

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO RECONHECIMENTO MOLECULAR DE  
POLISSACARÍDEOS DE OURIÇO-DO-MAR PELA ANTITROMBINA**

Camila Franco Becker

Porto Alegre – Brasil

Abril de 2007

**CARACTERIZAÇÃO DO RECONHECIMENTO MOLECULAR DE POLISSACARÍDEOS  
DE OURIÇO-DO-MAR PELA ANTITROMBINA**

*Camila Franco Becker*

Dissertação de mestrado elaborada no Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação dos professores doutores:

Hugo Verli  
Jorge Almeida Guimarães

Porto Alegre – Brasil  
Abril de 2007

**CARACTERIZAÇÃO DO RECONHECIMENTO MOLECULAR DE POLISSACARÍDEOS  
DE OURIÇO-DO-MAR PELA ANTITROMBINA**

*Camila Franco Becker*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Banca Examinadora:**

Hugo Verli (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Jorge Almeida Guimarães (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Carlos Termignoni (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Evelyn Schroeder (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Laurent Emmanuele Dardenne (LNCC)

Daniel Macedo Lorenzini (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Suplente)

Esta dissertação foi realizada sob a orientação do Professor Doutor Hugo Verli e do Professor Doutor Jorge Almeida Guimarães, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

BECKER, Camila Franco.

**Caracterização molecular de polissacarídeos de ouriço-do-mar pela  
antitrombina**

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2007.

Tese: Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

- |                       |               |
|-----------------------|---------------|
| 1. Dinâmica Molecular | 2. Heparina   |
| 3. Antitrombina       | 4. Coagulação |

I. Hugo Verli

II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia

III. Títulos

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hugo Verli por ter me recebido de braços abertos no Grupo de Bioinformática Estrutural e por ter sido responsável pela minha iniciação na Modelagem Molecular. Agradeço a confiança depositada em mim ao longo de todo o trabalho, por me conduzir na carreira científica e ensinar o lado humano da ciência.

Você é um exemplo de pessoa e de profissional.

Ao Prof. Jorge Almeida Guimarães pela oportunidade de realização deste trabalho, pela atenção, sugestões e esclarecimentos desde a iniciação científica.

Ao Prof. Carlos Termignoni, membro da comissão de acompanhamento e que, de alguma forma, sempre fez parte da minha formação científica, pela prestatividade e atenção.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos alunos do Grupo de Bioinformática Estrutural, em especial ao Laércio Fachin e ao Guilherme Giesel, pela convivência no laboratório, parceria e companheirismo.

Ao Luciano e Sílvia pela competência, eficiência e atendimento sempre atencioso.

Desde já aos membros da banca, por terem aceitado o convite.

Aos meus pais, à Geórgia, ao Bruno e ao Juliano por compartilharem esta jornada de desafios, pelo apoio e incentivo oferecidos e por terem auxiliado para a realização deste trabalho.

***“A coisa mais indispensável a um homem  
é reconhecer o uso que deve fazer do seu  
próprio conhecimento.”***

Platão

Dedico esta Dissertação aos meus pais,  
Jorge Roberto Becker e Lisete Franco  
Becker.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS .....	xviii
1 Introdução.....	1
1.1 A hemostasia e a cascata de coagulação .....	1
1.2 Estrutura da Antitrombina (AT) .....	3
1.3 Glicosilação de proteínas .....	5
1.4 Mecanismo de modulação da AT por GAGs .....	7
1.5 Agentes terapêuticos no tratamento de hipercoagulopatias.....	9
1.6 Galactana e Fucana .....	14
1.7 Caracterização conformacional de biomoléculas por dinâmica molecular (DM).....	17
2 Objetivos.....	21
3 Metodologia .....	22
3.1 Programas utilizados .....	22
3.2 Cálculos <i>ab initio</i> .....	22
3.3 Cálculos de constantes de acoplamento .....	23
3.4 Cálculos de mecânica molecular para geração de mapas de contorno.....	24
3.5 Simulações por DM .....	25
3.5.1 Protocolo de simulação .....	25
3.5.2 Construção de topologias .....	27
3.5.3 Validação das simulações por DM.....	28
3.6 Experimentos de <i>Docking</i> .....	28

4	Resultados.....	30
4.1	Preâmbulo .....	30
4.2	Trabalho I .....	31
4.3	Trabalho II .....	41
5	Discussão Geral .....	65
5.1	Galactana e fucana.....	65
5.1.1	Descrição da geometria das ligações glicosídicas.....	65
5.1.2	DM de polissacarídeos de ouriço-do-mar .....	67
5.1.3	Caracterização dos complexos galactana-AT e fucana-AT .....	68
5.2	Estrutura de glicosilação da AT .....	72
5.2.1	Descrição das ligações glicosídicas da estrutura de glicosilação da AT..	73
5.2.2	Descrição da estrutura de glicosilação da AT.....	75
5.2.3	Contatos cristalográficos.....	77
5.3	Simulações por DM na caracterização da estrutura e conformação de carboidratos.....	78
6	Conclusões.....	84
7	Perspectivas.....	85
8	Referências Bibliográficas .....	86
9	Anexos.....	108
9.1	Trabalho III .....	108
9.2	Trabalho IV .....	112
9.3	Arquivos de simulações por DM .....	115
10	Curriculum Vitae .....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

AT – antitrombina  
ATg- estrutura glicosídica da antitrombina  
 $\alpha$ -AT – alfa-antitrombina  
 $\beta$ -AT – beta-antitrombina  
DM – dinâmica molecular  
EPS - exopolissacarídeo  
FDA – Food and Drug Administration  
fIIa – fator IIa ou trombina  
FL - fosfolipídios  
FT – fator tecidual  
fXa – fator Xa  
GAGs – glicosaminoglicanos  
Gal - galactose  
GlcA – ácido glicurônico  
GlcN – glicosamina  
GlcNAg – N-acetilglicosamina  
HBPM – heparina(s) de baixo-peso molecular  
IdoA – ácido idurônico  
Man - manose  
MD – molecular dynamics  
MM – modelagem molecular  
PDB – Protein Data Bank  
PF4 – platelet factor 4  
PME – Particle-Mesh Ewald  
RCL – reactive center loop  
REA – Relação Estrutura-Atividade  
RMN – ressonância magnética nuclear  
Sia – ácido siálico  
TEV – tromboembolismo venoso  
TFPI – tissue factor pathway inhibitor

## RESUMO

A antitrombina (AT) é uma serpina glicoprotéica responsável pela inibição fisiológica das proteases da cascata de coagulação. É o receptor-alvo responsável pela ação anticoagulante da heparina e de outros glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), capazes de potencializar sua ação inibitória sobre, principalmente, fIIa e fXa. Tal modulação da AT por GAGs está associada intrinsecamente à parte sacarídica desta serpina, uma vez que mudanças no seu padrão de glicosilação modulam sua ativação por polissacarídeos.

Em função de efeitos colaterais decorrentes da terapia anticoagulante atualmente disponível, um grande esforço vem sendo dedicado na busca de novos polissacarídeos, capazes de reproduzirem os efeitos terapêuticos da heparina, sem apresentar seus efeitos colaterais. Nesta busca, podem-se incluir polissacarídeos isolados de ouriços-do-mar, como galactanas e fucanas. Particularmente, galactanas 2-sulfatadas, 3-ligadas são anticoagulantes, enquanto que fucanas 2-sulfatadas, 3-ligadas não o são. Contudo, as razões moleculares para tais diferenças ainda permanecem desconhecidas.

Diante do exposto, um dos objetivos deste trabalho reside na caracterização do reconhecimento molecular de GAGs obtidos de fontes animais pela AT, através um estudo de modelagem molecular do perfil conformacional da galactana e da fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas tanto livres em solução aquosa quanto complexadas à AT, utilizando cálculos *ab initio*, cálculos de *docking* receptor-ligante e simulações por dinâmica molecular (DM). Adicionalmente, objetiva-se a descrição do perfil conformacional da estrutura de glicosilação da AT (ATg), através de mapas de contorno e simulações por DM, tendo-se em vista a importância da glicosilação para as propriedades anticoagulantes da AT e da carência de informações conformacionais acerca desta parte da molécula.

As simulações por DM da galactana e da fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas indicam que ambas apresentam perfis conformacionais semelhantes em solução aquosa. Quando complexadas à AT, os dois polissacarídeos apresentam orientações distintas, o que explica as diferenças nas suas atividade anticoagulantes. Com relação às simulações por DM da estrutura glicosídica da AT em solução aquosa, os resultados mostraram que sua conformação em solução

difere significativamente da obtida por métodos de difração de raios-X em cristais. Estes dados evidenciam a existência de distorções na estrutura cristalográfica da AT glicosilada, resultantes de efeitos de empacotamento devido ao cristal.

## ABSTRACT

Antithrombin (AT) is a glycoproteic serpin responsible for physiologic inhibition of coagulation cascade proteases. It is the target receptor responsible for heparin and other glycosaminoglycans (GAGs) anticoagulant activities, capable of potentialize its inhibitory action over, mainly, fIIa and fXa. Such AT modulation by GAGs is intrinsically associated with the saccharidic part of this serpin, since changes on its glycosylation pattern modulate its activation by polisaccharides.

Due to side effects that occur from the use of the available anticoagulant therapy, efforts have been dedicated in the search for new polisaccharides, capable to reproduce heparin therapeutic effects, in the absence of its adverse effects. In this search, can be included polisaccharides isolated from sea urchins, like galactans and fucans. Particularly, 2-sulfated, 3-linked galactans are anticoagulants, while 2-sulfated, 3-linked fucans are not. However, the molecular reasons of such differences are still unknown.

Thus, this work aims the characterization of the molecular recognition pattern of GAGs obtained from animal sources by AT, through a molecular modeling study of 2-sulfated, 3-linked galactan and fucan conformational profiles, free in aqueous solution or complexed with AT, using *ab initio*, ligand-receptor *docking* and molecular dynamics (MD) calculations. Additionally, we purpose the description of the conformational profile of AT glycosylation structure (ATg) using energy contour plots and MD simulations, due to the importance of ATg to AT anticoagulant properties and the lack of conformational information regarding this part of the protein.

2-sulfated, 3-linked galactan and fucan deca-saccharide MD simulations indicate that both polisaccharides present similar conformations in aqueous solution. When complexed with AT, the two polisaccharides present distinct orientations, which explains the differences in its anticoagulant activities. Regarding AT glycosidic structure MD simulations in aqueous solution, the results show that its conformation differs in a great extent from that determined by X-ray crystallographic methods. These data evidenciate the existence of distortions in the crystallographic structure, which results from packing effects.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da cascata de coagulação. Os percussores inativos estão apresentados em letras pretas (protrombina, V, VII, VIII, IX, X e XIII), enquanto as proteínas ativas estão apresentadas em vermelho (trombina, Va, VIIa, VIIIa, IXa, Xa e XIIIa). As setas em vermelho representam alças de retro-alimentação positiva da trombina; as setas pretas, verdes e azuis representam vias de ativação de fatores da coagulação, enquanto as setas em laranja representam vias de inibição de AT sobre trombina e fator Xa. FT: Fator Tecidual; FL: Superfícies fosfolipídicas (Verli, 2005). .....	2
Figura 2: Representação esquemática da $\alpha$ -AT e $\beta$ -AT com as estruturas oligossacarídicas completas modeladas nos respectivos sítios de glicosilação. Figura gerada através do programa GlyProt (Bohne-Lang e von der Lieth, 2005), utilizando a estrutura da AT de código PDB 1E03.....	5
Figura 3: Tipos de estruturas de glicosilação de proteínas. O-glicosilação e N-glicosilação. Ser, serina; Thr, treonina; Asn, asparagina.....	6
Figura 4: Representação esquemática da estrutura de glicosilação da AT. O pentassacarídico central está delimitado por linhas pontilhadas e os braços por linhas contínuas.....	7
Figura 5: Representação estrutural provável da inibição da trombina e fXa na presença de AT e GAGs. Estão ilustrados: o mecanismo envolvendo a ligação da AT à protease pelos polissacarídeos (“Mecanismo de Ponte“ ou <i>Bridging</i> ), e o mecanismo baseado na indução de mudança conformacional na AT pelos polissacarídeos. A AT é mostrada em verde, com sua alça reativa representada em	

laranja. A trombina está indicada em azul, o fXa em amarelo, a heparina em rosa e vermelho e o pentassacarídeo sintético em vermelho e azul.....	8
Figura 6: Representação de um hexassacarídeo de heparina, composto por resíduos de ácidos urônicos (idurônico e glicurônico), e glicosamina (Nader <i>et al.</i> , 2001). ....	10
Figura 7. Estruturas de alguns agentes anticoagulantes apresentados na Tabela 1. fondaparinux (2); idraparinux (3); enoxaparina (4); dalteparina (5); argatroban (6); razaxaban (7); ximelagatran (8); heparan sulfato (9); dermatan sulfato (10).....	13
Figura 8: Representação de dissacarídeos de galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas com resíduos unidos por ligações $\alpha 1 \bullet 3$ (Pereira <i>et al.</i> , 2002). As posições de cada átomo do anel estão indicadas de 1 a 6. A galactana apresenta um grupamento hidroximetila em C-5, enquanto a fucana apresenta um grupamento metila (circulados em verde).....	15
Figura 9: Exemplos de funções de energia que compõem os campos de força. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem o estiramento de ligações químicas, ângulos de ligação, diedros e interações intermoleculares (potencial de Lennard-Jones e interações eletrostáticas).....	19
Figura 10: Estruturas da galactose 2-sulfato, fucose 2-sulfato, unidades sacarídicas que compõem a galactana e a fucana, respectivamente, e manose, galactose, ácido siálico e N-acetilglicosamina, unidades que compõem a estrutura glicosídica da AT. ....	23
Figura 11. Ângulos de torção que definem as ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 6$ e $\alpha 1 \rightarrow 3$ .	25
Figura 12: Esquema das etapas que compõe as simulações de DM a 310K. De 0ps a 30ps, uma série de etapas, de 5ps cada, aquece lentamente o sistema em incrementos de 50K. Após 30ps, o sistema está a 310K e se mantém nesta temperatura pelo restante da simulação (Verli, 2005). ....	27



- Figura 13. Interações da galactana (A) e da fucana (B) com aminoácidos da AT.... 70
- Figura 14. Complexos galactana-AT (A) e fucana-AT (B), no início (vermelho) e após 5.2ns (azul) de simulação de DM. A AT está na mesma orientação em A e em B... 71
- Figura 15. Ângulos de diedro da estrutura glicosídica da AT analisados. As letras representam os dissacarídeos estudados: GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc (A), Man $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc (B), Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man (C, D), Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)GlcNAc (E), Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Man (F), Sia $\beta$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal (G, H), Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)Man (I). Os ângulos de diedro  $\phi$  (vermelho),  $\psi$  (verde) e  $\omega$  (laranja) definem a ligação glicosídica de cada ligação glicosídica..... 74
- Figura 16. Análise populacional do ângulo  $\omega$  após simulações por DM do dissacarídeo Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man. O ângulo  $\omega$  no valor de 180° (verde) corresponde a 52%; 60°(vermelho) corresponde a 31%; e 90° (preto) corresponde a 17%. Variação do ângulo  $\omega$  do dissacarídeo Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man ao longo de 10.000ps de simulação de DM, com o valor inicial para o ângulo  $\omega$  = 180°, 60° e -90° ..... 76

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Agentes anticoagulantes utilizados na terapêutica ou em desenvolvimento. .....	12
Tabela 2: Principais conformações adotadas pelo resíduo de IdoA conforme Recomendações da IUPAC (IUPAC-IUB, 1980) e diedros impróprios utilizados para definir a conformação de hexopiranoses. ....	28
Tabela 3: Ângulos de diedro médios das ligações glicosídicas dos decassacarídeos de galactana e fucana 2-sulfatadas, livres em solução ou complexados à AT. ....	71
Tabela 4: Representação esquemática das cargas atômicas parciais parametrizadas para os resíduos da heparina (IdoA, GlcA e GlcN), para resíduos da estrutura glicosídica da AT (Man, Gal, Sia e GlcNAg), para resíduos da galactana e fucana (Gal e Fuc 2-sulfato) e para resíduos do EPS (Rha2Ac, Rha, Glcp), no campo de força GROMACS. ....	80

# 1 Introdução

## 1.1 A hemostasia e a cascata de coagulação

A hemostasia e a fibrinólise representam os principais mecanismos para controlar o fluxo sanguíneo em casos de lesões mecânicas e danos físicos causados no endotélio vascular e se iniciam em resposta a tais perturbações (Jenny e Mann, 1998; Loscalzo e Schafer, 2003). A hemostasia é o processo responsável pela formação de um tampão hemostático rápido e localizado, na região de lesão vascular, e que culmina na formação de um coágulo insolúvel (Jenny e Mann, 1998; Dahlbäck, 2000). Este processo depende da ativação da coagulação e da agregação plaquetária, associadas à vasoconstrição. Assim, sob condições normais, a hemostasia primária (interação das plaquetas com as paredes dos vasos sanguíneos e formação do tampão plaquetário), a hemostasia secundária (conversão do fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel) e a fibrinólise (degradação do coágulo de fibrina), agem em conjunto para coordenar os eventos da coagulação (Loscalzo e Schafer, 2003).

