PCAIWF

através da variação no deslocamento químico do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo na proporção 1:2 em diferentes pHs utilizando experimentos ¹H-¹⁵N HSQC (Figura 40).



Figura 40: Espectro ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF (1:2) em pH 5,7

Em (A) o espectro ¹H-¹⁵N HSQC de 100 µM do VEGFR1-D2 livre (azul) e ligado à 200 µM do peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF (rosa) em pH 5,7. Os espectros mostram boa dispersão de deslocamento químico e pouca ou nenhuma variação de deslocamento químico na condição utilizada (1:2). Em (B) podemos observar o gráfico de variação de deslocamento químico para cada resíduo do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo. A linha mostra o corte onde valores significativos são observados acima de 0,004 ppm. Em (A) e (B) estão destacados os resíduos que obtiveram a maior perturbação de deslocamento químico, com círculos azuis e estrelas vermelhas, respectivamente.

Para a análise dos dados, em pH 5,7, definimos como interação proteínapeptídeo significativa uma variação mínima de valores acima de 0,004 ppm (3,4 Hz). Este valor mínimo é calculado a partir da média dos valores de variação de deslocamento químico somado ao desvio-padrão desta série de dados. Sendo assim, estes dados mostram que não houve grandes perturbações no deslocamento químico dos resíduos de VEGFR1-D2 na presença do peptídeo nesta condição testada. Isso pode ser comprovado pela sobreposição quase perfeita dos dois espectros ¹H-¹⁵N HSQC da proteína livre e ligada ao peptídeo (Figura 39A). Entretanto, três resíduos apresentaram variação de deslocamento químico significativa, a destacar: Ile 202, Cys 207 e His 223. Entretanto, os resíduos destacados estão em regiões do espectro que contêm forte sobreposição podendo gerar resultados errados em função da baixa concentração de peptídeo utilizada para o ensaio. Este mesmo experimento foi realizado em condições idênticas aquelas descritas acima exceto pelo pH 7,3 mais próximo do pH fisiológico (Figura 41).



Figura 41: Espectro ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF (1:2) em pH 7,3

Em (A) o espectro ¹H-¹⁵N HSQC de 100 µM do VEGFR1-D2 livre (azul) e ligado à 200 µM do peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF (rosa) em pH 7,3. Os espectros mostram boa dispersão de deslocamento químico e uma variação de deslocamento químico mais significativa para alguns resíduos na condição utilizada (1:2). Em (B) podemos observar o gráfico de variação de deslocamento químico para cada resíduo do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo. A linha mostra o corte onde valores significativos são observados acima de 0,012 ppm (9,6 Hz). Em (A) e (B) estão destacados os resíduos que obtiveram a maior perturbação de deslocamento químico, com círculos azuis e estrelas vermelhas, respectivamente.

A partir da sobreposição dos espectros ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 livre e ligado, em pH 7,3, definimos como interação significativa uma variação mínima de valores acima de 0,012 ppm (9,6 Hz). Este valor mínimo foi calculado da mesma forma usada anteriormente. Em pH 7,3 foi possível observar maiores perturbações no deslocamento químico dos resíduos de VEGFR1-D2 na presença do peptídeo do que quando comparado com o pH 5,7. Isso pode ser observado com a análise dos espectros ¹H-¹⁵N HSQC do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo onde alguns resíduos apresentaram modificações no valor de deslocamento químico, a saber: Glu 150, Ile 202, Gly 203, Gly 213, His 214, Leu 215 e Ile 229 (Figura 40 A e B).

4.5 – Monitoramento da interação do VEGFR1-D2 com o peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF com a utilização de Gadolínio

Uma vez identificados os resíduos do VEGFR1-D2 que sofrem modificações de deslocamento químico quando na presença do peptídeo anti-angiogênico é necessário avaliar quais desses resíduos interagem diretamente com o peptídeo (DGA)PCAIWF. Já que algumas variações de deslocamento químico geradas podem ocorrer devido a modificações conformacionais geradas pela adição de peptídeo e não especificamente pela ligação direta com o mesmo. Para isso, estudos específicos com sondas paramagnéticas, como o gadolínio vêm sendo reportados na literatura (Morel *et al.*, 1998; Rigault *et al.*, 2000; Morais *et al.*, 2016). Estes agentes paramagnéticos atuam modificando os parâmetros de relaxação da proteína de interesse.

O complexo a base de gadolínio, Gd (DTPA-BMA), utilizado para os experimentos, não possui carga, apresenta alta solubilidade em água e baixa afinidade específica de ligação à proteínas. Sendo assim, espera-se que na presença de gadolínio as taxas de relaxação da proteína aumentem e a intensidade dos picos obtidos no espectro que estejam expostos na superfície da proteína diminuam (Morais et al, 2016). Desta forma, os resíduos presentes na interface de ligação VEGFR1-D2/DGAPCAIWF não estarão acessíveis ao solvente, e assim, o seu sinal não será perturbado pela presença da sonda paramagnética. Ao comparar as intensidades de sinal geradas pelo espectro ¹H-¹⁵N HSQC do receptor livre e ligado na presença da sonda paramagnética, é possível distinguir os resíduos da interface de ligação VEGFR1-D2-DGAPCAIWF. Espera-se que nessa região ocorra uma maior alteração na intensidade do sinal (aumento de sinal, mais próximo de zero), enquanto os resíduos afetados pela ligação do peptídeo,

mas não localizados diretamente na interface apresentem uma leve alteração de sinal (aumento ou diminuição de sinal). Desta forma, experimentos de ¹H-¹⁵N HSQC foram realizados para o VEGFR-D2 livre e ligado ao DGAPCAIWF, ambos na presença de gadolínio (DTPA-BMA) nos pHs 5,7 (Figuras 42) e 7,3 (Figura 43).



Figura 42: Mapeamento da região de interação entre o VEGFR1-D2 e o peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF em pH 5,7 na presença de gadolínio.

Gráficos gerados a partir da avaliação da intensidade dos picos presentes no espectro ${}^{1}H{}^{-15}N$ HSQC do VEGFR1-D2 (100 μM) livre na presença de Gd (A) e ligado ao DGAPCAIWF (200 μM) na presença de Gd (B) em pH 5,7. Os eixos do gráfico mostram a diferença de intensidade nos espectros HSQC da proteína livre (A) e ligada (B) observadas em concentrações crescentes de Gd (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 mM) por resíduo do receptor, avaliados em unidades arbitrárias (a.u.). O esquema da estrutura secundária pode ser observado acima dos gráficos ilustrando as regiões da cadeia polipeptídica com formação de estrutura secundária em regiões de folha-β (quadrados/retângulos cinzas) e voltas ou dobras (linha preta).