A coagulação é um processo complexo, que envolve elementos como proteínas plasmáticas, células sanguíneas específicas, complexos enzimáticos pró-coagulantes estruturados (Jenny e Mann, 1998), serino-proteinases (fXIIa, fXIa, fIXa, fXa, fVIIa, trombina), co-fatores protéicos não-enzimáticos (fator tecidual, fVIIIa, fVa, fIII), íons cálcio e superfícies de membrana celular.

Na coagulação, a primeira etapa ocorre a partir da interação do fator VIIa plasmático com o fator tecidual (FT) (Figura 1; Nakagaki *et al.*, 1991), ambos requerendo a presença de um cofator não-protéico (Figura 1). Este co-fator constitui-se de superfícies fosfolipídicas (FL) oriundas principalmente das plaquetas do tampão plaquetário, formando o complexo fVIIa-FT-FL, denominado *Complexo Tenase Extrínseco*. O *Complexo Tenase Extrínseco* exerce atividade catalítica sobre os fatores IX e X, gerando fIXa e fXa. O fator fIXa, por sua vez, também é responsável pela ativação do fator X a Xa, na presença de FL e do cofator protéico não-enzimático fVIIIa, formando o denominado *Complexo Tenase Intrínseco*.

O fator Xa formado tanto pela ação do complexo tenase intrínseco quanto pelo complexo tenase extrínseco tem como função a conversão de protrombina em trombina na presença dos co-fatores FL e fVa, sendo este conjunto de elementos



Em condições normais, os fatores que promovem a coagulação sanguínea estão balanceados por aqueles que a inibem. Em casos de ativação excessiva dos processos hemostáticos normais, ou seja, quando estímulos pró-coagulantes sobrepõem-se aos sistemas anticoagulantes e fibrinolíticos naturais (Colman *et al.*, 2006), pode ocorrer o desenvolvimento de eventos patológicos como a trombose (Furie e Furie, 1992). Em humanos, tais processos são controlados por três grandes moduladores fisiológicos: a proteína C, o TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*, inibidor da via de fator tecidual) e a antitrombina (AT) (Hirsh, 2003).

A via da proteína C é responsável pela inativação dos complexos protrombinase e tenase intrínseco através da inativação de seus respectivos cofatores, os fatores Va e VIIIa (Eaton *et al.*, 1986; Guinto e Esmon, 1984). As células endoteliais expressam na sua superfície a trombomodulina, um receptor de trombina (Esmon, 1989). Uma vez ligada a trombomodulina, a especificidade da trombina é alterada, suas propriedades pró-coagulantes são abolidas e esta passa então, a apresentar atividade anticoagulante ao ativar a proteína C. A inativação dos fatores Va e VIIIa pela proteína C ativada (Esmon, 1989) leva a atenuação da geração de trombina.

O heparan sulfato e outros glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na superfície das células endoteliais contribuem para a ligação do TFPI. O TFPI é um membro da família Kunitz de inibidores enzimáticos (Wun *et al.*, 1988) que bloqueiam o início da coagulação através da inibição do complexo fator tecidual (FT)-fator VIIa de maneira dependente do fator Xa (Broze, 1987; Jenny e Mann, 1998). O principal papel do TFPI é o bloqueio da atividade do complexo tenase extrínseco ao se ligar não-covalentemente ao sítio ativo do fator Xa livre no plasma, inibindo-o reversivelmente (Broze *et al.*, 1988).

Algumas das enzimas geradas durante a ativação da coagulação, como trombina e fator Xa, são inibidas pela AT (Figura 1; Dahlbäck, 2000; Potempa *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995). Como receptor-alvo de agentes anticoagulantes, a estrutura e alguns dos processos que envolvem a AT serão descritos detalhadamente ao longo da presente dissertação.

## **1.2 Estrutura da Antitrombina (AT)**

A AT é membro de uma família de inibidores enzimáticos ou inibidores de serino-proteinases, conhecidos como serpinas (*serpin*, *SER*ine *P*roteinase *I*Nhibitors;

Potempa *et al.*, 1994). Esta serpina é capaz de inibir algumas das serino-proteinases da coagulação, embora seu papel fisiológico envolva principalmente fator Xa e trombina (Olson *et al.*, 1997). A característica principal das proteínas que constituem a família das serpinas é a presença de uma região central, comum entre seus membros, consistindo de 8 a 9  $\alpha$ -hélices e 3 grupos de folhas- $\beta$ . Adicionalmente, a AT contém uma alça reativa na região N-terminal (RCL - *reactive center loop*), a qual é responsável pela atividade inibitória desta serpina sobre as proteases-alvo da cascata de coagulação sanguínea (Gettins, 2002).

A AT humana ocorre na circulação sanguínea como uma glicoproteína que, em decorrência da microheterogeneidade associada à sua parte sacarídica, apresenta mais de sete isoformas (Demelbauer *et al.*, 2004; Plematl *et al.*, 2005). Cada uma das isoformas da AT apresenta menos de 5% de abundância, exceto as duas isoformas majoritárias,  $\alpha$ - e  $\beta$ -AT, as quais apresentam abundâncias entre 82-90% e 4-10%, respectivamente e diferem na quantidade de açúcar ligado à sua parte protéica (Figura 2; Turk *et al.*, 1997; McCoy *et al.*, 2003; Demelbauer *et al.*, 2005).

A  $\beta$ -AT é glicosilada em três resíduos de aminoácidos, nas asparaginas (Asn) 96, 155 e 192, e apresenta uma massa molecular total de cerca 62,6 kDa. A  $\alpha$ -AT apresenta um sítio de glicosilação extra na Asn135 (Figura 2), e alcança massa molecular de 64,8 kDa. Como a massa molecular da AT não glicosilada é 56kDa, as estruturas de glicosilação são responsáveis por um aumento em torno de 12% e 16% na massa total da  $\beta$ - e  $\alpha$ -AT glicosiladas, respectivamente (Franzén *et al.*, 1980; McCoy *et al.*, 2003; Mizuochi *et al.*, 1980). A glicosilação incompleta da  $\beta$ -AT na Asn135, é devida a presença de um resíduo de serina no lugar de uma treonina na seqüência consenso de reconhecimento para adição do oligossacarídeo no sítio da Asn135 (Picard *et al.*, 1995).

A  $\beta$ -AT está ligada às paredes dos vasos sanguíneos em maior grau do que a  $\alpha$ -AT e apresenta maior afinidade pela heparina em um fator em torno de 13 vezes em relação à  $\alpha$ -AT. Assim, a  $\beta$ -AT funciona como inibidor majoritário *in vivo* e é considerada a forma fisiológica mais importante da AT, apesar de ser uma das isoformas menos abundante (Witmer *et al.*, 1991). Além destas propriedades, a glicosilação exerce um papel importante no controle da degradação da AT, uma vez que na ausência das estruturas de glicosilação o tempo de meia-vida da AT é extremamente reduzido *in vivo* (McCoy *et al.*, 2003; Garone *et al.*, 1996).

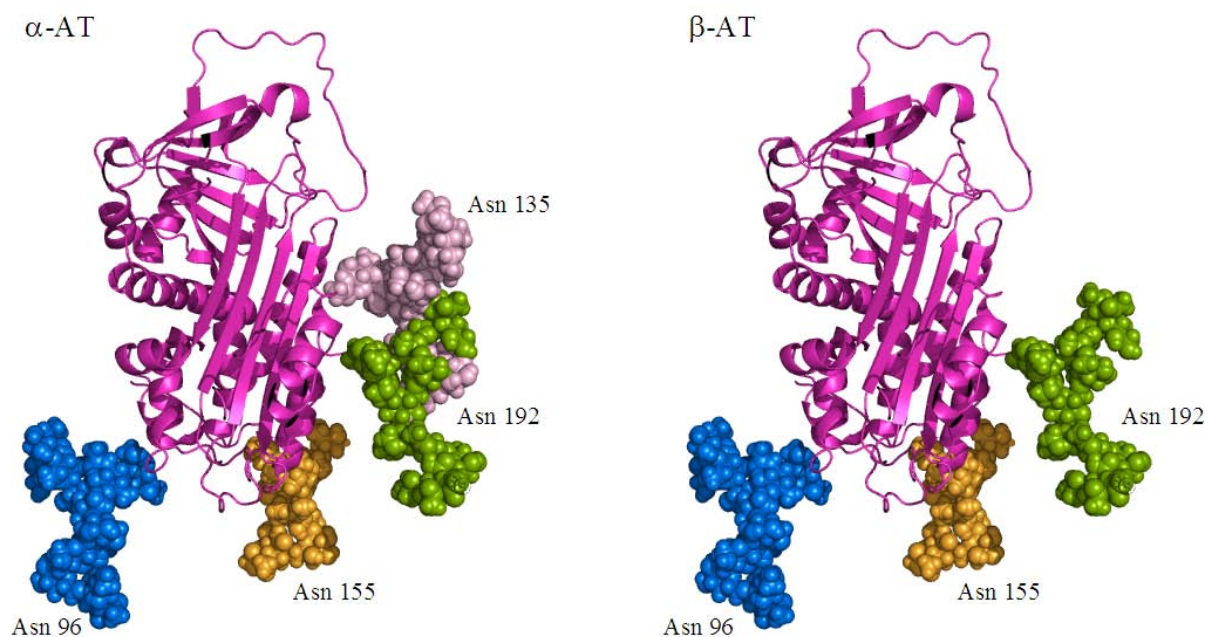


Figura 2: Representação esquemática da  $\alpha$ -AT e  $\beta$ -AT com as estruturas oligossacarídicas completas modeladas nos respectivos sítios de glicosilação. Figura gerada através do programa GlyProt (Bohne-Lang e von der Lieth, 2005), utilizando a estrutura da AT de código PDB 1E03.

### 1.3 Glicosilação de proteínas

A glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais frequentes em proteínas, sendo que mais da metade das proteínas conhecidas, por apresentarem a seqüência consenso para ligação de oligossacarídeos N-ligados, podem potencialmente ser modificadas por glicosilação (Apweiler *et al.*, 1999). Existe uma grande variedade de estruturas glicosídicas, e a sua diversidade e complexidade estruturais são geradas através da variação nos padrões de substituição (níveis de acetilação, metilação, sialilação, fosforilação e sulfatação), nos graus de ramificação, nos tipos de monossacarídeos terminais, nas conformações dos anéis de 6 membros (Cremer e Szabo, 1995) e nos tipos, número e posição dos resíduos individuais (Imberty e Pèrez, 2000; Helenius e Aebi, 2001).

Existem dois tipos principais de glicosilação: a O-glicosilação, em que a parte glicosídica está ligada a um grupamento hidroxila de um resíduo de serina (Ser) ou treonina (Thr), e a N-glicosilação, onde a parte glicosídica está ligada à função amida de um resíduo de Asn presente na seqüência consenso Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer resíduo de aminoácido, exceto prolina (Figura 3).

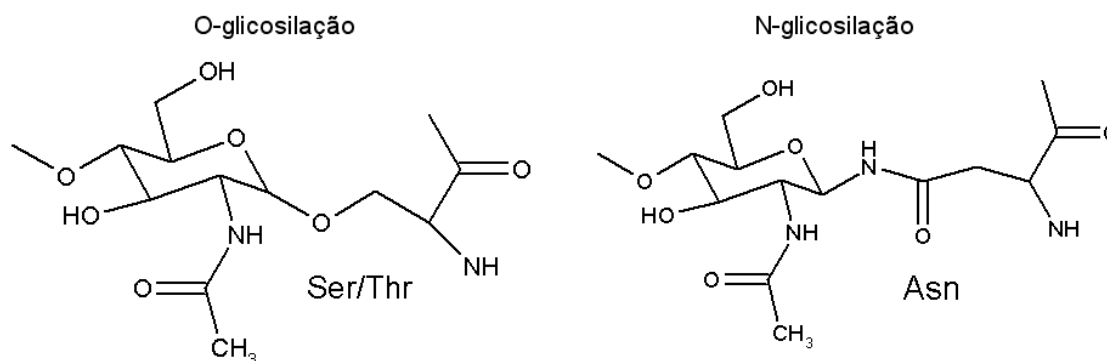


Figura 3: Tipos de estruturas de glicosilação de proteínas. O-glicosilação e N-glicosilação. Ser, serina; Thr, treonina; Asn, asparagina.

Glicoproteínas com oligossacarídeos N-ligados (N-glicanas) são as mais abundantes na natureza. Estes oligossacarídeos são, em geral, polímeros ramificados contendo de 6 a 15 monossacarídeos, os quais podem ser resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos por ligações  $\alpha 1 \rightarrow 4$ , e de manose (Man) unidas através de ligações  $\alpha 1 \rightarrow 2$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 3$  e  $\alpha 1 \rightarrow 6$  (Qasba *et al.*, 1997; Varki *et al.*, 1999). Inicialmente, cada N-oligossacarídeo é sintetizado como núcleo pentassacarídico, cuja estrutura  $\text{GlcNAc}(\alpha 1 \rightarrow 6)[\text{GlcNAc}(\alpha 1 \rightarrow 3)]\text{Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$  (Figura 4) é comum para a maioria dos oligossacarídeos N-ligados (Gahmberg e Tolvanen, 1996; Helenius *et al.*, 1997; Qasba *et al.*, 1997; Helenius e Aebi, 2001).

A estrutura glicosídica da AT está incluída no subtipo complexo de oligossacarídeos N-ligados, sendo também classificados como oligossacarídeos bi-antennais, com resíduos de ácido siálico (Sia) presentes nas extremidades não redutoras de ambas “antenas” ou “braços” (Figura 4, *arms*). Contém ainda resíduos de Man, galactose (Gal) e GlcNAc, estando o último ligado às Asn da AT (Figura 4A). As posições e configurações das ligações glicosídicas foram descritas por Franzén e colaboradores (Franzén *et al.*, 1980; Figura 4). Adicionalmente, considerando-se todos os sítios de N-glicosilação, as estruturas oligossacarídicas são idênticas entre si na  $\alpha$ -AT e na  $\beta$ -AT

Apesar da ausência de um método universal para a determinação precisa da estrutura de oligossacarídeos (Mrksich, 2004), as estruturas terciárias de muitos oligossacarídeos podem ser elucidadas através de métodos de cristalografia de raios-X. Contudo, poucos dos estudos realizados incluem os oligossacarídeos associados à proteína de interesse, principalmente pelo fato de que as cadeias de



carboidratos podem impedir o crescimento dos cristais e assim, são geralmente clivadas antes da cristalização das proteínas (von der Lieth *et al.*, 2006). Além disso, carboidratos são moléculas com elevada flexibilidade e, conseqüentemente, pelo fato de nos métodos de cristalografia de raios-X, as posições atômicas poderem ser deduzidas a partir da intensidade das difrações, a detecção de dados referentes à sua densidade eletrônica é limitada (Milane, 1990; von der Lieth *et al.*, 2006). Uma exceção é o caso da AT, cuja estrutura de glicosilação pôde ser confirmada por métodos de cristalografia de raios-X (McCoy *et al.*, 2003).

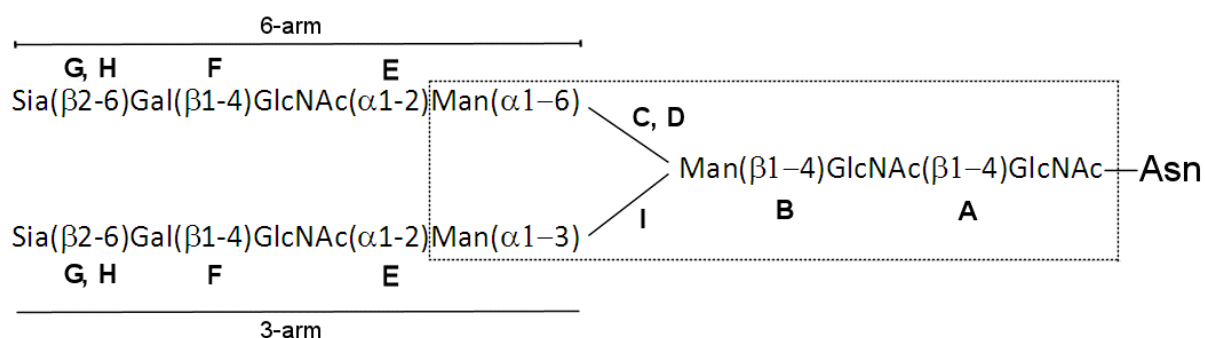


Figura 4: Representação esquemática da estrutura de glicosilação da AT. O pentassacarídico central está delimitado por linhas pontilhadas e os braços por linhas contínuas.

#### 1.4 Mecanismo de modulação da AT por GAGs

A AT é relativamente inativa como inibidor das proteases da cascata de coagulação sanguínea, circulando na corrente sangüínea em uma conformação inativa (Huntington *et al.*, 1996). Para que sua ativação ocorra, a AT requer a ligação de um glicosaminoglicano polissulfatado (GAG), o qual pode ser um co-fator fisiológico como o heparan sulfato (Zehnder e Galli, 1999) ou um co-fator terapêutico, como a heparina. Assim, quando a heparina se liga à AT, esta inibe a trombina ou o fator Xa através da formação de um complexo ternário heparina-protease-AT (Olson e Björk, 1994; Gettins, 2002; Figura 5).

O primeiro mecanismo de interação pelo qual a heparina é capaz de modular a atividade da AT, constitui-se no mecanismo de "ponte", que atribui a potencialização da atividade inibitória da AT sobre suas proteases-alvo a uma conexão física entre as duas proteínas (Jin *et al.*, 1997; Carrel *et al.*, 1994) e leva à formação do complexo ternário AT-trombina-heparina (Figura 5). Este mecanismo é determinado principalmente por interações eletrostáticas entre grupos sulfato da heparina e

resíduos de aminoácidos carregados positivamente na AT e nas proteases (Petitou *et al.*, 1999). Neste mecanismo, a eficiência da aproximação da AT à (s) protease (s) depende do tamanho da cadeia polissacarídica da heparina (Lin *et al.*, 2001).

O segundo mecanismo pelo qual a heparina modula a AT (Figura 5) consiste na ativação alostérica, a qual baseia-se na indução de mudanças conformacionais na proteína (AT). Dentre outras modificações conformacionais na AT (Jin *et al.*, 1997; Gettins, 2002), o principal resultado é a exposição da alça reativa (RCL), o que aumenta sua reatividade em relação à protease-alvo. Este mecanismo é dependente dos resíduos que compõem a cadeia polissacarídica e de seu padrão de sulfatação, ou seja, depende da afinidade da seqüência de resíduos que compõem o polissacarídeo pela AT (Streusand *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2001).

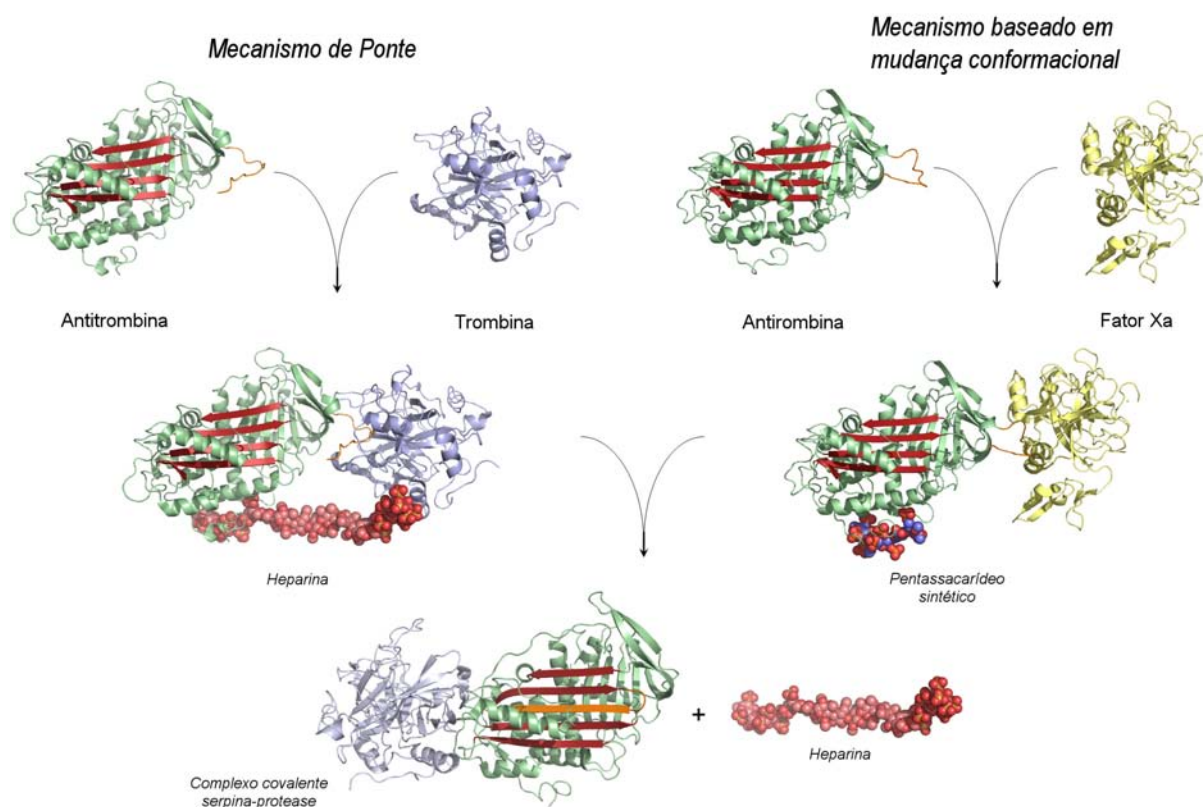


Figura 5: Representação estrutural provável da inibição da trombina e fXa na presença de AT e GAGs. Estão ilustrados: o mecanismo envolvendo a ligação da AT à protease pelos polissacarídeos ("Mecanismo de Ponte" ou *Bridging*), e o mecanismo baseado na indução de mudança conformacional na AT pelos polissacarídeos. A AT é mostrada em verde, com sua alça reativa representada em laranja. A trombina está indicada em azul, o fXa em amarelo, a heparina em rosa e vermelho e o pentassacarídeo sintético em vermelho e azul.

As serpinas inibitórias são substratos suicidas e, assim, em ambos mecanismos de potencialização da atividade inibitória da AT sobre as proteases ocorre a ligação irreversível da AT às suas proteases-alvo, resultando na formação de um complexo covalente serpina-protease (Figura 5; Gettins, 2002).

A inibição da trombina ocorre essencialmente através do mecanismo de “ponte” e, para tal, é necessário um polissacarídeo suficientemente longo, composto de no mínimo dezoito unidades monossacarídicas (Lane *et al.*, 1986; Danielson *et al.*, 1986; Olson *et al.*, 1992). A trombina parece ser pouco sensível à ativação alostérica, contudo, o mecanismo de molde é pré-requisito para acelerar a reação desta protease com a AT (Gettins, 2002). Em contrapartida, o fator Xa é sensível destacadamente à modulação alostérica, pois é inibido mesmo na presença de cadeias polissacarídicas menores (menos de 10 unidades monossacarídicas), como é o caso das heparinas de baixo peso molecular (HBPM). O requisito estrutural mínimo necessário à inibição do fator Xa na presença de AT, é uma seqüência pentassacarídica específica na heparina (Choay *et al.*, 1983; Jin *et al.*, 1997; Lindahl *et al.*, 1983; Thunberg *et al.*, 1982).

### **1.5 Agentes terapêuticos no tratamento de hipercoagulopatias**

A terapia anticoagulante é utilizada para a prevenção e tratamento do tromboembolismo venoso e de outras complicações tromboembólicas e cardiovasculares (Weitz e Hirsh, 2003). Atualmente, a terapia imediata utiliza agentes anticoagulantes parenterais como heparina, HBPM, ou fondaparinux, e a terapia prolongada geralmente envolve a administração concomitante de um agente anticoagulante oral como a varfarina.

A heparina foi identificada e isolada em 1916 por McLean (McLean, 1916), a partir de uma preparação de fígado de cães (Nader *et al.*, 2001), recebendo esta denominação por estar presente em abundância em tecidos hepáticos. Nos anos 1950 foi sugerido que a atividade da AT era acelerada pela heparina (Monkhouse *et al.*, 1955; Waugh e Fitzgerald, 1956), fato confirmado posteriormente com o isolamento da AT (Abildgaard, 1968). Em função da demonstração das suas potentes propriedades anticoagulantes (McLean, 1916), a heparina é utilizada clinicamente há mais de 40 anos como agente anticoagulante e antitrombótico (Jaques, 1979). Atualmente, o mecanismo de ação da heparina é conhecido e sua atividade anticoagulante deve-se à sua capacidade em potencializar a ação inibitória

da AT sobre as serino-proteínases da cascata de coagulação sangüínea, como trombina e fator Xa (Jin *et al.*, 1997; Olson e Björk, 1994; Gettins, 2002), formando com estas proteínas um complexo ternário.

As preparações comerciais de heparina são obtidas a partir da mucosa intestinal de suínos e bovinos e de pulmões de bovinos (Nader *et al.*, 2001). A estrutura básica da heparina foi pioneiramente proposta por Dietrich e colaboradores (Dietrich *et al.*, 1973) em 1973, quando caracterizavam produtos obtidos a partir da heparina por ação de enzimas de *Flavobacterium heparinum*. A heparina é um GAG aniônico polissulfatado composto por unidades dissacarídicas repetitivas (1→4)-ligadas, contendo ácidos urônicos ( $\alpha$ -L-ácido idurônico 2-sulfato, IdoA, ou  $\beta$ -D-ácido glicurônico não-sulfatado, GlcA) e glicosamina 2,6-disulfato, GlcN (Lindahl e Axelson, 1971; Silva e Dietrich, 1975; Hirsh *et al.*, 1998; Nader *et al.*, 2001; Figura 6). Esta sequência dissacarídica é a unidade principal da molécula de heparina.

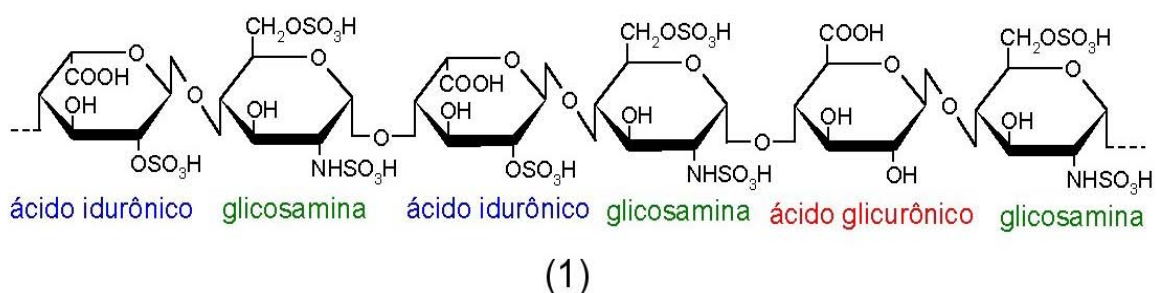


Figura 6: Representação de um hexassacarídeo de heparina, composto por resíduos de ácidos urônicos (idurônico e glicurônico), e glicosamina (Nader *et al.*, 2001).

A heparina é uma complexa mistura de moléculas que diferem não apenas no tamanho de suas cadeias, mas também na seqüência das suas unidades monossacarídicas e nos padrões de substituição das mesmas (Alban, 2005). A massa molecular de suas cadeias varia de 5 kDa a 30 kDa, com uma massa molecular média de 15 kDa, referente a aproximadamente 30 unidades monossacarídicas (Hirsh *et al.*, 1998). Algumas dificuldades foram observadas com o uso clínico contínuo da heparina: necessidade de monitoramento constante, em função de efeitos anticoagulantes variáveis, inabilidade de inibição de trombina ligada à fibrina e indução de trombocitopenia (TIH; Nader *et al.*, 2001).

Na década de 1980 iniciou-se o uso terapêutico das HBPMs, o que proporcionou a ampliação das possibilidades de profilaxia e tratamento de

desordens tromboembólicas. As HBPM contêm a mesma estrutura básica da heparina, contudo, o número de resíduos de monossacarídeos é reduzido (massa molecular média que varia de 4-6 kDa; Hirsh *et al.*, 1998), pois são obtidas através de diversos métodos de despolimerização da heparina convencional (Nader *et al.*, 2001). Os métodos de fragmentação da heparina geram produtos com proporção variável de cadeias polissacarídicas, as quais exibem propriedades estruturais, funcionais e biológicas distintas (Jeske *et al.*, 1998). As HBPMs, embora menos potentes, são mais efetivas e seguras que a heparina na profilaxia em pacientes com elevado risco de trombose (Geerts *et al.*, 2001), o que caracteriza redução nos custos pois não há necessidade de internação hospitalar (Levine *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 1999; Ageno e Turpie, 2003; Jay e Geerts, 2003). Contudo, alguns problemas associados ao uso das HBPMs, como o risco de trombocitopenia, ainda persistem (Herbert *et al.*, 2001).

Com o aumento dos estudos acerca da estrutura e funções da heparina foram realizados os primeiros trabalhos objetivando entender a estrutura do sítio de ligação da AT e identificar a menor sequência capaz de inibir o fator Xa (Petitou *et al.*, 2003). O resultado foi a identificação da seqüência pentassacarídica específica que é relatada como a estrutura mínima da heparina responsável por sua atividade anticoagulante (Choay *et al.*, 1983). A identificação desta seqüência levou ao desenvolvimento e comercialização do pentassacarídeo sintético denominado fondaparinux, como um novo fármaco antitrombótico sob o nome comercial Arixtra® (van Boeckel e Petitou, 1993; Bauer *et al.*, 2002; Cheng, 2002; Kort *et al.*, 2005). O fondaparinux, além de ser de origem sintética, apresenta relação dose-efeito mais previsível e menor capacidade de induzir trombocitopenia e osteoporose do que a heparina, embora tenha custo mais elevado (Weitz, 2006).

As estratégias anticoagulantes modernas visam inibir a trombogênese, focando principalmente em: (a) bloquear o início da coagulação pelo complexo fator VIIa/fator tecidual; (b) prevenir a geração de trombina através da atenuação da propagação da coagulação; ou (c) inibição da trombina, a enzima-chave do sistema de coagulação, pois exerce papel central na coagulação e na ativação de plaquetas (Weitz e Hirsh, 2003). Neste sentido, novos compostos anticoagulantes vêm sendo desenvolvidos visando enzimas ou etapas específicas na via da coagulação. Os novos anticoagulantes incluem inibidores da via do fator VIIa/fator tecidual, inibidores

dos fatores Va e VIIa, do fator Xa (diretos ou indiretos) ou de trombina (diretamente ou indiretamente através da ativação da AT; Tabela 1; Figura 7; Weitz, 2006).

Tabela 1: Agentes anticoagulantes utilizados na terapêutica ou em desenvolvimento.