Figura 43: Mapeamento da região de interação entre o VEGFR1-D2 e o peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF em pH 7,3 na presença de gadolínio.

Gráficos gerados a partir da avaliação da intensidade dos picos presentes no espectro ${}^{1}H{}^{-15}N$ HSQC do VEGFR1-D2 (100 μ M) livre na presença de Gd (A) e ligado ao DGAPCAIWF (200 μ M) na presença de Gd (B) em pH 7,3. Os eixos do gráfico mostram a diferença de intensidade nos espectros HSQC da proteína livre (A) e ligada (B) observadas em concentrações crescentes de Gd (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 mM) por resíduo do receptor, avaliados em unidades arbitrárias (a.u.). As regiões com maior variação de intensidade estão destacadas em círculos vermelhos. O esquema da estrutura secundária pode ser observado acima dos gráficos ilustrando as regiões da cadeia polipeptídica com formação de estrutura secundária em regiões de folha- β (quadrados/retângulos cinzas) e voltas ou dobras (linha preta).

Os resultados obtidos para este experimento indicaram que, em pH 5,7 não parece ter ocorrido interação entre a proteína e o peptídeo. Uma vez que os perfis de variação de intensidade observados para proteína livre e ligada (Figura 42 A e B, respectivamente) estão quase idênticos, não sendo observadas mudanças específicas na intensidade do sinal que pudesse caracterizar o monitoramento da interação entre proteína e peptídeo. Estes dados corroboram com aqueles observados anteriormente para as análises da variação do deslocamento químico para estas mesmas condições testadas (Figura 40 e 41).

Em pH 7,3 foi possível monitorar os resíduos que participam diretamente da interface de ligação proteína-peptídeo devido a diferença de intensidade dos picos nos espectros ¹H-¹⁵N HSQC obtidos para o receptor livre e ligado ao peptídeo (Figura 42 A e B, respectivamente), na presença de concentrações crescentes de gadolínio. Estas regiões com mudanças no perfil de intensidade estão circuladas em vermelho (Figura 42 B). Nessas regiões, alguns resíduos que antes mostravam picos de intensidade negativos

nos espectros do VEGFR1-D2 livre (figura 26A) mostraram valores próximos de zero nos espectros de VEGFR1-D2 ligado ao DGAPCAIWF, indicando que estes resíduos não são acessíveis à sonda paramagnética e, portanto, estão mais protegidos do gadolínio mostrando que estes podem estar interagindo direta ou indiretamente com o peptídeo (DGA)PCAIWF. Nesse contexto, alguns aminoácidos se destacaram: Val136, Glu137, Met138, Glu144, Cys158, Ser162, Ile165, Thr166, Leu174, Asp175, Lys182, Ile194, Arg196, Lys200, Gly203, Cys207, His214, Leu215 e Ile 229 (Figura 44).





A estrutura cristalográfica do VEGFR1-D2 (azul) mostra os resíduos (vermelho) que foram monitorados através da diminuição da intensidade dos picos nos espectros de ¹H-¹⁵N HSQC do receptor na presença do peptídeo em diferentes concentrações de gadolínio (PDB: FLT-1).

O monitoramento através dos ensaios com o gadolínio indicou que a intensidade de alguns picos do VEGFR1-D2 quando ligado ao peptídeo mudou em várias regiões do receptor. Isto pode indicar uma mudança conformacional do receptor na presença do peptídeo e não uma interação direta de todos os resíduos aqui monitorados. Entretanto, os resíduos que mostraram as maiores diferenças em termos de intensidade próximas de zero após adição de peptídeo foram: Glu 144 e Cys 207. É interessante ressaltar que

parte destes resíduos também foi monitorada através das modificações no deslocamento, sendo esta provavelmente a região de interação direta entre o receptor e o peptídeo DGAPCAIWF.

5 – DISCUSSÃO

Os vasos sanguíneos são formados a partir de dois mecanismos diferentes, conhecidos como vasculogênese e angiogênese. O primeiro sinal de vascularização ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, sendo remodelado progressivamente até, finalmente, estabelecer um sistema circulatório maduro, um processo desenvolvido por mecanismos de vasculogênese. Uma vez que rede vascular é estabelecida, o surgimento ou divisão de capilares a partir de vasos pré-existentes é coordenado pelo processo de angiogênese (Li *et al.*, 2000; Sadler, 2006; D'Alessio, 2015). De forma geral, em organismos adultos, a angiogênese atua principalmente no ciclo ovariano, cicatrização de tecidos, crescimento de órgão, além de estar associada ao desenvolvimento de algumas patologias, como formação de tumores e outras disfunções não-neoplásicas.

Câncer e retinopatia são exemplos de doenças que já possuem terapias antiangiogênicas disponíveis capazes de retardar a progressão da doença. Entretanto, os tratamentos alternativos atuais apresentam algumas desvantagens como efeito de amplo espectro e baixa permeabilidade celular (Miller *et al.*, 2013; Ferrara *et al.*, 2016).

Assim, a busca por novas opções terapêuticas, como agentes inibidores de angiogênese, é uma abordagem valiosa no que diz respeito ao aumento da eficácia de tratamento de doenças desenvolvidas a partir de angiogênese patológica.

Nesse contexto, estão os fatores de crescimento vascular e endotelial (VEGF, VEGF-A, VEGF-B, PIGF, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E) junto com seus receptores correspondentes (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3), que são essenciais no estímulo da angiogênese (Ferrara *et al.*, 2009; Dvorak, 2006; Jain *et al.*, 2014). Estudos estruturais mostraram que a ligação entre VEGF e seus receptores ocorre na porção extracelular, sendo o domínio 2 dos VEGFRs o mais importante para ancoragem do ligante (Lemmon *et al.*, 2010). Dessa forma, essa região da interface de ligação VEGF-VEGFRD2 pode oferecer vantagens significativas sobre os fármacos atuais, combinando a biodisponibilidade e a permeabilidade celular de pequenas moléculas

com interação específica para este domínio de ligação (Giordano et al., 2010; Bono et al., 2013).

Sendo assim, em 2016, Michaloski e colaboradores foram capazes de identificar, através de uma biblioteca de *Phage-display*, dois peptídeos que interagiam com a porção extracelular de VEGFR3, PCAIWF e WVCSGG. Além disso, análises subsequentes mostraram que os peptídeos, uma vez sintetizados, ligavam-se a todos os três tipos de VEGFRs, impediam a interação com seus ligantes e a neovascularização *in vivo*. Esses dados sugerem que os receptores de VEGF possuem um sítio de interação em comum, uma informação importante para o desenvolvimento de novas drogas (Michaloski *et al.*, 2016).