<b>Alvo molecular</b>	<b>Agente e referência</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Inibidores da via do fator VIIa/fator tecidual <sup>a</sup>	<b>TFPI recombinante<sup>e</sup></b>	Inibidor da via do fator tecidual: inibe a formação do complexo fator Xa/Fator Tecidual (FT)
	<b>NAPc2<sup>f</sup></b>	Peptídeo nematódeo anticoagulante que liga-se no sítio ativo do fator X. O complexo resultante inibe o fator VIIa do complexo fator Xa/FT
	<b>Factor VIIa<sup>g</sup></b>	Compete com o fator VIIa por ligação ao FT
Inibidores dos fatores Va e VIIa <sup>a</sup>	<b>APC<sup>h</sup></b> (Proteína C Ativada)	Modula geração de trombina por inativação dos fatores Va e VIIIa
	<b>Trombomodulina solúvel<sup>i</sup></b>	Análogo recombinante que converte a trombina em um potente ativador de proteína C
Inibidores indiretos de fator Xa <sup>b,c</sup>	<b>Fondaparinux<sup>l</sup></b>	Análogo sintético da sequência pentassacarídica que media a interação da heparina com a AT
	<b>Idraparinux<sup>j</sup></b>	Derivado hiper-metilado do Fondaparinux
Inibidores diretos de fator Xa <sup>b</sup>	<b>DX-9065a<sup>l</sup></b>	Inibidor de baixo peso molecular não-peptídico que liga-se irreversivelmente ao sítio ativo do fator Xa
	<b>Razaxaban<sup>m</sup></b>	Aminobenzisoxazol ativo por via oral, que liga-se ao fator Xa com alta afinidade
	<b>BAY 59-7939<sup>n</sup></b>	Ativo via oral, inibidor do sítio-ativo do fator Xa
Inibidores diretos de trombina <sup>b</sup>	<b>Hirudina<sup>o</sup></b>	Inibidor bivalente irreversível: domínio C-terminal liga-se ao exossítio 1 e N-terminal interage com sítio ativo da trombina
	<b>Bivalirudina<sup>p</sup></b>	Polipeptídeo sintético análogo a hirudina
	<b>Argatroban/ Melagatran<sup>q</sup></b>	Inibidores competitivos da trombina, ligam-se não-covalentemente à trombina, formando complexos reversíveis
	<b>Ximelagatran<sup>r</sup></b>	Primeiro inibidor ativo por via oral, pró-fármaco do inibidor direto de trombina megalatran
Inibidores indiretos de trombina <sup>b,d</sup>	<b>Derivados da heparina</b>	Heparina, HBPMs (enoxaparina, dalteparina), fondaparinux e derivados semi-sintéticos da heparina
	<b>GAGs não-derivados da heparina</b>	Dermatan sulfato, heparan sulfato, condroitina sulfato e heparinóides
	<b>Compostos sulfatados</b>	Ácido lactobiônico, fucanas e galactanas

<sup>a</sup>Inibidores do início da coagulação

<sup>b</sup>Inibidores da propagação da coagulação, atenuam geração de trombina livre ou ligada à fibrina;

<sup>c</sup>A heparina, o Fondaparinux e as HBPMs são inibidores indiretos de fator Xa;

<sup>d</sup>Adaptado de Nader *et al.*, 2001; <sup>e</sup>Broze, 1995; <sup>f</sup>Cappello *et al.*, 1995; <sup>g</sup>Lee e Vlasuk, 2003; <sup>h</sup>Taylor, 1996; <sup>i</sup>Esmon *et al.*, 1997; <sup>j</sup>Parkinson *et al.*, 1990; <sup>k</sup>Moll *et al.*, 2004; <sup>l</sup>Rezaie, 2001; <sup>m</sup>Herbert *et al.*, 1996; <sup>n</sup>Murayama *et al.*, 1999;

<sup>o</sup>Lassen *et al.*, 2003; <sup>p</sup>Kubitza *et al.*, 2005; <sup>q</sup>Wallis, 1996; <sup>r</sup>Maraganore *et al.*, 1990; <sup>s</sup>Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1991; <sup>t</sup>Weitz e Crowther, 2002; <sup>u</sup>Hursting *et al.*, 1997; <sup>v</sup>Gustaffson *et al.*, 2001.

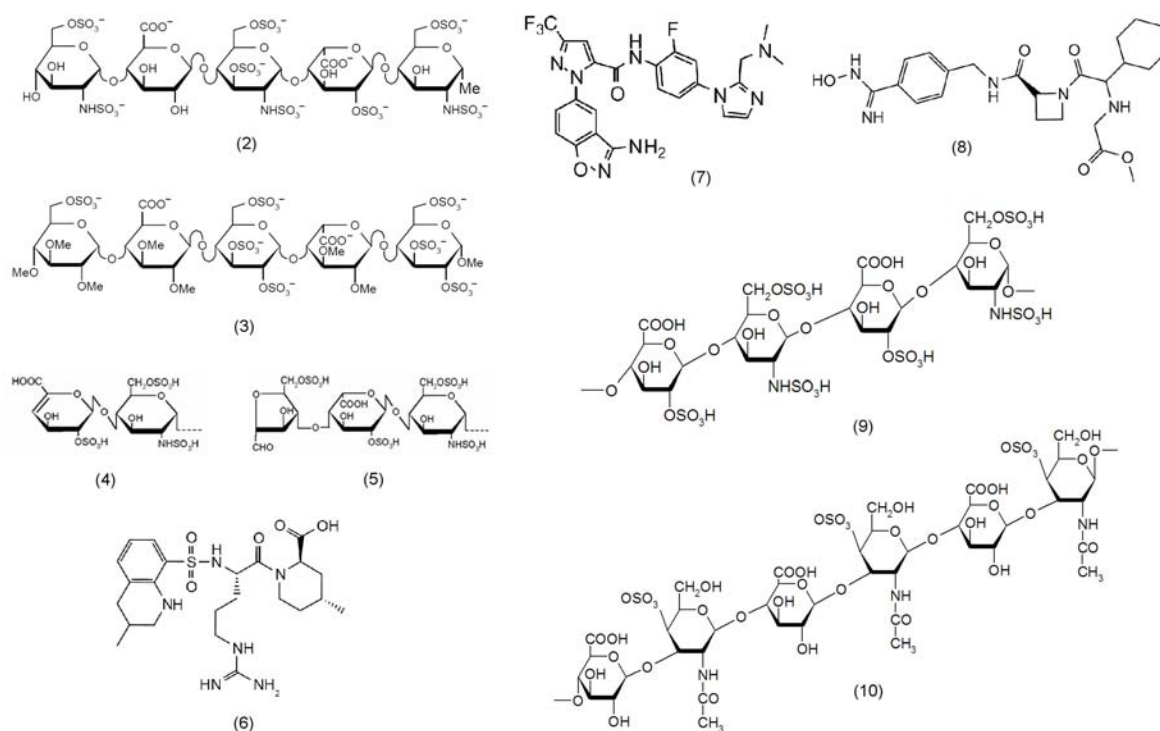


Figura 7. Estruturas de alguns agentes anticoagulantes apresentados na Tabela 1. fondaparinux (2); idraparinux (3); enoxaparina (4); dalteparina (5); argatroban (6); razaxaban (7); ximelagatran (8); heparan sulfato (9); dermatan sulfato (10).

Devido ao desenvolvimento do fondaparinux e baseado no entendimento detalhado da formação do complexo ternário da heparina com a AT e trombina, a pesquisa trombotoprolíptica tem buscado o desenvolvimento de polissacarídeos sulfatados e/ou substâncias heparina-*like*, tanto naturais quanto sintéticas. Estes avanços na terapia anticoagulante incluem as HBPM, heparinóides, inibidores diretos de trombina, além de inibidores de fator Xa mediados pela AT (Kort *et al.*, 2005) e heparan e dermatan sulfato (Drozd *et al.*, 2001; Tabela 1; Figura 7). Outras fontes possíveis de polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante são as algas marinhas marrons e os invertebrados marinhos, de onde a fucana e a galactana 2-sulfatadas, 3-ligadas podem ser obtidas (Alves *et al.*, 1997; Bertheau e Mulloy, 2003; Pereira *et al.*, 2002a; Pereira *et al.*, 2002b; Vilela-Silva *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de anticoagulantes alternativos que atuam através da AT, embora representem avanços significativos em relação a alguns aspectos do tratamento convencional de hipercoagulopatias (Walenga *et al.*, 2003), não reproduziram as ações politerapêuticas da heparina em muitas indicações e não são capazes de inibir a trombina. Outro fator importante refere-se à capacidade da

heparina inibir além da trombina, o fator Xa e outras serino-proteases da cascata de coagulação sanguínea. Assim, existe a necessidade do desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes, mais eficazes, seguros e com menos efeitos colaterais e acredita-se que as heparinas e seus derivados continuarão a apresentar papel fundamental na prevenção e no tratamento global das desordens trombóticas (Fareed *et al.*, 2000).

A busca por carboidratos antitrombóticos com complexidade reduzida, para facilitar sínteses posteriores, e com potentes atividades farmacológicas, tem sua atenção dirigida para análogos da heparina obtidos de fontes naturais (Kort *et al.*, 2005). A observação de que alguns agentes, como as galactofucanas, não apresentam atividade hemorrágica, as torna candidatas ideais e contribuem para estudos contínuos desta classe de polissacarídeos para o desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes (Rocha *et al.*, 2005). Assim, a atividade anticoagulante mediada pela galactana 2-sulfatada, 3-ligada através da AT, bem como sua simplicidade estrutural, mostram que estas substâncias podem auxiliar no desenho de novos protótipos de fármacos com ações específicas na coagulação e na trombose (Melo *et al.*, 2004).

### **1.6 Galactana e Fucana**

A galactana e a fucana são polissacarídeos sulfatados que apresentam atividades biológicas potentes e estão entre os polissacarídeos mais abundantes de origem não-mamífera encontrados na natureza (Pereira *et al.*, 2002b; Melo *et al.*, 2004). As fucanas foram pioneiramente isoladas de algas marinhas marrons em 1913 (Killing, 1913). Estes polissacarídeos estão entre os compostos mais amplamente estudados frente à fisiologia de mamíferos, mesmo sendo originados de organismos evolutivamente distantes como os ouriços-do-mar (Pereira *et al.*, 1999). Dentre as principais fontes da obtenção destes polissacarídeos sulfatados, estão as algas marinhas. Contudo, nestes organismos as estruturas da galactana e da fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas são heterogêneas e complexas, e as suas unidades de repetição não são facilmente deduzíveis (Mourão, 2004), pois os espectros de RMN gerados para estes polissacarídeos são de difícil resolução e interpretação (Patankar *et al.*, 1993; Mulloy *et al.*, 1994).

Outra fonte de obtenção destes polissacarídeos são os invertebrados marinhos (Vasseur, 1948), especialmente algumas espécies de ouriços do mar



(equinodermos), como *S. franciscanus* e *E. lucunter*. Em contraste com as galactanas e fucanas obtidas de algas marinhas, nos invertebrados marinhos estes polissacarídeos apresentam estruturas simples, lineares e regulares, ou seja, com unidades repetitivas bem definidas, diferindo nos padrões de sulfatação específicos e/ou na posição das ligações glicosídicas entre as suas unidades constituintes (Alves *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1999; Vilela-Silva *et al.*, 1999; Vilela-Silva *et al.*, 2002).

As estruturas da galactana e da fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas obtidas das espécies *E. lucunter* e *S. franciscanus*, respectivamente (Figura 8), têm seus monossacarídeos unidos através de ligações glicosídicas  $\alpha 1 \rightarrow 3$  e são sulfatadas na posição C-2. A única diferença entre a galactana e fucana reside na presença de um grupamento hidroximetila na posição C-5 da estrutura da galactana sulfatada, enquanto que a fucana sulfatada apresenta apenas um grupamento metila.

As galactana e a fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas, apesar de apresentam unidades sacarídicas não relacionadas à composição da heparina, possuem significativas propriedades anticoagulantes envolvendo serpinas plasmáticas (Pereira *et al.*, 2002). Contudo, o papel fisiológico destes polissacarídeos nos invertebrados marinhos, principalmente dos ouriços marinhos, está relacionado com a indução da reação acrossômica (RA) no esperma dos mesmos. Estes polissacarídeos estão presentes nos ovos destes organismos e são indutores espécie-específicos desse evento essencial para a fertilização (Alves *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 1998; Vilela-Silva *et al.*, 1999; Vilela-Silva *et al.*, 2002).

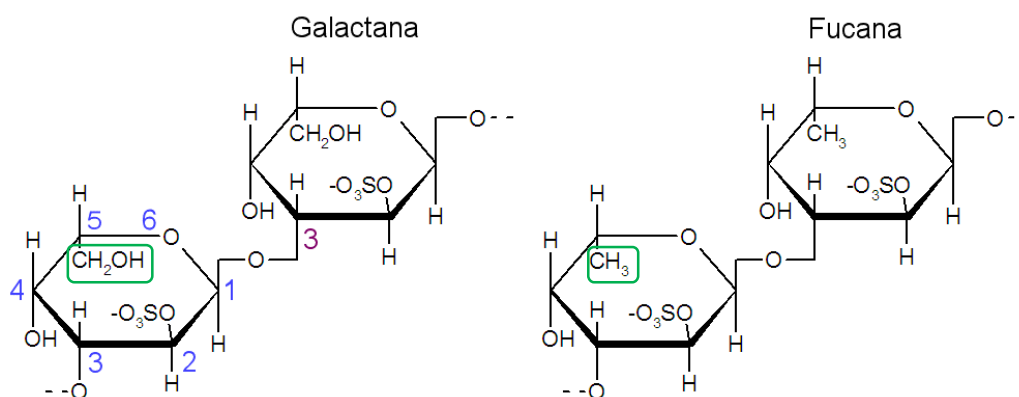


Figura 8: Representação de dissacarídeos de galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas com resíduos unidos por ligações  $\alpha 1 \rightarrow 3$  (Pereira *et al.*, 2002). As posições de cada átomo do anel estão indicadas de 1 a 6. A galactana apresenta um grupamento

hidroximetila em C-5, enquanto a fucana apresenta um grupamento metila (circulados em verde).

A atividade de tais compostos nos invertebrados marinhos é espécie-dependente, visto que para a fucana da espécie *S. franciscanus* o requerimento estrutural principal é a sulfatação na posição 2. Esta relação é confirmada pelo fato de que a galactana 2-sulfatada de *E. lucunter* e a fucana 2-sulfatada são igualmente potentes na indução da reação acrossômica dos ouriços *S. franciscanus*, ou seja, o esperma de *S. franciscanus* reage igualmente com a fucana homóloga e com a galactana heteróloga (Hirohashi *et al.*, 2002). Assim, a reatividade do esperma não correlaciona-se apenas com a densidade de carga da fucana, mas com a proporção de sulfatação na posição C-2 (Vilela-Silva *et al.*, 1999). Logo, o padrão de sulfatação parece ser uma característica importante para o reconhecimento das fucanas pelo receptor presente no esperma e assim contribui para a fertilização espécie-específica (Vilela-Silva *et al.*, 1999; Vilela-Silva *et al.*, 2002). Contudo, as modificações nas posições C-5 não parecem ser importantes para o reconhecimento dos receptores no esperma de *S. franciscanus*, de forma que neste sistema não há distinção entre as unidades de L-galactose e L-fucose.

As características estruturais diversas determinam não apenas a potência anticoagulante das fucanas provenientes de invertebrados marinhos, mas também o mecanismo pelo qual exercem sua atividade. Fucanas ramificadas provenientes de algas marinhas são inibidores diretos de trombina, enquanto as fucanas de invertebrados marinhos requerem a presença da AT ou do co-fator II da heparina para a inibição da trombina (Pereira *et al.*, 1999).

Apesar da enorme semelhança estrutural entre a galactana e a fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas, apenas a galactana apresenta potente atividade anticoagulante (Pereira *et al.*, 2002a). Contudo, a galactana é menos potente que a heparina, pois o IC<sub>50</sub> para inibição de trombina ou fator Xa pela AT é 3,0 µg/mL e 20,0 µg/mL na presença de galactana, e 0,02 µg/mL e 0,02 µg/mL na presença de heparina, respectivamente (Pereira *et al.*, 2002a). A fucana então, parece não apresentar atividade anticoagulante, pois mostra apenas uma modesta ação através da AT e necessita doses elevadas para que se possa observar baixa atividade anticoagulante (Pereira *et al.*, 2002a).

Sugere-se que os mecanismos anticoagulantes mediados pela  $\alpha$ -L-galactana ocorram, assim como a heparina, através da potenciação da atividade inibitória da AT sobre as proteases da cascata de coagulação (Melo *et al.*, 2004). Esta inibição ocorre possivelmente, através do mecanismo de ponte, visto que galactana é menos efetiva que a heparina na indução de mudanças conformacionais na AT (Melo *et al.*, 2004). Além disto, apenas galactanas com cadeias maiores que 45 kDa são capazes de ligar-se tanto ao inibidor (AT) quanto à protease-alvo (trombina ou fator Xa; Melo *et al.*, 2004), enquanto que para a heparina, a massa molecular mínima necessária para potenciação da atividade inibitória da AT é 5,4 kDa (Danielsson *et al.*, 1986).

Os requerimentos estruturais para a atividade anticoagulante destes polissacarídeos indicam que para a interação dos mesmos com co-fatores e proteínas-alvo da coagulação são específicas e não dependem apenas do padrão de sulfatação e da densidade de carga dos seus resíduos (Pereira *et al.*, 2002b). Contudo, as razões moleculares responsáveis por explicar os efeitos de substituições na posição C-5 nas propriedades biológicas ainda não foram apontados. Assim, dois polissacarídeos estruturalmente semelhantes, expressam atividades biológicas distintas em dois diferentes sistemas: ambos polissacarídeos são capazes de realizar a indução da reação acrossômica, enquanto apenas a  $\alpha$ -L-galactana apresenta atividade anticoagulante. Para entender estas discrepâncias, é importante identificar as características estruturais e conformacionais responsáveis pelas diferenças nas atividades destes polissacarídeos. Elucidadas estas questões mecanísticas, a  $\alpha$ -L-galactana e a  $\alpha$ -L-fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas provenientes de ouriços-do-mar, apresentam potencial para tornarem-se novos arcaibouços para o desenvolvimento de novos protótipos a fármacos antitrombóticos.

### **1.7 Caracterização conformacional de biomoléculas por dinâmica molecular (DM)**

Segundo a IUPAC, “A modelagem molecular (MM) é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares utilizando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias” (Sant’Anna, 2002). Dentre os métodos de MM, estão incluídas as simulações por dinâmica molecular (DM), cujo uso para descrever sistemas protéicos iniciou-se há aproximadamente 25 anos (Ponder e Case, 2003). A DM é uma metodologia computacional utilizada para investigar a

estrutura, a dinâmica e as propriedades de moléculas, permitindo desde o estudo de ligação de compostos às suas proteínas-alvo e mecanismos de reação, até a desnaturação e o re-enovelamento de proteínas (Ponder e Case, 2003).

Resultados experimentais, obtidos a partir de estudos cristalográficos, são modelos estruturais primariamente estáticos. As propriedades obtidas a partir da movimentação dinâmica de moléculas, através de simulações por DM, permitem melhorar a descrição das moléculas e dos processos biológicos nos quais estão envolvidas, em relação aos métodos de difração de raios-X e de RMN. As simulações por DM são úteis para a identificação da movimentação preferida de pequenas moléculas ou ligantes, carboidratos, DNA e proteínas, fornecendo informações sobre o comportamento das mesmas e da interação entre elas (Cohen *et al.*, 1990), através da representação das condições fisiológicas.

A DM é um procedimento que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula de acordo com as leis de movimento de Newton. A geração de uma trajetória dos átomos em função do tempo, na forma de uma lista de posições e velocidades (Leach, 2001) ocorre através da integração sucessiva da equação:  $d^2r_i(t)/dt^2 = F_x/m_i$ , sendo  $d^2r_i(t)/dt^2$  a aceleração,  $m_i$  a massa e  $F_i$  a força sobre o átomo  $i$  (Leach, 2001). Esta integração será realizada sobre todos os átomos do sistema, de forma que a força  $F_i$  acarretará numa aceleração sobre o átomo  $i$  e, em conseqüência, na mudança de sua posição num intervalo de tempo  $\Delta t$  relativo à aceleração. O resultado desta integração é uma trajetória, a qual é uma seqüência de diferentes posições dos átomos em função do tempo (Leach, 2001).

A força sobre cada átomo é calculada em função de mudanças na energia potencial entre a posição atual e a posição seguinte, ou seja, a que representará o próximo passo da simulação. Esta superfície de energia potencial representa a energia de cada molécula, sendo descrita pelo denominado *Campo de Força*. O campo de força pode ser definido como um conjunto de funções e parametrizações que descrevem a posição de cada um dos átomos do sistema em função do tempo (Leach, 2001).

Os métodos de mecânica molecular baseiam-se na visão clássica da estrutura molecular como um conjunto de esferas unidas por molas, com constantes de força características. O campo de força, juntamente com a forma funcional e as parametrizações adicionais, expressa o somatório das funções da energia potencial de cada átomo, e a energia do sistema é calculada como função das posições dos

núcleos dos átomos (Leach, 2001). Em muitos campos de força, como no GROMACS, estas funções (Figura 9) definem as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto de diedro) de uma molécula, quando comparadas com a sua conformação não tensionada (caracterizada pelos valores-padrão de comprimentos e de ângulos de ligação), ou seja, descrevem as mudanças de energia associadas aos desvios das ligações e ângulos de seus valores de referência (Leach, 2001). Os campos de força podem conter termos de interação entre átomos não ligados, como efeitos eletrostáticos, interações de hidrogênio e outros efeitos estruturais.

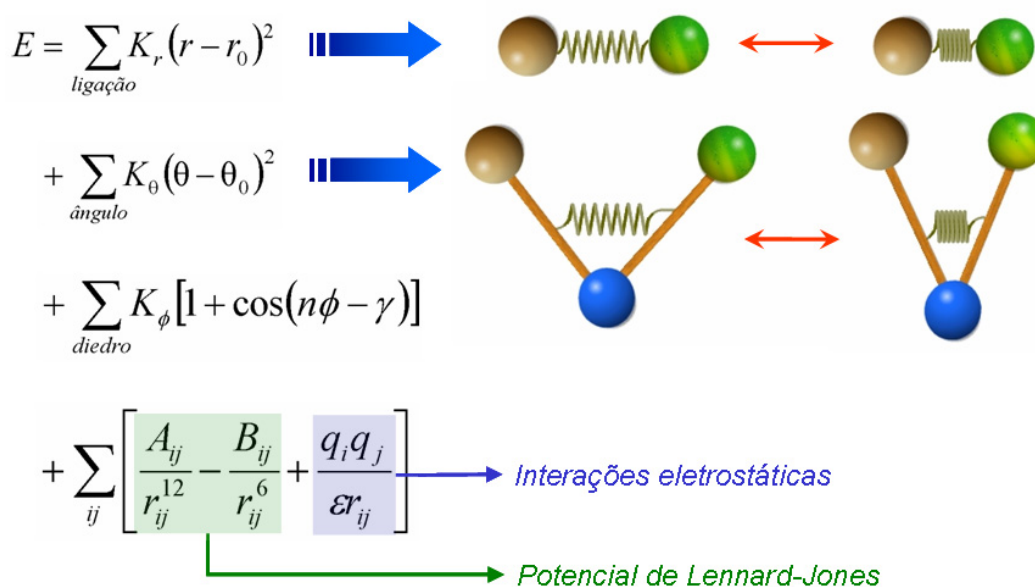


Figura 9: Exemplos de funções de energia que compõem os campos de força. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem o estiramento de ligações químicas, ângulos de ligação, diedros e interações intermoleculares (potencial de Lennard-Jones e interações eletrostáticas).

Diferentes campos de força estão disponíveis para simulações por DM envolvendo, principalmente, proteínas. Contudo, existe uma carência de campos de força específicos para carboidratos, à exceção do campo de força AMBER (Weiner *et al.*, 1986). Neste sentido, o Grupo de Bioinformática Estrutural vem se dedicando ao uso, parametrização e desenvolvimento de campos de força de MM para a descrição e caracterização de polissacarídeos envolvidos no sistema da coagulação sanguínea. Os métodos de MM permitiram a realização de trabalhos objetivando

principalmente a parametrização do campo de força GROMACS para carboidratos, o que possibilitou a realização de simulações por DM da heparina na escala de nanosegundos (Verli e Guimarães, 2004) e a escolha de um esquema de cargas adequado para a descrição da mesma (Becker *et al.*, 2005). Assim, foram criadas as condições necessárias para a descrição do complexo pentassacarídeo sintético-AT através de simulações por DM (Verli e Guimarães, 2005). Atualmente, um dos trabalhos nesta linha envolve a descrição da conformação do resíduo IdoA presente na estrutura da heparina, através da identificação das forças determinantes da preferência conformacional do IdoA em oligossacarídeos (Pol-Fachin e Verli, 2007).

Apesar da necessidade de novos agentes terapêuticos, o processo de desenvolvimento de fármacos em geral, é complexo, oneroso e demorado (Kaitin e DiMasi, 2000; Kaitin e Healy, 2000). Dada sua duração e custo, considerações cuidadosas de todos os fatores que têm impacto nestes processos são necessárias para alocar apropriadamente recursos para pesquisa e desenvolvimento (DiMasi, 2001; Hirsh *et al.*, 2005). Neste sentido, a MM surge como uma ferramenta para reduzir o tempo total e os custos do desenvolvimento de novos agentes, pois as simulações por DM realizadas nestes trabalhos são baseadas em ferramentas disponíveis gratuitamente e são caracterizadas pelo custo computacional razoável. As mesmas demonstram que as simulações por DM podem ser utilizadas na determinação tanto da conformação de GAGs complexos, quanto na identificação dos aspectos moleculares da interação dos mesmos com suas proteínas-alvo, bem como a própria caracterização das proteínas.

## 2 Objetivos

Em vista da carência de informações estruturais e dinâmicas acerca da interação entre GAGs obtidos de fontes animais com proteínas da cascata de coagulação, um dos objetivos da presente dissertação é o estudo do reconhecimento molecular de GAGs de ouriços-do-mar, não relacionados estruturalmente a heparina, pela AT. Desta forma, o trabalho visa identificar as razões moleculares responsáveis para os diferentes comportamentos da AT frente à galactana e à fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas. Adicionalmente, objetiva-se a determinação da conformação da estrutura glicosídica da AT. Assim, as seguintes metas foram estabelecidas:

- Descrição das propriedades conformacionais das galactanas e fucanas 2-sulfatadas, 3-ligadas;
- Proposição da estrutura tridimensional dos complexos galactana-AT e fucana-AT;
- Descrição das propriedades conformacionais da estrutura glicosídica da AT.

### 3 Metodologia

#### 3.1 Programas utilizados

Diversas metodologias de MM foram utilizadas na presente dissertação, incluindo DM, cálculos *ab initio* e *docking*. Os protocolos referentes a cada um destes métodos serão descritos adiante.

Os programas utilizados incluem:

- Ferramentas de visualização de moléculas: VMD (Humphrey *et al.*, 1996) e Molden (Schaftenaar, 1997);
- Programa para cálculo *ab initio*: GAMESS (Schmidt *et al.*, 1993);
- Programa para construção de mapas de contorno e simulações por dinâmica molecular: GROMACS (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2004);
- Programa para geração de topologias: PRODRG (van Aalten *et al.*, 1996);
- Programa para visualização e análise de várias proteínas simultaneamente e manipulação de seqüências polipeptídicas: Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997);
- Programa para realização de *docking* automático: Autodock 3.03 (Morris *et al.*, 1998).

#### 3.2 Cálculos *ab initio*

Uma importante etapa na parametrização de campos de força de mecânica molecular é a obtenção de cargas atômicas parciais. Particularmente no caso de poli-ânions (como polissacarídeos sulfatados) e poli-cátions, tal procedimento torna-se crucial para a descrição adequada das propriedades físico-químicas da molécula de interesse, tendo-se em vista a uniformização do conjunto de cargas. Neste sentido o nosso grupo desenvolveu um procedimento para a obtenção de cargas atômicas parciais utilizando métodos *ab initio* e o esquema de Löwdin (Verli e Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005).

Desta forma, a partir de procedimentos previamente descritos pelo grupo para a obtenção de cargas atômicas e da necessidade de geração de parâmetros para novos grupos de carga, presentes em monossacarídeos ainda não estudados pelo



grupo, *i.e.*, galactose 2-sulfato, fucose 2-sulfato, manose, galactose, ácido siálico e N-acetilglicosamina (Figura 10), cada resíduo foi construído e posteriormente submetido à minimização de energia utilizando a base 3-21G. As conformações de mínimo de energia obtidas foram utilizadas para cálculos *single point* na base HF 6-31G\*\*, de forma a gerar cargas atômicas de Löwdin (Tabela 4; Schmidt *et al.*, 1993).

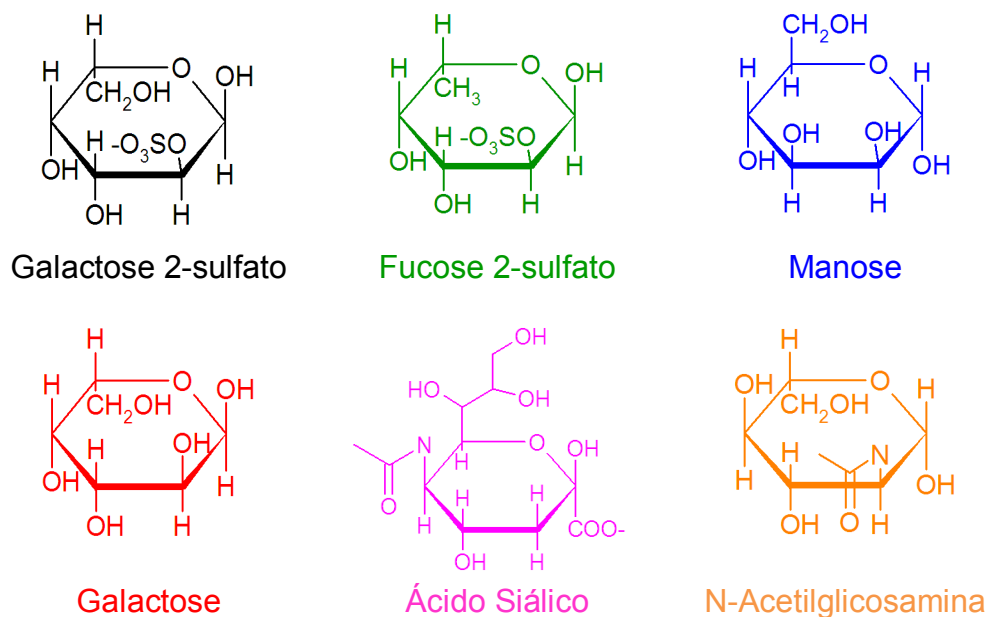


Figura 10: Estruturas da galactose 2-sulfato, fucose 2-sulfato, unidades sacarídicas que compõem a galactana e a fucana, respectivamente, e manose, galactose, ácido siálico e N-acetilglicosamina, unidades que compõem a estrutura glicosídica da AT.

Para a geração de cargas para as ligações glicosídicas foram utilizados dissacarídeos não-sulfatados de galactana e de fucana conforme protocolo já descrito (Verli e Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005). Da mesma maneira, para o estudo das ligações glicosídicas da estrutura de glicosilação da AT, esta foi dividida em dissacarídeos, de forma a contemplar as diversas ligações glicosídicas presentes nesta estrutura.