Nesse viés, o estudo da interação do domínio 2 dos receptores de VEGF com os peptídeos inibidores de angiogênese possuem papel fundamental no entendimento dos mecanismos moleculares da interação além de fornecer informações essenciais para a formulação de novos medicamentos anti-VEGFs. Sendo assim, iniciamos os estudos de interação dos domínios 2 dos VEGFR-1 e VEGFR-3 com o peptídeo anti-angiogênico PCAIWF previamente identificados (Michaloski *et al.*, 2016).

Dados estruturais sobre a conformação da porção extracelular dos receptores já foram relatados, em especial para o VEGFR1-D2, que possui descrição de sua estrutura na forma livre e ligada a VEGF-A e PIGF (Starovanik, MA *et al.*, 1999; Wiesmann, C. *et al.*, 1997; Christinger, HW *et al.*, 2004). Em relação aos outros receptores existem menos dados disponíveis, como a estrutura em cristal de VEGFR-3 complexada com VEGF-C, que foi calculada recentemente, entretanto com baixa resolução (Leppänen *et al.*, 2013).

Normalmente, para a produção de proteínas recombinantes, sabe-se que o gargalo do processo está no reenovelamento de proteínas expressas a partir de corpos de inclusão solubilizados (Anselment *et al.*, 2010). Sendo assim, a produção do domínio 2 de VEGFR-3 recombinante foi um dos grandes desafios enfrentados nesse trabalho. Em condições naturais, o VEGFR-3 é produzido por células de mamíferos, que possuem alguns mecanismos naturais durante a expressão proteica, como glicosilações e formação de pontes de enxofre, as últimas sendo essenciais para o enovelamento proteico (Sahdev *et al.*, 2007). Além disso, muitos trabalhos envolvendo a produção dos receptores de VEGF, VEGFR-3 inclusive, expressão o receptor em conjunto com o ligante específico, como é o caso de Leppänen e colaboradores (Leppänen *et al.*, 2013). Entretanto, em 1999, Starovasnik e colaboradores mostraram a produção e o protocolo

de refoldin para o VEGFR-1. Por outro lado, muitos dos estudos estruturais voltados para os receptores utilizaram proteínas produzidas por células eucarióticas, como o sistema de baculovírus, que permitem a glicosilação e a formação das pontes de enxofre (Leppänen *et al.*, 2013). Cabe ressaltar que o reenovelamento *in vitro* é uma reação complexa com uma variedade de parâmetros críticos, e as condições adequadas para chegar à conformação nativa das moléculas são normalmente obtidas através de experimentos de triagem extensivos (Anselment *et al.*, 2010). Ainda sim, novas tentativas de produção de VEGFR3-D2 se fazem necessárias, já que este foi o receptor alvo durante a busca por peptídeos inibidores (Michaloski et al., 2016).

Desta forma, visando os estudos para a determinação estrutural do domínio 2 do VEGFR3 e os estudos de interação com o peptídeo anti-angiogênico fizemos diversos estudos para a melhor condição de expressão do VEGFR3-D2 em meio LB (Figura 18) e meio mínimo (Figura 20). Entretanto, o maior desafio encontrado nesta dissertação foi a produção do receptor VEGFR3-D2 enovelado. Apesar de conseguir boa expressão e uma concentração final razoável para os estudos estruturais, a proteína se encontrou desenovelada (Figura 28) apesar inúmeras variaçãoes nos protocolos de *refolding*. Sendo assim, para estes estudos com o VEGFR3-D2 serão necessárias novas clonagens ou a produção desta proteína em células eucarióticas o que sairia do tempo proposto para esta dissertação.

Como base no exposto acima, iniciamos os estudos com o domínio 2 do VEGFR1-D2. Cabe ressaltar que os estudos de expressão e *refolding* do VEGFR1-D2 já foram previamente descritos, assim como para o VEGFR3-D2 (Satorovasnik et al., 1999; Leppänen *et al.*, 2013). Além disto, estudos anteriores realizados pelos nossos colaboradores indicaram protocolos específicos de expressão, *refolding* e purificação para a construção utilizada neste trabalho (Redondo, 2016). Entretanto para a obtenção da proteína de interesse foram necessárias modificações no protocolo previamente descrito com o objetivo de evitar a precipitação e aumentar a concentração da proteína durante o processo de *refolding*. Dentre as modificações realizadas podemos listar: o aumento da concentração de agente redutor, retirada do mesmo somente durante a segunda etapa de purificação, divisão das purificações evitando a alta concentração de proteína, e principalmente, a produção em série de todo o processo durante o menor tempo possível evitando a precipitação da proteína de interesse (Figuras 29 a 33). Estas modificações permitiram o enovelamento do VEGFR1-D2 na concentração necessária para os estudos de interação por RMN.

Para o assinalamento do VEGFR1-D2 foram realizados experimentos ¹H-¹⁵N-HSQC adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance 800 MHz em pH 5,7 e 7,3 no qual foi possível assinalar de forma comparativa o domínio 2 deste receptor (Starovasnik *et al.*, 1999). Além disso, mudanças estruturais em VEGFR1-D2 causadas pela variação do pH também foram observadas. De forma geral, a estrutura química dos aminoácidos é extremamente sensível ao ambiente químico local, assim perturbações de deslocamento químico, indicam alterações estruturais ou químicas locais (Morais *et al*, 2016). Nesse sentido, dos 101 aminoácidos presentes da estrutura primária somente Ser 129, Asp 130 e Ser 140 não foram assinaladas em pH 5,7, enquanto que em pH 7,3, não foram assinalados os aminoácidos Ser 129, Asp 130, Thr 131, Gly 151 e Asn 212.

Para as análises estruturais do peptídeo (DGA)PCAIWF foram realizados experimentos de homonucleares ¹H-¹H TOCSY e NOESY para possibilitar o assinalamento do peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF (Figura tal). Cabe ressaltar que o peptídeo usado neste trabalho é uma variação do peptídeo PCAIWF (Michaloski et al., 2016). Dados gerados pelos nossos colaboradores indicaram que a adição dos resíduos de Asp, Glu e Ala ao N-terminal do peptídeo levaram a um grande aumento na solubilidade e não alteraram sua interação com os receptores de VEGF (Michaloski et al., 2016; Redondo, 2017). Desta forma, nossos resultados mostraram que o peptídeo apresentou picos finos e bem definidos, como também a presença de sistemas de spins duplicados (Figura 38). Estes resultados são geralmente esperados para peptídeos em que há a presença de resíduos de prolina em sua sequência primária (Giordano et al., 2010). Isto geralmente ocorre porque um peptídeo de apenas 9 resíduos não possui uma estrutura definida podendo assim experimentar diversas estruturas possíveis. Como a prolina pode estar tanto na conformação cis ou trans ela acaba levando a possibilidade do aparecimento de sistemas de spins duplicados (Giordano et al., 2005). O peptídeo foi praticamente todo assinalado faltando apenas o resíduo 1 o ácido aspártico, presente no N-terminal.