### 3.3 Cálculos de constantes de acoplamento

Os métodos de ressonância magnética nuclear (RMN) podem fornecer informações estruturais ao relacionar o acoplamento do spin  $^N J_{XY}$ , com parâmetros geométricos (diedros próprios ou ângulos de torção) através da equação de Karplus, onde N denota o número de ligações que separam dois núcleos e, X e Y denotam o tipo de átomo envolvido (Haasnot *et al.*, 1980; Caffarena *et al.*, 2005). Esta equação

considera a dependência de  $J$  ao ângulo de diedro ( $\Phi$ ) do fragmento H-C-C-H e às eletronegatividades e orientação dos substituintes, conforme equação (1), onde  $\xi_i$  representa +1 ou -1 de acordo com a orientação do substituinte em relação ao seu próton geminal e  $\Delta\chi_i$  são fatores de eletronegatividade. Assim, a partir da equação de Karplus, pode-se calcular as constantes de acoplamento ( ${}^3J_{H,H}$ ) teóricas para uma dada conformação molecular e compará-las com as determinadas experimentalmente para o mesmo diedro. Desta comparação é possível caracterizar qual conformação ou proporção de conformações são observadas em solução.

$${}^3J_{H,H} = P_1 \cos^2(\Phi) + P_2 \cos(\Phi) + P_3 + \sum \Delta\chi_i (P_4 + P_5 \cos^2(\xi_i\Phi + P_6 |\Delta\chi_i|)) \quad (1)$$

Assim, a partir da equação de Karplus, pode-se calcular as constantes de acoplamento ( ${}^3J_{H,H}$ ) teóricas para uma dada conformação molecular e compará-las com as determinadas experimentalmente para o mesmo diedro. Desta comparação é possível caracterizar qual conformação ou proporção de conformações são observadas em solução.

Os resíduos de galactose 2-sulfato e fucose 2-sulfato, tanto nas conformações  ${}^1C_4$  quanto  ${}^4C_1$ , foram submetidos à otimização da geometria utilizando cálculos *ab initio* no nível 3-21G. Para cada geometria obtida, foram calculadas as constantes de acoplamento  ${}^3J_{H,H}$  teóricas para hidrogênios vicinais utilizando a parametrização de Hasnoot-Altona para a equação de Karplus (Hasnoot *et al.*, 1980) e os valores foram comparados com as constantes de acoplamento  ${}^3J_{H,H}$  experimentais (Pereira *et al.*, 2002a).

### 3.4 Cálculos de mecânica molecular para geração de mapas de contorno

Mapas conformacionais para dissacarídeos, análogos aos mapas de Ramachandran, podem ser gerados, utilizando-se campos de força de mecânica molecular, para investigar a preferência conformacional dos ângulos de diedro de ligações glicosídicas. As diversas conformações de dissacarídeos são geradas através da rotação dos ângulos de diedro  $\Phi$  e  $\Psi$  (e  $\omega$ , para ligações  $\alpha 1 \rightarrow 6$ ; Figura 11), de  $-180^\circ$  a  $180^\circ$  em passos de  $30^\circ$ , gerando um total de 144 confôrmeros para cada dissacarídeo. Os passos de  $30^\circ$  foram escolhidos para a determinação de uma geometria inicial, não sendo necessários passos menores em função do refinamento posterior através de simulações por DM. No caso da ligação  $\alpha 1 \rightarrow 6$ , como a ligação

glicosídica é composta por três diedros, são gerados 144 conformêros para cada par de ângulos, ou seja, 144 para  $\phi$ - $\psi$  e 144 para  $\psi$ - $\omega$ . Utilizam-se restrições para os ângulos de diedro da ligação glicosídica, ou seja, quando  $\phi$ - $\psi$  são avaliados, seus ângulos são fixados nos valores determinados, enquanto  $\omega$  permanece livre e, quando avaliam-se  $\psi$ - $\omega$ , o ângulo  $\phi$  permanece livre (Figura 11). Após, cada conformêro é submetido à minimização de energia com dupla precisão e o algoritmo gradiente conjugado por 10.000 passos. A estabilidade relativa de cada conformação obtida, baseado no campo de força GROMACS (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2004) e nas cargas atômicas de Löwdin no nível HF/6-31G\*\* (Verli e Guimarães, 2004), são utilizadas para a construção dos mapas de contorno.

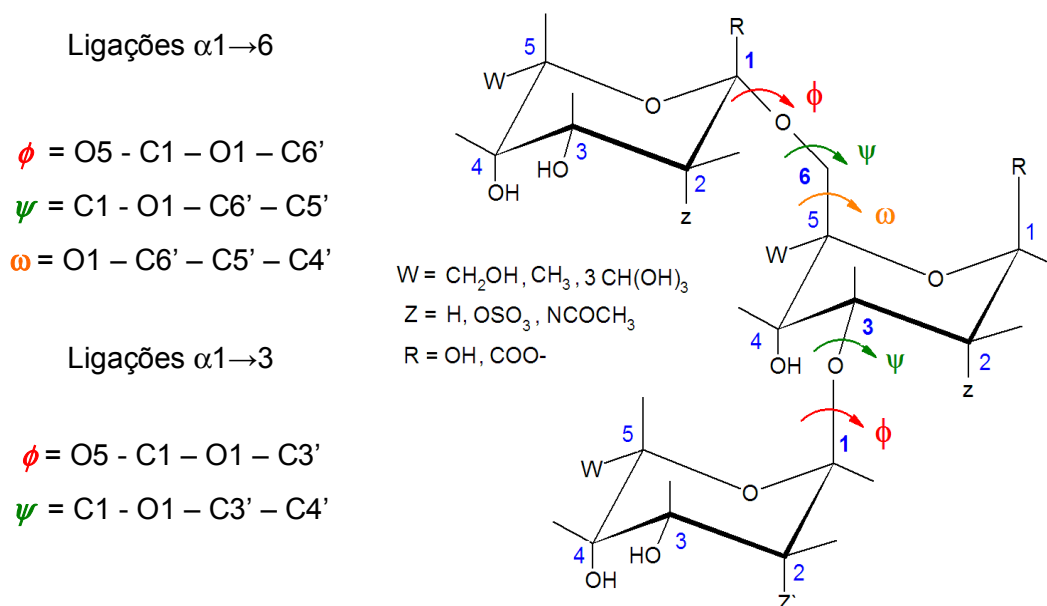


Figura 11. Ângulos de torção que definem as ligações glicosídicas  $\alpha 1 \rightarrow 6$  e  $\alpha 1 \rightarrow 3$ .

### 3.5 Simulações por DM

#### 3.5.1 Protocolo de simulação

As simulações por dinâmica molecular (DM) foram realizadas de acordo com o protocolo geral de simulações previamente descrito (de Groot e Grubmüller, 2001). Todas as simulações foram realizadas à temperatura ambiente (310K) e pressão constante (1 bar), *i.e.* NPT, com duração variável, de acordo com o sistema em estudo (de 3,0 a 10,0 ns). Cada molécula (polissacarídeo ou complexo proteína-polissacarídeo) foi solvatada numa caixa retangular utilizando condições periódicas

de contorno e o modelo de água SPC (Berendsen *et al.*, 1987), com distância de 1 nm entre o soluto e a caixa. Íons sódio foram adicionados de forma a neutralizar as cargas dos sistemas.

Cada conjunto de soluto, moléculas de água e contra-íons, foi então submetido à minimização de energia por aproximadamente 10.000 passos utilizando o algoritmo *Steepest Descents*. A estrutura então minimizada foi utilizada como ponto de partida para simulações por DM. Os métodos Lincs e Settle (Hess *et al.*, 1997; Miyamoto e Kolman, 1992) foram aplicados na restrição de ligações covalentes de forma a permitir um passo de integração de 2fs, enquanto as interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método Particle-Mesh Ewald (PME, Darden *et al.*, 1993). A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento separado de proteína, carboidrato, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão, utilizando constantes de acoplamento de, respectivamente,  $\tau = 0,1$  ps e  $\tau = 0,5$  ps (Berendsen *et al.*, 1984). Foi utilizado o valor de  $\epsilon = 1$  para a constante dielétrica do meio.

As simulações por DM podem ser divididas em três etapas: *termalização*, *equilíbrio* e *recolhimento de dados*. A *termalização* envolve o aquecimento gradativo do sistema e visa uniformizar as energias contidas na estrutura cristalográfica evitando, assim, deformações nas macromoléculas. Nesta etapa, o sistema é aquecido lentamente e em cada passo há o aumento da temperatura em 50 K, iniciando em 50 K até 310 K. O aumento de 50 K caracteriza passos durando 5ps e, até seu término, a termalização compreende 6 passos, totalizando 30 ps (Figura 12). Após a termalização do sistema, a simulação prossegue na temperatura de equilíbrio de 310 K, pelo tempo estipulado (de 3,0 ns a 10,0 ns), o qual inclui as etapas de *equilíbrio* (varia dependendo do sistema) e *recolhimento de dados*.

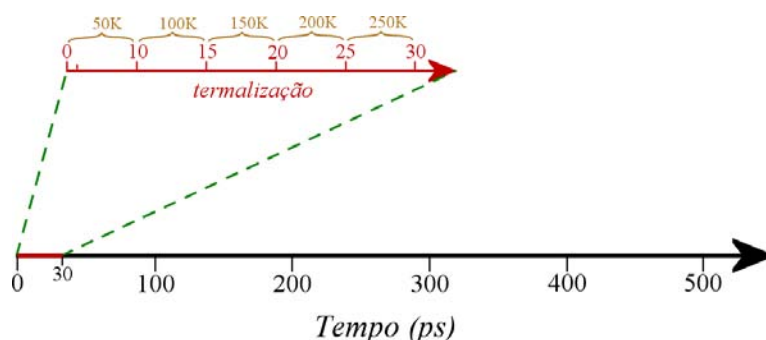


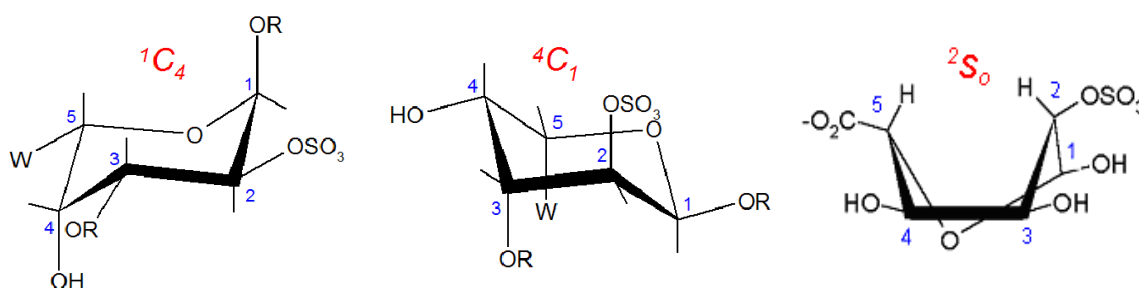
Figura 12: Esquema das etapas que compõe as simulações de DM a 310K. De 0ps a 30ps, uma série de etapas, de 5ps cada, aquece lentamente o sistema em incrementos de 50K. Após 30ps, o sistema está a 310K e se mantém nesta temperatura pelo restante da simulação (Verli, 2005).

### 3.5.2 Construção de topologias

A topologia é um arquivo contendo os parâmetros que descrevem as propriedades atômicas de uma determinada estrutura química, e permite a complementação e o refinamento de parâmetros já inclusos no campo de força GROMACS, *i.e.* descrição da força e tipo de cada ligação química, ângulos e diedros, bem como parâmetros de Lennard-Jones e cargas atômicas. Visando viabilizar a simulação de polissacarídeos, *i.e.*, galactana 2-sulfatada, 3-ligada, fucana 2-sulfatada, 3-ligada, e estrutura glicosídica da AT, utilizou-se a ferramenta de construção de topologias denominada PRODRG (van Aalten *et al.*, 1996).

O PRODRG é um servidor que gera um arquivo de topologia para simulações com o pacote e campo de força do GROMACS. A topologia então obtida foi refinada pelo acréscimo das cargas atômicas oriundas de cálculos *ab initio* (Tabela 4) e pelo controle da conformação de hexopiranoses (Verli e Guimarães, 2004, Becker *et al.*, 2005; Verli, 2005; Tabela 2). A definição dos estados conformacionais dos resíduos de galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas e da estrutura de glicosilação da AT ( ${}^4C_1$  e  ${}^1C_4$ ), foram realizadas pela adição de diedros impróprios nos respectivos arquivos de topologia de cada confômero. A mudança do ângulo de diedro no arquivo de topologia torna possível alterar a conformação dos monossacarídeos durante as simulações (Tabela 2), permitindo o controle das características dos mesmos.

Tabela 2: Principais conformações adotadas pelo resíduo de IdoA conforme Recomendações da IUPAC (IUPAC-IUB, 1980) e diedros impróprios utilizados para definir a conformação de hexopiranoses. A forma cíclica do anel é designada por uma letra maiúscula, em itálico (*C* descreve a conformação de cadeira e *S* a de bote-torcido - *skew-boat*), e por números, que distinguem as possíveis variantes conformacionais de uma mesma forma. O átomo localizado acima do plano do anel tem seu número sobrescrito antes da letra maiúscula e o átomo localizado abaixo do plano tem seu número subscrito após a letra maiúscula.



Seqüência de átomos definindo o diedro	Ângulos (em graus)		
	<sup>1</sup> C <sub>4</sub>	<sup>4</sup> C <sub>1</sub>	<sup>2</sup> S <sub>0</sub>
5 – 2 – 4 – 1	2,0	-2,0	30,5
5 – 2 – 3 – 1	-23,0	23,0	45,0
5 – 2 – 3 – 6	2,0	-2,0	30,5

### 3.5.3 Validação das simulações por DM

A validação dos resultados obtidos das simulações por DM foi realizada através da comparação com resultados experimentais prévios, e.g. estrutura cristalográfica, estrutura de RMN e dados bioquímicos, assim como da observação da estabilidade dos sistemas estudados, seja pela manutenção da estrutura secundária, energia, densidade e volume.

### 3.6 Experimentos de Docking

Os experimentos de *docking* envolvem a predição da orientação de um ligante dentro do sítio ativo de uma proteína ou receptor-alvo (Leach, 2001). Objetivando avaliar a orientação dos decassacarídeos de galactana e de fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas quando complexadas à AT, foram realizados experimentos de *docking*, utilizando o programa de *docking* automático Autodock 3.03 (Morris *et al.*, 1998).

Os parâmetros dos experimentos de *docking* foram otimizados através de um estudo sistemático dos mesmos. A validação de tais experimentos ocorreu através da reprodução da orientação da estrutura cristalográfica do pentassacarídeo sintético com a AT (PDB 1E03).

Nos experimentos de *docking* realizados, as cargas atômicas empregadas para os ligantes foram derivadas dos esquemas de Löwdin, obtidas através do método HF/6-31G\*\* do programa GAMESS (Verli e Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005). A estrutura da AT utilizada para o *docking* com os decassacarídeos de galactana e fucana foi sua estrutura cristalográfica complexada ao pentassacarídeo sintético (PDB 1E03, resolução = 2.6 Å). O ligante original e as moléculas de solvente foram removidos antes da realização do *docking* e apenas hidrogênios polares foram adicionados. As cargas para os átomos da proteína foram obtidas da versão do AutoDock do pacote/campo de força GROMACS (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2004).

O Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) foi utilizado para explorar o espaço de ligação e o número de *runs* foi de 100. O AutoGrid foi utilizado para a delimitação do sítio ativo e o tamanho do *grid* foi definido para 100 x 100 x 100 pontos, com um espaço do *grid* de 0.375Å centrado no sítio de interação do pentassacarídeo sintético com a AT. A caixa (*grid*) incluiu o sítio de interação do pentassacarídeo com a AT e solvente, provendo espaço suficiente para rotação e translação do ligante. Para cada cálculo, um número máximo de avaliações de energia foi definido 300.000 e o máximo de 270.000 operações LGA foram geradas em populações de 600 indivíduos. Operadores para tamanho do *crossover*, mutações e elitismo foram selecionados como 0.80, 0.02, e 1, respectivamente. As geometrias da galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas foram selecionadas das conformações obtidas como representativas de grupos de confôrmeros de menor energia gerados pelo Autodock.

## 4 Resultados

### 4.1 *Preâmbulo*

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir na forma dos trabalhos aceitos ou submetidos para publicação durante a realização da presente Dissertação. Estes trabalhos estão citados abaixo, assim como uma breve descrição sobre cada um.

- **Camila F. Becker**, Jorge A. Guimarães, Paulo A. S. Mourão, Hugo Verli: Conformations of sulfated galactans and fucans in aqueous: implications to their anticoagulant activities *J. Mol. Graph. Model.*, **2007a**, in press.

Este trabalho apresenta a aplicação de ferramentas de MM no estudo conformacional de polissacarídeos sulfatados obtidos de invertebrados marinhos, como a galactana e a fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas, bem como a caracterização de seus complexos com a AT utilizando métodos de *docking* e posterior refinamento através de simulações por DM.