Para os estudos de interação do VEGFR1-D2 e o peptídeo (DGA)PCAIWF foram realizados experimentos ¹H-¹⁵N HSQC. A interação entre proteína e peptídeo foi avaliada inicialmente através de perturbações no deslocamento químico, também conhecido como índice CSP (*Chemical Shift Perturbation*), calculado a partir de experimentos ¹H-¹⁵N-HSQC da proteína livre e ligada ao peptídeo. Os cáculos de CSP foram realizados para os pHs 5,7 (Figura 40) e 7,3 (Figura 41). Nossos resultados indicaram que a interação ocorreu apenas em pH 7,3, com destaque para os resíduos Glu 150, Ile 202, Gly 203, Gly 213, His 214, Leu 215 e Ile 229 (Figura 43).



Figura 45: Estrutura cristalográfica do VEGFR1-D2 ligado ao homodímero de VEGF-A mostrando os resíduos monitorados via CSP quando na presença do peptídeo (DGA)PCAIWF em pH 7,3.

Em (A) estrutura cristalográfica do VEGFR1-D2 (azul) mostra os resíduos onde as maiores variações de deslocamento químico foram monitoradas para o experimento de interação proteína:peptídeo em pH 7,3. Em vermelho, os resíduos: E150, H214 e L215 que mostraram diferenças acima de 0,020 ppm, ou seja,

acima de 16 Hz. A I229 é a que mais sofreu CSP (0,043 ppm = 34,4 Hz) no entanto, este resíduo não está disponível nesta estrutura do pdb. Em verde, os resíduos I202, G203 e G213 que mostraram diferenças entre 0,018-0,012 ppm (entre 14,4 - 9,6 Hz). Em (B) o mapa de superfície do VEGFR1-D2 mostrando o mesmo padrão de cores observado em A (PDB: FLT-1).

Os dados obtidos através dos experimentos de monitoramento do deslocamento químico do receptor na presença do peptídeo em pH 7,3 mostraram uma região bem interessante presente no *loop* 5 do domínio 2 do VEGFR1. Nesta região podemos observar que os resíduos G213, H214, L215 e pela posição o I229 (não mostrado na Figura 44) estão localizados em uma região exposta ao solvente o que seria bem interessante para a interação do peptídeo (DGA)PCAIWF mesmo quando ligado ao VEGF.

No intuito de monitorar se os resíduos que sofreram modificações de CSP no espectro devido à adição do peptídeo inibidor de VEGF estão diretamente envolvidos na interação com o peptídeo realizamos estudos específicos usando o gadolínio que funciona como uma sonda paramagnética. Como descrito anteriormente, este tipo de análise já é bem observada na literatura (Morais *et al.*, 2016), Morais *et al.*, 2016). Os resultados obtidos mostraram que o peptídeo interage com o receptor somente em pH 7,3 corroborando com os dados obtidos pela análise de variações no deslocamento químico do VEGFR1-D2 livre e ligado ao peptídeo (Figura 43).

Conforme observado no experimento de interação receptor/peptídeo na presença de gadolínio (Figura tal) alguns resíduos sofreram modificações maiores quando comparado a outros resíduos, o que pode demonstrar a ocorrência de uma pequena modificação estrutural do domínio 2 do VEGFR1 na presença do peptídeo.

Ao analisarmos os resultados de interação receptor/peptídeo por CSP e titulação com o gadolínio podemos verificar que três resíduos aparecem em ambos os experimentos em pH 7,3 (Figura 46).





Os estudos por variação de deslocamento químico (círculo azul) mostraram que os resíduos monitorados foram E150, I202, G203, G213, H214, L215 e I229. Para os estudos de titulação com gadolínio os resíduos monitorados foram Val 136, Glu 137, Met 138, Glu 144, Cys 158, Ser 162, Ile 165, Thr 166, Leu 174, Asp 175, Lys 182, Ile 194, Arg 196, Lys 200, Gly 203, Cys 207, His 214, Leu 215, Ile 229 (círculo vermelho). A interseção destes círculos evidencia três resíduos observados nos dois experimentos: a H214, G203, L215 e a I229.
Ao monitorar estes três resíduos na estrutura do VEGFR1-D2 vemos que esta região foi a mesma observada anteriormente para os dados de CSP. Esta região é interessante pois não é específica para a interação dos diferentes receptores se encontrando livre para interagir com o peptídeo mesmo que o receptor esteja ligado ao VEGF.

Desta forma, estes resultados podem indicar que foi possível encontrar um novo sítio de interação no domínio 2 presente nos VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. Novos ensaios estruturais serão realizados com os outros dois receptores e também com o peptídeo WVCSGG para avaliar se novamente esta região será monitorada. Estes resultados mostram a importância dos estudos estruturais aliados aos estudos biológicos e ampliam as possíbilidades para o uso de novos peptidomiméticos com capacidade anti-angiogênica não específica para os três receptores de VEGF.

6 – CONCLUSÃO

- A melhor condição de expressão do VEGFR3-D2 foi obtida 37 °C, indução com 0,2 mM de IPTG após atingida DO_{600} de 0,7 e 4h de crescimento após indução.

 Apesar de obtermos um bom rendimento do VEGFR3-D2 após a purificação, este não estava enovelado, o que impossibilitou os estudos estruturais e de interação com o peptídeo tal por RMN.

- A expressão, purificação e *refolding* do VEGFR1-D2 foi realizada através de protocolos previamente descritos (Starovasnik *et al.*, 1999, Redondo, 2016), entretanto, várias modificações foram realizadas para a obtenção do receptor enovelado e em boa concentração para os estudos de interação com o peptídeo.

- Experimentos ¹H¹⁵N-HSQC do VEGFR1-D2 foram realizados em um espectrômetro Bruker 800 MHz em pH 5,7 e 7,3.

- O assinalamento do peptídeo DGAPCAIWF foi realizado a partir dos experimentos de TOCSY e NOESY

- O assinalamento do VEGFR1-D2 foi realizado por comparação com assinalamento previamente descrito por Starovasnik *et al.*, 1999.

'- Estudos de interação entre o VEGFR1-D2 e o peptídeo anti-angiogênico (DGA)PCAIWF em pH 7,3 mostraram através de diferenças nos deslocamentos químicos entre o receptor livre e ligado que os resíduos Glu 150, Ile 202, Gly 203, Gly 213, His 214, Ile 229 participam da interação proteína-peptideo. A interação não é observada em baixo pH.

- Através diferença de intensidade dos picos nos espectros ¹H-¹⁵N HSQC adquiridos em pH 7,3, para o receptor livre e ligado ao peptídeo, na presença de concentrações crescentes de gadolínio, alguns resíduos se destacaram, a saber: Val 136, Glu 137, Met 138, Glu 144, Cys 158, Ser 162, Ile 165, Thr 166, Leu 174, Asp 175, Lys 182, Ile 194, Arg 196, Lys 200, Gly 203, Cys 207, His 214, Leu 215, Ile 229.

- A análise cruzada dos dados de CPS e gadolínio destacaram alguns resíduos como, Gly 203, His, 214, Leu 215 e Ile 229, indicando que esses aminoácidos podem ser importantes para a ancoragem do ligante ao VEGFR1-D2

- Novos estudos acerca de técnicas de *refolding* serão necessários para implementar um protocolo capaz de produzir o VEGFR3-D2 no seu estado enovelado para os estudos estruturais.

7 – ANEXO

7.1 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é o único método que permite a determinação das estruturas tridimensionais e da dinâmica de proteínas em solução à nível atômico. Além disso, a RMN é um método extremamente útil para os estudos de interação, *screening* de compostos e reações cinéticas (Poulsen, 2002; Higman, 2016).

A grandeza física mais importante em RMN é o spin nuclear. Os núcleos que possuem spin, devido à sua configuração nuclear, assumem um comportamento característico de momento angular, capaz de gerar um momento magnético. O núcleo com spin é definido como uma partícula carregada e rotatória. Dessa forma, o spin também pode ser entendido como uma corrente elétrica que passa através de um circuito fechado, sendo capaz de produzir um campo magnético local. A descrição do campo magnético associado ao spin nuclear é dada por um vetor do momento nuclear magnético, μ , que é proporcional à rotação do vetor do momento angular (Figura 47) (Poulsen, 2002; Nascimento, 2001).



Figura 47: Momento magnético "m" gerado a partir do momento angular.

De forma geral, quando não há a presença do campo magnético, os spins nucleares estão orientados aleatoriamente, não apresentando nenhuma orientação definida. Este estado é conhecido como degenerado. Entretanto, quando uma amostra é submetida a um campo magnético externo B_0 , de alta intensidade e homogêneo, os spins nucleares tendem a se organizar e assumir determinadas orientações. Sendo assim, o número de orientações possíveis que determinado núcleo com número de spin (I) pode assumir diante de um campo magnético externo é calculado através da seguinte equação (Nascimento, 2001):

Número de orientações possíveis = 2I + 1

Onde I é qualquer número diferente de zero. Para fins didáticos, como exemplo, podemos utilizar um núcleo cujo número de spin (I) seja ½. Nesse caso, só há duas orientações possíveis: + ½ (referente a um estado de menor energia e paralelo ao campo magnético B_0) e – ½ (correspondente a um estado de maior energia e anti-paralelo ao campo magnético B_0). A quantidade de spins α (menor energia) presente será levemente superior à quantidade de spins β , gerando um vetor magnétização resultante paralelo ao eixo B_0 .





Entretanto, quando na presença do campo magnético B_0 o núcleo gira em torno do seu próprio eixo. Este fenômeno é conhecido como precessão de Larmor. A frequência de precessão é uma propriedade física de cada núcleo com spin nuclear e é diretamente proporcional à força do campo magnético externo (Poulsen, 2002; Nascimento, 2001).



Figura 49: Precessão do momento magnético nuclear em torno no eixo z (B0).

Para que a magnetização nuclear possa ser observada, é necessária a aplicação de um pulso de rádio-frequência perpendicular ao campo magnético B_0 . Quando o pulso aplicado possui a mesma frequência de Larmor dos núcleos de interesse, o vetor magnetização que estava em z é retirado do equílibrio indo para o plano xy. A nova componente gerada no plano xy pode ser observada com auxílio de um detector no

mesmo plano de precessão sendo capaz de induzir uma corrente elétrica na bobina que pode ser medida (Poulsen, 2002). Ao término do pulso de rádio frequência o sistema tende a retornar ao equilíbrio. Este retorno é conhecido como processo de relaxação, onde os núcleos perdem o excesso de energia e retornam às suas posições originais de equilíbrio, voltando assim para o eixo z (Nascimento e Bloch Jr, 2001, Cavanagh et al., 2007).

O decaimento da magnetização no plano xy para o equilíbrio possui comportamento exponencial e origina o sinal de FID (*free induction decay*). Os sinais de FID são detectados em função do tempo contendo todas as informações sobre acoplamento e deslocamento químico.

Entretanto, em uma amostra existem vários núcleos e os vários sinais de FID originados se superpõem, tornando difícil a extração de informações desejadas. Assim, para a obtenção de um espectro de RMN a partir do FID, é necessário um tratamento matemático que é realizado através da Transformada de Fourier. O FID é uma função do tempo e a transformada de Fourier é capaz de convertê-lo para uma função da frequência. Por isso os espectros de RMN são normalmente apresentados em termos de frêquencia (Poulsen, 2002). Sendo assim, um espectro de RMN consiste em uma série de ressonâncias que ocorrem em diferentes freqüências sendo denominadas de deslocamentos químicos (Nascimento, 2001).





O FID é gerado em função do tempo e após a transformada de Fourrier é possível transformá-lo no domínio das frequências.

Uma característica geral da espectroscopia de RMN é que as frequências de ressonância observadas dependem do ambiente dos núcleos individuais e diferem levemente das frequências preditas. As diferenças nas frequências de ressonância são conhecidas como deslocamentos químicos sendo este um dos parâmetros mais

importantes para os estudos de RMN, pois fornecem a possibilidade de distinguir núcleos idênticos em ambientes químicos diferentes. O fenômeno do deslocamento químico surge devido aos movimentos de elétrons induzidos pelo campo magnético externo, que geram campos magnéticos secundários. O campo magnético local de um núcleo específico, portanto, depende do campo magnético B_0 e do campo secundário local. O efeito do campo secundário é chamado de blindagem nuclear e pode aumentar ou diminuir o efeito do campo principal (Cavanagh et al., 2007).

A blindagem do campo magnético externo depende da força do campo magnético externo, sobre a estrutura química e a geometria estrutural da molécula. Os núcleos ativos da molécula, detectam ligeiramente diferentes campos magnéticos externos, e por esta razão, as condições de ressonância são ligeiramente diferentes. A precessão do vetor momento magnético nuclear dos núcleos individuais terão diferentes velocidades angulares e o detector captará vários componentes de frequência. Desta forma, a transformada de Fourier irá produzir um espectro de RMN com os sinais a partir de cada um dos diferentes tipos de núcleos na molécula (Poulsen, 2002).