- **Camila F. Becker**, Jorge A. Guimarães, Hugo Verli: Conformational characterization of the glycan structure of antithrombin. *Carbohydr. Res.*, **2007b**, em preparação.

Este trabalho apresenta a descrição do perfil conformacional do oligossacarídeo constituinte da estrutura da AT através de métodos de MM, incluindo a construção de mapas de contorno e da realização de simulações por DM desta estrutura glicosídica.

A seguir, serão apresentados um resumo e a íntegra de cada manuscrito.



## 4.2 Trabalho I

Este trabalho descreve o perfil conformacional da galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas em solução aquosa utilizando métodos de MM, bem como sua complexação com a AT. Estes polissacarídeos podem ser isolados e caracterizados de invertebrados marinhos e apresentam unidades repetitivas de oligossacarídeos simples, lineares e bem definidas. Apesar da semelhança estrutural, apenas a galactana apresenta atividade anticoagulante.

A comparação das constantes de acoplamento determinadas por RMN e teóricas confirmou a conformação  ${}^1C_4$  como predominante para os monossacarídeos nestes polissacarídeos. Tal resultado foi corroborado pelos mapas de caracterização conformacional obtidos, os quais indicaram que a forma  ${}^1C_4$  confere maior estabilidade às conformações dos dissacarídeos do que a forma  ${}^4C_1$ .

As simulações por DM de decassacarídeos de galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas indicam que ambas apresentam perfis conformacionais semelhantes em solução aquosa. A identificação dos possíveis modos de ligação de cada conformação da galactana e da fucana na interação com a AT foi realizada através de experimentos de *docking*, e os complexos obtidos foram posteriormente refinados por simulações por DM em solução aquosa. Os resultados mostram que os dois polissacarídeos apresentam orientações distintas na interação com a AT, o que explica as diferenças nas suas atividade biológicas.

### **Conformations of sulfated galactans and fucans in aqueous solution: implications to their anticoagulant activities**

**Camila F. Becker**, Jorge A. Guimarães, Paulo A. S. Mourão e Hugo Verli

*Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2007a**, in press.



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Molecular Graphics and Modelling xxx (2007) xxx–xxx

Journal of  
Molecular  
Graphics and  
Modelling

[www.elsevier.com/locate/JMG](http://www.elsevier.com/locate/JMG)

## Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities

Camila F. Becker<sup>a</sup>, Jorge A. Guimarães<sup>a</sup>, Paulo A.S. Mourão<sup>b</sup>, Hugo Verli<sup>a,c,\*</sup><sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, Brazil<sup>b</sup> Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, and Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68041, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil<sup>c</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000, Brazil

Received 22 November 2006; received in revised form 13 January 2007; accepted 15 January 2007

### Abstract

The discovery of sulfated galactans and sulfated fucans in marine invertebrates with simple and ordered structures opened new perspectives to investigate the biological activity of these molecules and to determine whether different structures confer high affinity for a particular protein. We undertook a conformational analysis of a 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan and of a  $\alpha$ -L-fucan with similar structure. Through comparison between theoretical and NMR derived coupling constants, we observed that the pyranose rings are predominantly in the  ${}^1C_4$  conformation in these polysaccharides. Additionally, the geometry of the glycosidic linkages was determined based on force field calculations, indicating that the two polysaccharides have similar conformations in solution. Since the sulfated  $\alpha$ -L-galactan, but not the  $\alpha$ -L-fucan potentiates antithrombin (AT) inhibition of thrombin, the solution conformations of the compounds were docked into AT and the complexes obtained were refined through molecular dynamics calculations. The obtained results indicate extremely different orientations for the two polysaccharides, which well correlates and explain their distinct anticoagulant activities. Finally, the molecular mechanism of a selective 2-desulfation reaction, observed among sulfated fucans, was explained as a consequence of an intramolecular hydrogen bond capable of assisting in the removal of the charged group.

© 2007 Published by Elsevier Inc.

**Keywords:** Carbohydrate modeling; Molecular dynamics; Anticoagulant activity; Antithrombin; Selective desulfation

### 1. Introduction

Sulfated polysaccharides, as negatively charged compounds, are capable of binding with any basic protein at several levels of specificity. Such feature directs the physical–chemical properties of these macromolecules as they can bind and modify the activity of many biological proteins, leading to the occurrence of non-specific biological activities. On the other hand, several systems have been identified in which differences in patterns of sulfation along a polysaccharide chain confer high affinity for a particular protein and are involved in both cellular and molecular recognition events [1]. For example, the role of

O-sulfate, carboxylate, and N-sulfate groups in AT activation by heparin is well documented [2,3].

Sulfated fucans and sulfated galactans obtained from marine invertebrates constitute a group of polysaccharides with potent biological activities. These compounds have simple and ordered structures, with differences in the specific patterns of sulfation and/or position of the glycosidic linkages within their repeating units [4–8]. Structural studies of these polysaccharides constitute a promising approach to investigate these structural differences and, specially, to determine whether distinct pattern of sulfation along a sulfated fucans or a sulfated galactans confer specific affinity for a particular protein.

In fact, these invertebrate polysaccharides were used to elucidate structure–function relationships concerning to their anticoagulant activities [9] and revealed that the structural requirements for interaction of sulfated galactans and sulfated fucans with coagulation cofactors and their target proteases are specific and not merely a consequence of their charge density

\* Corresponding author at: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre 90610-000, Brazil.  
Tel.: +55 51 3316 7770; fax: +55 51 3316 7309.

E-mail address: [hverli@cbiot.ufrgs.br](mailto:hverli@cbiot.ufrgs.br) (H. Verli).

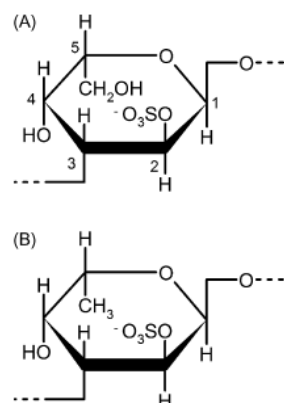


Fig. 1. Deduced structures of the sulfated  $\alpha$ -L-galactan (A) and sulfated  $\alpha$ -L-fucan (B) from *Echinometa lucunter* and *Strongylocentrotus franciscanus*, respectively. Adapted from Ref. [34].

and sulfate content. In particular, a 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan, but not a  $\alpha$ -L-fucan with similar structure (Fig. 1), is a potent thrombin inhibitor, an effect mediated by AT.

In this context, the current work intends to describe the structure of sulfated fucan and sulfated galactan by means of molecular modeling techniques, both in solution and complexed to AT, as a further step to elucidate the structure-activity relationship in this class of anticoagulant polysaccharides. Our data suggest that the sulfated fucan and the sulfated galactan have similar conformations in solution, but extremely different orientations in the binding site. Such distinct orientations, through comparison with the currently available experimental information on AT–thrombin–heparin ternary complex, plentifully support the anticoagulant activity of galactan and the lack of activity of fucan.

## 2. Methods

### 2.1. Nomenclature and software

The recommendations and symbols of nomenclature as proposed by IUPAC [10] were used. The relative orientation of a pair of contiguous sugar residues is described by two torsional angles at the glycosidic linkage, denoted  $\phi$  and  $\psi$  angles. For a (1  $\rightarrow$  3) linkage the definitions are those shown in Eqs. (1) and (2):

$$\phi = \text{O-5-C-1-O-1-C-3}' \quad (1)$$

$$\psi = \text{C-1-O-1-C-3}'-C-4' \quad (2)$$

The topologies of sulfated galactan and sulfated fucan were generated with the PRODRG program [11], the *ab initio* calculations were performed using GAMESS [12], manipulation of structures was performed with MOLDEEN program [13], and all the MD calculations and analysis were performed using the GROMACS simulation suite and forcefield [14].

### 2.2. Topology construction

Oligosaccharides (di- and decasaccharides) of 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan and 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-fucan (Fig. 1) were constructed in both  ${}^4C_1$  and  ${}^1C_4$  conformational states of  $\alpha$ -L-galactopyranose and  $\alpha$ -L-fucopyranose rings. Each structure was submitted to the PRODRG server and the initial geometries and crude topologies were retrieved. As previously described [15], the PRODRG topology was modified to include some refinements such as improper dihedrals in galactopyranose and fucopyranose rings to keep the conformation of the ring in one or another chair form.

The employed atomic charges are derived from Löwdin scheme, obtained at the HF/6-31G\*\* level using GAMESS program. Previous data of our group indicates that the atomic charges so obtained reproduces with high accuracy the geometry of anticoagulant polysaccharides like heparin, both in solution [15] and in complex with its target protein [16]. Moreover this approach produces equivalent results when compared to electrostatic adjusted atomic charges, while presenting less dependence on compound conformation [17].

### 2.3. Coupling constants calculation

In order to obtain theoretical  ${}^3J_{\text{H,H}}$  coupling constants for the  $\alpha$ -L-galactan and  $\alpha$ -L-fucan in both  ${}^1C_4$  and  ${}^4C_1$  forms, we submitted monosaccharides of each compound in the two conformations to full-geometry optimization using *ab initio* quantum mechanical computations at the 3-21G level with GAMESS. Hessian matrix analyses were employed to unequivocally characterize the optimized structures as true minima on the potential energy surface. The so obtained geometries for endocyclic angles were used to calculate theoretical  ${}^3J_{\text{H,H}}$  coupling constants using the Haasnoot–Altona parameterization of the Karplus equation [18].

### 2.4. Calculation of energy contours

Conformations of galactan and fucan disaccharides were generated by varying the  $\Phi$  and  $\Psi$  dihedral angles from  $-180$  to  $180^\circ$  with a  $30^\circ$  step, in a total of 144 conformers. Each conformer was energy minimized with double precision and conjugated gradients for 10,000 steps, using restraints for  $\Phi$  and  $\Psi$  angles, thus allowing the rest of the molecule to be energy minimized. Due to the observation of highly positive intramolecular interactions in some conformations, the energy of the system was further reduced in a molecular dynamics simulation of 5 ps at 10 K, with an integration step of 0.5 fs. The relative stabilities of each conformation so obtained, based on GROMACS force field and HF/6-31G\*\* Löwdin atomic charges, were used to construct the contour plots shown in Fig. 2.

### 2.5. Docking procedures

Docking procedures were performed with Autodock, version 3.03 [19]. The employed atomic charges for the

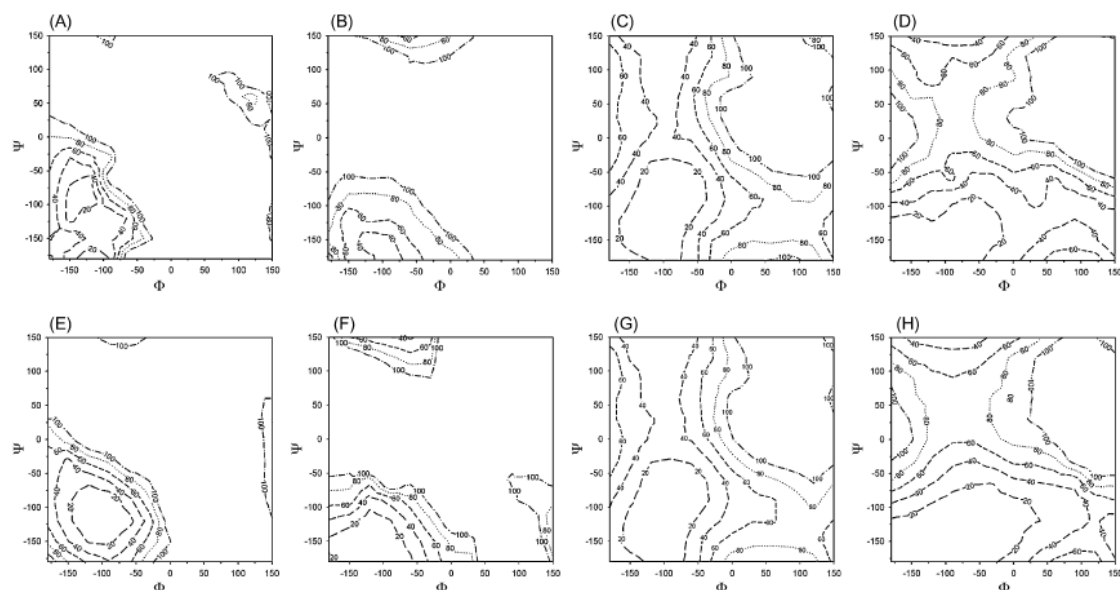


Fig. 2. Comparison of  $\alpha$ -L-galactose and  $\alpha$ -L-fucose disaccharides contour plots. (A) sulfated galactan in  ${}^1C_4$  conformation; (B) sulfated galactan in  ${}^4C_1$  conformation; (C) desulfated galactan in  ${}^1C_4$  conformation; (D) desulfated galactan in  ${}^4C_1$  conformation; (E) sulfated fucan in  ${}^1C_4$  conformation; (F) sulfated fucan in  ${}^4C_1$  conformation; (G) desulfated fucan in  ${}^1C_4$  conformation; (H) desulfated fucan in  ${}^4C_1$  conformation. Contour levels are shown at every 20 kJ mol $^{-1}$  from 20 to 100 kJ mol $^{-1}$ .

ligands are derived from Löwdin scheme, obtained at the HF/6-31G\*\* level. The AT crystal structure complexed with the synthetic pentasaccharide (PDB entry 1E03) was used. The original ligand (synthetic pentasaccharide) and water molecules were removed prior to docking procedures and only polar hydrogens were added. The Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) was used to explore the space of the binding site, centered on synthetic pentasaccharide interaction site on AT. Step sizes of 2 Å for translation and 15 Å for rotation were chosen, and a maximum number of energy evaluations was set to 300,000. For each run, a maximum number of 270,000 LGA operations were generated on populations of 100 individuals. Operator weights for crossover, mutation, and elitism were set to 0.80, 0.02, and 1, respectively. Orientations of sulfated fucan and sulfated galactan at the binding site were selected from the docked conformations as representative of the lower energy clusters generated by Autodock. Since the compounds were kept in their solution conformations in docking calculations, i.e. the dihedral angles were not allowed to rotate, further refinements of the complexes were performed using MD dynamics simulations.

## 2.6. Molecular dynamics calculations

The minimum energy conformations obtained from contour plots were used as a starting point for MD simulations in aqueous solution of galactan and fucan using the GROMACS suite [14]. The compounds were solvated in a rectangular box using periodic boundary conditions and SPC water model [20]

followed by the addition of 10 Na $^+$  ions in order to neutralize the simulated system.

These different oligosaccharide–water–sodium systems were submitted to a steepest descent minimization and MD simulations for 3 ns and the AT–decasaccharide–water–ion systems were simulated for 8 ns, applying the Particle-Mesh Ewald method [21], at 310 K. The system was heated slowly from 50 to 310 K, in steps of 5 ps, each one increasing the reference temperature by 50 K. The thermalization, together with the first nanosecond, was considered as equilibration, and all analyses were performed over the remaining part of the trajectory. Data concerning the decasaccharide structure were obtained by averaging over five values for the same linkage located in different positions in the decasaccharide. The average of these property values indicates not only deviations within a single linkage but also contributions from different positions in the polysaccharide, as reported before [22]. To determine if a hydrogen bond does exist, a geometrical criterion was used, i.e.  $r < 3.5$  Å (donor–acceptor distance) and  $\alpha \geq 120^\circ$  (donor–hydrogen–acceptor angle) [14].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Conformation of the pyranose rings

The NMR obtained scalar coupling constants are very similar for the sulfated  $\alpha$ -L-galactan and the sulfated  $\alpha$ -L-fucan (Table 1), and their values cannot explain the difference in anticoagulant activity of these two polysaccharides. However,

Table 1  
Experimental (NMR) and theoretical  $^3J_{\text{HH}}$  (Hz) coupling constants of sulfated  $\alpha$ -L-galactan and sulfated  $\alpha$ -L-fucan in their  $^4\text{C}_1$  and  $^1\text{C}_4$  forms

Polysaccharide	Atoms	$^3J_{\text{HH}}$ (Hz)	From <i>ab initio</i> calculations	
			$^4\text{C}_1$	$^1\text{C}_4$
Sulfated galactan	H1–H2	3.0	1.14	2.77
	H2–H3	10.5	4.12	8.55
Sulfated fucan	H1–H2	3.1	1.05	3.12
	H2–H3	9.5	3.81	8.16

<sup>a</sup> From Ref. [34].

in the analysis of polysaccharide conformation the coupling constants are very useful to determine the solution conformation of sulfated fucan and sulfated galactan pyranose rings. In fact, it is well documented that vicinal coupling constants can be related to the torsion angle around the bond connecting the coupled atoms with a Karplus-type relationship [23].