7.2 – Experimentos de RMN

Os experimentos de RMN são realizados através de seqüências de pulsos que excitam os spins gerando a transferência de magnetização dos mesmos. Este efeito nos fornece as informações sobre o ambiente químico do núcleo, representado por largura de linha, intensidade e deslocamento químico (δ) do sinal de cada núcleo em um espectro de RMN.

A estratégia de assinalamento é importante para a determinação da estrutura de proteínas e peptídeos. O primeiro passo são os experimentos unidimensionais que podem fornecer rapidamente informações quanto ao estado da amostra, como problemas de concentração da proteína, grau de pureza e solubilidade (Gil e Geraldes, 1987; Sanders e Hunter, 1993). Este experimento contém todos os picos da proteína ou peptídeo, mas não possibilita o assinalamento devido à sobreposição dos picos (Figura 51). (Wüthrich, 1986).



Figura 51: Espectro unidimensional (1D) 1H de ressonância magnética nuclear da lisozima do ovo. Cada pico refere-se a um núcleo de hidrogênio presente na proteína. Devido ao efeito da blindagem, cada hidrogênio terá uma frequência relacionada ao ambiente químico onde ele se encontra. Por exemplo: hidrogênios amídicos caem na região do espectro referente a 7 ppm, devido a desblindagem gerada pelos átomos de nitrogênio, diferentemente de hidrogênios de cadeias alifáticas, que são mais blindados devido influência do carbono. Este experimento pode evidenciar a ampla dispersão de deslocamento químico o que é condizente com uma amostra devproteína enovelada e com alto grau de pureza

Para diminuir este tipo de problema é necessária a utilização de experimentos em duas ou mais dimensões realizados através de seqüências de pulso específicas Os experimentos bidimensionais, que podem ser heteronucleares ou homonucleares, são indispensáveis para o assinalamento e determinação estrutural de uma proteína ou peptídeo. Destes experimentos os mais utilizados na determinação da estrutura de proteínas são: TOCSY (*"Total correlation spectroscopy"*), NOESY (*"Nuclear overhauser effect spectroscopy"*) e HMQC (*"Heteronuclear multiple quantum coherence"*).

8.2.1 – Experimentos bidimensionais homonucleares e heteronucleares

$8.2.1.1 - {}^{1}H - {}^{15}N - HSQC$

Neste experimento a magnetização é transferida a partir dos hidrogênios para núcleos de ¹⁵N ligados através de acoplamento escalar. O deslocamento químico evolui no nitrogênio e a magnetização é então transferida de volta para o hidrogênio, para detecção (Figura 52) (Higman, 2016).



Figura 52: Transferência da magnetização entre os átomos no experimento ¹H-¹⁵N HSQC

Este espectro é conhecido com a impressão digital de uma proteína, geramente sendo o primeiro experimento heteronuclear realizado. Este experimento permite avaliar se outros experimentos poderão ser realizados e, portanto, se é válido investir na marcação isotópica de uma proteína com 13C. Este experimento também permite avaliar se é necessário deuterar uma proteína, caso ele seja razoavelmente grande (Higman, 2016).

No espectro ¹H-¹⁵N-HSQC cada pico representa uma correlação H-N, principalmente as pertencentes ao grupo amida da cadeia principal. Além disso, os grupos N ϵ -H ϵ da cadeia lateral do Triptofano, os grupos N δ -H δ 2 da cadeia lateral de asparaginas e N ϵ -H ϵ 2 da cadeia lateral de glutaminas também são visíveis. As prolinas, como não possuem hidrogênios amídicos, não apresentam picos neste espectro (Higman, 2016).

Espectros ¹H-¹⁵N-HSQC também são muito utilizados para ensaios de interação entre proteínas e seus ligantes, através dos dados gerados, é possível identificar os resíduos que apresentaram variação de deslocamento químico após a adição do ligante à proteína estudada. Mudanças desse tipo caracterizam resíduos que apresentaram interação direta ou indireta com o ligante.

8.1.2.2 - ¹H-¹H-TOCSY

Os experimentos ¹H-¹H TOCSY (Total Correlated Spectroscopy) são utilizados com a finalidade de dividir o sinal dos prótons em grupos de acoplamento em cadeia,

uma técnica especialmente usada quando há deslocamentos químicos muito próximos no espectro ou quando há acoplamentos de segunda ordem. Sendo assin, o espetro de TOCSY é obtido através de correlações spin-spin e, consequentemente a transferência de magnetização não ocorre através das ligações químicas que conectam os resíduos da cadeia, ou seja, a magnetização é dipersa sobre um sistema de spins completo de um aminoácido por um acoplamento escalar sucessivo. Nesse tipo de experimento há a informação adicional dos sinais que se originam da interação de todos os prótons de um sistema de spin que não são diretamente conectados através de três ligações químicas (Poulsen, 2002).

$8.1.2.3 - {}^{1}H^{-5}H^{-NOESY}$

O experimento NOESY é crucial para a determinação da estrutura da proteína. Através da interação dipolar de spins (o efeito Overhauser nuclear, NOE) é possível fazer a correlação de prótons. A intensidade do NOE é em primeira aproximação propocional a $1/r^6$, com r sendo a distância entre os prótons. Cabe ressaltar que a correlação entre dois prótons depende da distância entre eles, mas normalmente um sinal só é observado se distância observada entre prótons no espaço for menor que 5 angstroms. Dessa forma, o experimento NOESY correlaciona todos os prótons que estão próximos no espaço, respeitando as restrições de distância descrita acima. De forma geral, esse experimento é capaz de correlacionar os prótons distantes na sequência de aminoácidos e os próximos no espaço devido à estrutura terciária. Sendo esta, a informação mais importante para a determinação de estruturas proteicas (Higman, 2016).



Figura 53: Transferência da magnetização entre os átomos no experimento ¹H-¹H NOESY

8.2 – Atribuição dos espectros de RMN

Os espectros de RMN nos fornecem informações estruturais sobre a proteína ou peptídeo, que são obtidas através da associação específica de cada grupo de spins com os seus deslocamentos químicos característicos. Este processo é denominado de atribuição da seqüência de aminoácidos (ou assinalamento), sendo necessário o conjunto de experimentos TOCSY e NOESY para a análise das correlações entre os hidrogênios (Wüthrich, 1986).

As ressonâncias dos hidrogênios são classificadas de acordo com o deslocamento químico característico para HN, H α , H β , H δ . Sendo assim, os espectros são analisados e cada hidrogênio dos aminoácidos identificados, através de uma tabela de deslocamentos químicos médios, que podem diferir de acordo com o ambiente químico que rodeia o núcleo. Para definir a estrutura tridimensional de uma proteína são necessárias as informações das conectividades inter-resíduos, que são adquiridas nos espectros de NOESY. Com o assinalamento em mãos, qualquer mudança no espectro pode ser verificada, sendo esta a base para os estudos de interação. No caso de formação do complexo, a presença do receptor modifica o espectro do ligante levando ao monitoramento das regiões de interação com o complexo.

No caso de determinação estrutural, após o assinalamento é possível calcular a estrutura da proteína ou peptídeo, resolvendo ambigüidades e encontrando erros de assinalamento

devido ao aparecimento de violações de NOEs e estruturas com alta energia (Wüthrich, 1986; Sanders e Hunter, 1993).

8 – REFERÊNCIAS

Arnold D., Andre T., Bennouna J., Bevacizumab (BEV) plus chemotherapy (CT) continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) previously treated with BEV plus CT: Results of a randomized phase III intergroup study (TML study). ASCO Meeting; 30:CRA3503, 2012.

Beck L.J., D'Amore P.A., Vascular development: cellular and molecular regulation. FASEB J. 11:365–73, 1997.

Berse B., Brown L.F., Van de Water L., Dvorak H.F., Senger D.R., Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. Mol. Biol. Cell 3:211–20, 1992.

Brown L.F., Detmar M., Claffey K., Nagy J.A., Feng D., et al., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. EXS 79:233–69, 1997.

Brown L.F., Olbricht S.M., Berse B., Jackman R.W., Matsueda G., et al., Overexpression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) and its endothelial cell receptors in delayed hypersensitivity skin reactions. J. Immunol. 154:2801–7, 1995.

Brown L.F., Tognazzi K., Dvorak H.F., Harrist T.J., Strong expression of kinase insert domain-containing receptor, a vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptor in AIDS-associated Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. Am. J. Pathol. 148:1065–74, 1996.

Fischer C., Mazzone M., Jonckx B., Carmeliet P., FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: drug targets for anti-angiogenic therapy, 2008

Cao Y., Ji W.R., Qi P., Rosin A., Cao Y., Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by mRNA alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun 235:493–498. doi:10.1006/bbrc.1997.6813, 1997. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., et al., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 380:435–39, 1996.

Carmeliet P., Moons L., Luttun A., et al., Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. Nat Med; 7:575-83, 2001.

Dvorak H., Tumor blood vessels. In The Endothelium: A Comprehensive Reference, ed. W Aird. Cambridge: Cambridge Univ. Press. In press, 2007.

Dvorak H., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF, VEGF-A). In Microvascular Research, Vol. 1, ed. D Shepro, pp. 97–103. Boston: Elsevier, 2006.

Dvorak H.F., Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. Am. J. Pathol. 162:1747–57, 2003.

Ellis L.M., Hicklin D.J., Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. Clin Cancer Res 14:6371–6375, 2008.

Ellis L.M., Hicklin D.J., VEGF-targeted therapy: Mechanisms of anti-tumour activity. Nat Rev Cancer 8:579–591, 2008.

F. Bono, F. De Smet, C. Herbert, K. De Bock, M. Georgiadou, P. Fons, M. Tjwa, C. Alcouffe, A. Ny, M. Bianciotto, B. Jonckx, M. Murakami, A. A. Lanahan, C. Michielsen, D. Sibrac, F. Dol-Gleizes, M. Mazzone, S. Zacchigna, J.-P. Herault, C. Fischer, P. Rigon, C. R. de Almodovar, F. Claes, I. Blanc, K. Poesen, J. Zhang, I. Segura, G. Gueguen, M.-F. Bordes, D. Lambrechts, R. Broussy, M. van de Wouwer, C. Michaux, T. Shimada, I. Jean, S. Blacher, A. Noel, P. Motte, E. Rom, J.-M. Rakic, S. Katsuma, P. Schaeffer, A. Yayon, A. Van Schepdael, H. Schwalbe, F. L. Gervasio, G. Carmeliet, J. Rozensky, M. Dewerchin, M. Simons, A. Christopoulos, J.-M. Herbert, P. Carmeliet, Inhibition of tumor angiogenesis and growth by a small-molecule multi-FGF receptor blocker with allosteric properties. Cancer Cell 23, 477–488, 2013.

Ferrara N., Carver Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., et al., Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 380:439–42, 1996

Ferrara N., Gerber H.P., Le Couter J., The biology of VEGF and its receptors. Nat Med; 9:669-76, 2003.

Ferrara N., Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. Oncologist 9, Suppl 1:2-10, 2004

Ferrara N., Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr. Rev. 25: 581–611, 2004.

Fischer C., Mazzone M., Jonckx B., Carmeliet P., FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: Drug targets for anti-angiogenic therapy? Nat Rev Cancer 8:942–956, 2008.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med; 1:27-31, 1995.

Folkman J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med; 1:27-31, 1995.

Guidi A.J., Abu-Jawdeh G., Berse B., Jackman R.W., Tognazzi K., et al., Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. J. Natl. Canc. Inst. 87:1237–45, 1995.

Guidi A.J., Schnitt S.J., Fischer L., Tognazzi K., Harris J.R., et al., Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer 80:1945–53, 1997.

Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M., Ruhrberg C., Lundkvist A., Abramsson A., Jeltsch M., Mitchell C., Alitalo K., Shima D., Betsholtz C., VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. J. Cell Biol. 161, 1163–1177, 2003.

Herbert S.P., Stainier D. Y. R., Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12, 551–564, 2011.

Hedlund E.M., Yang X., Zhang Y., et al., Tumor cell-derived placental growth factor sensitizes antiangiogenic and antitumor effects of anti-VEGF drugs. Proc Natl Acad Sci U S A; 110:654-9, 2013.

Holash J, Mmsonpierre PC, Compton D, *et al.* Vessel cooption, re-gression, and growth in tumors mediated by anglopoietins and VEGF. Science 1999; 284:1994-1998.

Holmgren L., O'Reilly M.S., Folkman J., Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis Jn the presence of ang~ogenesls suppression. Nat Med; 1:149-153, 1995.

Miller W.J., Le Couter J., Strauss E. C., Ferrara N., Vascular endothelial growth factor A in intraocular vascular disease. Ophthalmology 120, 106–114, 2013.

Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. & Alitalo, K., EMBO J. 15, 290–298, 1996.

Khaliq A., Li X.F., Shams M., Sisi P., Acevedo C.A., Whittle M.J. et al, Localisation of placenta growth factor (PIGF) in human term placenta. Growth Factors 13:243–250. doi:10.3109/08977199609003225, 1996.

Kopetz S., Hoff P.M., Morris J.S., et al., Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. J. Clin Oncol; 28:453-9, 2010.

Kurz H., Burri P. H. and Djonov V. G., Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. News Physiol Sci. 18: 65–70, 2003.

Lee A.H., Happerfield L.C., Bobrow L.G., Millis R.R., Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. J Clin Patho1; 50: 669-673,1997 Lee, J., Gray, A., Yuan, J., Luoh, S. M., Avraham, H. & Wood, W. I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1988–1992, 1996.

Leppänen V.M., Jeltsch M., Anisimov A., et al., Structural determinants of vascular endothelial growth factor-D receptor binding and specificity. Blood; 117:1507-15, 2011.

Levine R.J., Maynard S.E., Qian C., Lim K.H., England L.J., Yu K.F., Schisterman E.F., Thadhani R., Sachs B.P., Epstein F.H., Sibai B.M., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A.: Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N. Engl J. Med 350: 672–683, 2004

Li C.Y., Shan S., Huang Q., et al., Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation v,a skin window chambers in rodent mod- els. J. Natl Cancer Inst; 92:143-147, 2000

Li W.W., Jaffe M., Li V.W., Tsakayannls D., Lessons to be learned from clinical trials of anglogenesis modulators in ischemic diseases In: Rubanyl G.M., ed. Angiogenesis in health and disease: basic mecha- nisms and clinical applications. New York, NY: Dekker; 519- 536, 2000.

Lieu C.H., Tran H.T., Jiang Z., et al., The association of alternate VEGF ligands with resistance to anti-VEGF therapy in metastatic colorectal cancer. ASCO Meeting; 29:abstr 3533, 2011.

Ltotta L, Steeg P, Stetler-Stevenson W. Cancer metastasis and angio- genesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell; 64327-336, 1991.

Lemmon M.A., Schlessinger J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 141, 1117–1134, 2010.

Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H., Swartz M., Fukumura D., Jain R.K., K. Alitalo, Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice, Science 276; 1423–1425, 1997

Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Ferraro M.G., Aprelikova O., Alitalo K. et al, Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PIGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. Oncogene 8:925–931, 1993.

Maharaj A.S., Saint-Geniez M., Maldonado A.E., D'Amore P.A., Vascular endothelial growth factor localization in the adult. Am. J. Pathol. 168:639–48, 2006.

Maynard S.E., Min J.Y., Merchan J., Lim K.H., Li J., Mondal S., Libermann T.A., Morgan J.P., Sellke F.W., Stillman I.E., Epstein F.H., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A.: Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J. Clin Invest 111: 649–658, 2003

Muller Y.A., Li B., Christinger H.W., Wells J.A., Cunningham B.C., de Vos A.M., Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7192–97, 1997.

Ferrara N., A. P. Adamis, Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. Nat. Rev. Drug Discov. 15, 385–403, 2016.

Ferrara N., K. Alitalo, Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors, Nat. Med. 5; 1359–1364, 1999

Ferrara N., Vascular endothelial growth factor. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 29, 789–791, 2009.

Nagy J., Feng D., Vasile E., Wong W., Shih S.C., et al., Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. Lab. Invest. 86:767–80, 2006.

Nagy J.A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., Brown L.F., et al., VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 67:227–37, 2002.

Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 13:9–22, 1999

OrtegaN., Hutchings H., and Plouet J., SignalrelaysintheVEGFsystem.Front Biosci 4:D141–D152, 1999.

Persico M.G., Vincenti V., Di Palma T., Structure, expression and receptorbinding properties of placenta growth factor (PIGF). Curr Top Microbiol Immunol 237:31–40, 1999.

Phillips H.S., Hains J., Leung D.W., Ferrara N., Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. Endocrinology 127:965–67, 1990.

Potente M., Gerhardt H., Carmeliet P., Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell;146:873-87, 2011

R. J. Giordano, M. Cardó-Vila, A. Salameh, C. D. Anobom, B. D. Zeitlin, D. H. Hawke, A. P. Valente, F. C. Almeida, J. E. Nör, R. L. Sidman, R. Pasqualini, W. Arap, From combinatorial peptide selection to drug prototype (I): Targeting the vascular endothelial growth factor receptor pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 5112–5117, 2010.

Jain R.K., Antiangiogenesis strategies revisited: From starving tumors to alleviating hypoxia. Cancer Cell 26, 605–622, 2014.

Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrlne interactions between tumour cells and endothelial cells: the "angiogenesls progression" hy- pothesis. Eur J Cancer; 32A:2438-2450, 1996.

Ramlau R., Gorbunova V., Ciuleanu T.E., et al., Aflibercept and Docetaxel versus Docetaxel alone after platinum failure in patients with advanced or metastatic non-smallcell lung cancer: a randomized, controlled phase III trial. J. Clin Oncol; 30:3640-7, 2012.

Ribatti D., The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review, Springer ScienceBusiness Media, DOI 10.1007/s10456-008-9114-4

Stacker S. A., Stenvers K., Caesar C., A. Vitali, Domagala T., Nice E., Roufail S., Simpson R. J., Moritz R., Karpanen T., Alitalo K, Achen M. G., Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers, J. Biol. Chem. 274, 32127–32136, 1999.

Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219:983–85, 1983.

Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikeda T., Tojo A., Matsushime H. et al., Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. Oncogene 5: 519–524, 1990.

Tammela T., Zarkada G., Wallgard E., Murtomäki A., Suchting S., M. Wirzenius M., Waltari M., Hellström M., Schomber T., Peltonen R., Freitas C., Duarte A., Isoniemi H., Laakkonen P., Christofori G., Ylä-Herttuala S., Shibuya M., B. Pytowski B., Eichmann A., Betsholtz C., Alitalo K., Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. Nature 454, 656–660, 2008.

Takahashi H., Hattori S., Iwamatsu A., Takizawa H., Shibuya M., A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. J. Biol Chem; 279:46304-14, 2004

Terman B. I., Carrion M. E., Kovacs E., Rasmussen B. A., Eddy R. L. and Shows T. B., Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. Oncogene 6: 1677–1683, 1991.

V. Joukov, T. Sorsa, V. Kumar, M. Jeltsch, L. ClaessonWelsh, Y. Cao, O. Saksela, N. Kalkkinen, K. Alitalo, Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C, EMBO J. 16; 3898–3911, 1997

Van Cutsem E., Tabernero J., Lakomy R., et al., Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. J. Clin Oncol; 30:3499-506, 2012.

Voros G., Maquoi E., Demeuelemeester D., Clerx N., Collen D., Lijnen H.R., Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. Endocrinology 146:4545–4554. doi:10.1210/en.2005-0532, 2005.

Weis S.M., Cheresh D.A., Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. Nat Med;17:1359-70, 2011

Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., Holash J., Vascularspecific growth factors and blood vessel formation. Nature 407:242–48, 2000.

Yang W., Ahm H., Hinrichs M., Torry R.J., Torry D.S., Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PIGF-4) expressed in human throphoblast and endothelial cells. J. Reprod Immunol 60:53–60. doi:10.1016/S0165-0378(03)00082-2, 2003.