Considering that the couplings are dependent on the nature and orientation of the substituents along the coupling pathway, in addition to the torsion angle, we used the Haasnoot–Altona parameterization of the Karplus equation [18], which accounts for the electronegativity of the substituents. Based on *ab initio* derived conformations of the pyranose rings found in the sulfated  $\alpha$ -L-galactan and sulfated  $\alpha$ -L-fucan, either in  $^1\text{C}_4$  or in  $^4\text{C}_1$  chair conformations, we obtained H–C–C–H dihedral angle geometries, which were then used to estimate  $^3J_{\text{HH}}$  coupling constants (Table 1).

Comparison between the experimental and theoretical  $^3J_{\text{HH}}$  coupling constants (Table 1) clearly indicates that the  $^1\text{C}_4$  chair conformation is the predominant pyranose form in solution for both sulfated galactan and sulfated fucan. The observed deviations between calculated and experimental values (up to  $\sim 2$  Hz) were previously observed in similar conditions [24], and are possibly due to a relative lack of parameterization of the Karplus relationship between coupling constants and dihedral angles for charged carbohydrates [25], notably sulfate compounds [26]. This deviation from experimental data, however, does not impair the consideration of being the  $^1\text{C}_4$  chair as the almost exclusive conformation of the monosaccharides in solution of the sulfated galactan and the sulfated fucan.

### 3.2. Geometry of the glycosidic linkage

The geometries of the glycosidic linkages can be analyzed through rotation of  $\phi$  and  $\psi$  dihedral angles, producing contour plots that indicate the preferred conformation of the linkage. Different features can influence such conformational preference, such as chemical substitution patterns (e.g. sulfation), monosaccharide forms (e.g.  $^4\text{C}_1$  and  $^1\text{C}_4$  conformations), and interaction with solvent. In this context, *in silico* modeling of sulfated and desulfated saccharide units can contribute to determine the influence of such groups on the conformation of the carbohydrate.

We mimicked the geometries of the glycosidic linkages in the sulfated L-galactan and sulfated L-fucan using disaccharide models. The energy contour plots of the 2-sulfated and desulfated disaccharides show only one major preferred conformational range of  $\phi$  and  $\psi$  torsions for L-galactose and L-fucose disaccharides in their  $^4\text{C}_1$  and  $^1\text{C}_4$  forms (Fig. 2).

However, while the sulfated forms of these disaccharides are restricted to a single energy minimum (Fig. 2A, B, E and F), the desulfated disaccharides show a fairly wide extension in both  $\phi$  and  $\psi$  dimensions (Fig. 2C, D, G and H). As a consequence, sulfation in C-2 appears to induce a great increase in energy barrier associated with rotation of  $\phi$  and  $\psi$  angles, suggesting that the sulfate group in both L-galactose and L-fucose disaccharides is mostly related to carbohydrate chain rigidity than to minimum energy location. In addition, comparison between L-fucose and L-galactose disaccharides allowed us to observe that substitution pattern at C-5 has a small influence over the conformational preference. The presence of hydroxymethyl group in galactose restricts the glycosidic linkage in comparison with the fucose structure, an effect that appears to be related to an increased intramolecular steric interference.

The interconversion between  $^4\text{C}_1$  and  $^1\text{C}_4$  pyranose conformations of the monosaccharides in L-galactose and L-fucose disaccharides does not appear to introduce drastic changes in the conformational preference described by the energy maps (Fig. 2). The change in these pyranose forms, both for L-galactose and L-fucose, implies in a translation along the  $\psi$  dimension of the minimum energy center of about  $60^\circ$ . In addition, the contours indicate that the  $^1\text{C}_4$  conformation is more stable than the  $^4\text{C}_1$  one by approximately  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Such behavior, observed for the L-galactose disaccharides, suggest that the  $^1\text{C}_4$  is the preferred chair as compared to the  $^4\text{C}_1$  form, in agreement with the data obtained by comparison between the experimental and theoretical  $^3J_{\text{HH}}$  coupling constants (Table 1).

Considering previous studies describing the induced-fit mechanism for AT activation by heparin [16,27,28], it is somewhat intriguing that between the two polysaccharides the more rigid molecule (sulfated galactan) is the anticoagulant one, while the more flexible compound (sulfated fucan) is not. Such behavior may indicate that, at least for such class of compounds, the induced-fit mechanism is not predominant or even necessary for the conformational modification induced by the bound polysaccharide and thus for AT activation. In agreement with these observations, recent studies have shown that sulfated galactans act mainly by a bridging mechanism (the polysaccharide behaves like a bridge between AT and fXa or thrombin) for AT potentiation [29], suggesting that the main structural features responsible for the expression of its anticoagulant activity includes the chain length and the positions of sulfate groups, matching the interval between basic amino acid residues of the target-protein [9].

Overall, these results indicate that the sulfated galactan and the sulfated fucan have similar geometries of their glycosidic linkages, although the presence of hydroxymethyl groups in galactose restricts the glycosidic linkage in comparison with fucose.

Table 2  
Average dihedral angles of the glycosidic linkage from heparin, sulfated galactan, and sulfated fucan deca-saccharides

Dihedral angle	Average dihedral (°)					
	Heparin <sup>a,b</sup>		Sulfated galactan (Gal1 → 3Gal)		Sulfated fucan (Fuc1 → 3Fuc)	
	IdoA → GlcN	GlcN → IdoA	<sup>4</sup> C <sub>1</sub>	<sup>1</sup> C <sub>4</sub>	<sup>4</sup> C <sub>1</sub>	<sup>1</sup> C <sub>4</sub>
φ	-75.0 ± 11	96.6 ± 14	-139 ± 14	-104 ± 14	-99 ± 25	-104 ± 15
ψ	-116.6 ± 11	-125.0 ± 15	-162 ± 10	-107 ± 15	-147 ± 16	-121 ± 15

<sup>a</sup> IdoA residues in <sup>2</sup>S<sub>0</sub> conformation.

<sup>b</sup> Data obtained from [15].

### 3.3. MD simulations of sulfated galactan and sulfated fucan deca-saccharides

In order to explicitly include solvent effects on conformational description of the polysaccharides conformation, molecular dynamics (MD) simulations were performed on deca-saccharides composed of sulfated L-galactose and sulfated L-fucose units, built based on the glycosidic linkage minimum energy conformation described in the contour plots (Fig. 2). Globally, four deca-saccharide structures were simulated: (1) sulfated L-galactan with residues in <sup>4</sup>C<sub>1</sub> conformation, (2) sulfated L-galactan with residues in <sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformation, (3) sulfated L-fucan with residues in <sup>4</sup>C<sub>1</sub> conformation, and (4) sulfated L-fucan with residues in <sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformation. The results of these simulations, expressed as average values of glycosidic linkage dihedral angles, are described in Table 2 over the MD trajectory and compared to heparin geometry in equivalent solution conditions.

As it can be observed in Table 2, the performed simulations presented similar structural fluctuations over MD, as indicated by the standard deviations of approximately ±15° (Table 2). These geometric fluctuations are constant over the trajectory, as the simulations readily equilibrate (data not shown). The average geometries thus obtained are highly concentrated in the minimum energy regions of the respective contour plots (Fig. 2), indicating that solvent factors do not play a major role on the folding of both sulfated L-galactan and sulfated L-fucan.

On the other hand, it is expected that the two possible chair forms of the pyranose rings have a considerable influence over the global polysaccharide conformation and dynamics [15]. In fact, the performed simulations presented an up to 60° difference in dihedral angles between molecules with residues in <sup>4</sup>C<sub>1</sub> and <sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformations (Table 2). It is important to note, however, that the glycosidic linkage geometry is considerably similar between sulfated α-L-galactan and sulfated α-L-fucan when their residues lie in the <sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformation, while the difference is maximized when the monosaccharide composing units of the polymers are in a <sup>4</sup>C<sub>1</sub> form. These findings raise the possibility that different polysaccharide conformations could be responsible for the activities of sulfated galactan and sulfated fucan in different biological medium.

### 3.4. Docking and MD of sulfated polysaccharides complexes with AT

The identification of the role of specific groups to ligand binding with its target receptor requires the determination of the

three-dimensional structure from the complex by means of experimental (X-ray crystallography and NMR methods) or theoretical methods (docking procedures). Experimental characterization of the interaction between GAGs and target proteins is a challenging task because of the poor surface complementarity, the high charge density of the binding areas and the highly flexible nature of polysaccharides [30], commonly resulting in single three-dimensional models for the carbohydrate.

So in order to identify the origin of the different activities shown by galactan and fucan as compounds showing distinct recognitions by AT, docking calculations were performed between these ligands and the target receptor, considering the pyranose rings in the <sup>1</sup>C<sub>4</sub> form. Based on current knowledge on the mechanisms of AT activation by heparin [3], supporting a bridging mechanism in galactan potentiation of AT inhibitory activity [29], the dockings were performed in a broad region around heparin binding site. Additionally, the so obtained complexes were further submitted to MD simulations in order to refine the polysaccharide–AT complexes in the presence of explicit solvent molecules.

The interaction energies obtained from MD simulations were statistically equivalent for both sulfated galactan and sulfated fucan (Table 3), as it could be expected based on the structural similarity of these two compounds and on the

Table 3  
Average interaction energy between synthetic pentasaccharide, sulfated galactan or sulfated fucan deca-saccharides and AT

AT residues	Average interaction energy (kJ/mol)		
	Synthetic pentasaccharide <sup>a</sup>	Sulfated galactan ( <sup>1</sup> C <sub>4</sub> )	Sulfated fucan ( <sup>1</sup> C <sub>4</sub> )
Lys11	-101.5 ± 35.8	-41.7 ± 14.1	-40.9 ± 16.0
Arg13	-77.9 ± 41.9	-5.75 ± 9.3	-20.3 ± 22.6
Thr44	-43.4 ± 10.6	-5.08 ± 4.5	-9.9 ± 3.3
Asn45	-108.5 ± 13.9	-81.8 ± 10.6	-81.9 ± 12.2
Arg46	-19.5 ± 9.8	-8.9 ± 3.3	-44.1 ± 26.8
Arg47	-147.5 ± 12.2	-41.8 ± 19.7	-60.3 ± 13.5
Glu113	-45.5 ± 8.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Lys114	-211.6 ± 9.8	-3.9 ± 10.0	-6.8 ± 17.4
Lys125	-27.4 ± 23.9	-61.7 ± 8.6	-25.0 ± 8.1
Arg129	-25.2 ± 20.8	-72.6 ± 25.4	-45.4 ± 7.8
Arg132	-3.1 ± 7.2	-38.2 ± 16.1	-91.3 ± 10.8
Lys133	-0.1 ± 0.4	-6.4 ± 8.5	-26.8 ± 6.4
Lys136	0.0 ± 0.0	-46.8 ± 30.2	-33.4 ± 12.3
Total	-965.7 ± 72.5	-635.4 ± 93.3	-758.0 ± 85.2

<sup>a</sup> From Ref. [16].

Please cite this article in press as: C.F. Becker et al., Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities, J. Mol. Graph. Model. (2007), doi:10.1016/j.jmgm.2007.01.008

6

C.F. Becker et al. / Journal of Molecular Graphics and Modelling xxx (2007) xxx–xxx

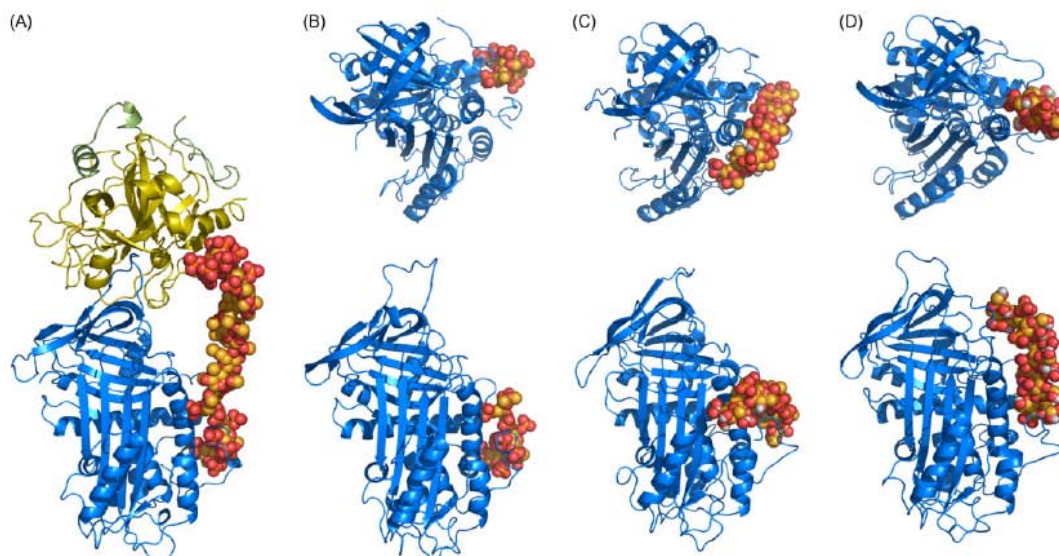


Fig. 3. Structures of the complexes between different polysaccharides and AT. (A) ternary complex between AT, thrombin and an heparin derivative (PDB ID 1TB6); (B) AT bounded to the synthetic pentasaccharide (PDB ID 1E03); (C) final structure from a 5 ns MD of AT complexed to a sulfated fucan deca-saccharide with pyranose rings in  ${}^1C_4$  form; (D) final structure from a 5 ns MD of AT complexed to a sulfated galactan deca-saccharide with pyranose rings in  ${}^1C_4$  form. For (B)–(D) two orientations of the complexes are presented.

predominance of ionic interactions for the binding of sulfated polysaccharides to AT. Such interactions were shown to be highly influenced by the solvent, increasing by approximately  $-300$  kJ/mol in the first nanosecond on both AT–galactan and AT–fucan complexes. However, while the interaction energy is similar on both invertebrate polysaccharides, their orientation on AT binding site is extremely different ( $\sim 90^\circ$ , Fig. 3C and D). Such difference in orientation upon binding to AT explain the lack of activity of fucan under the same experiments and fully supports the expected bridging mechanism in the activity of galactan, as previously described [29]. Thus, both compounds are capable of interacting with AT, as pointed by our theoretical results and on experimental data showing that both polysaccharides are retained on an AT-affinity column (Melo and Mourão, unpublished results). However, only the complex formed by the sulfated galactan and the AT (Fig. 3D) allows a further interaction with thrombin, analogous to the ternary complex between heparin, AT and thrombin (Fig. 3A), so supporting the potentiation of this protease inactivation by AT.

Additionally, the performed MD simulations allowed us to observe that the change in pyranose rings from  ${}^1C_4$  chair to  ${}^4C_1$  does not produce meaningful changes in the GAGs interaction with AT (data not shown), suggesting that the monosaccharide conformation may not be a determining factor in polysaccharide recognition by plasma proteins. In fact, it appears that the most abundant form in solution would prevail in the interaction with the target protein. An equivalent behavior was already proposed by us for the interaction of heparin IdoA residues with AT [16].

In the context of the structure-based design of new antithrombotic compounds, the total interaction energy between the ligand and its target receptor gives only a global perspective of the complexation. A more precise analysis of such process can be performed through a quantitative determination of the contribution of each amino acid residue of AT to the interaction with the sulfated polysaccharide. As we previously reported for the synthetic pentasaccharide–AT complex [16], such analysis can be adequately performed using theoretical methods, allowing us to obtain results plentifully supported by experimental data. Based on these analyses (Table 3), it can be observed that galactan has some important differences in interaction with AT as compared to the synthetic pentasaccharide pattern, specially observed in residues Arg13, Thr44, Arg47, Glu113 and, mainly, Lys114. When compared to this heparin analogue, sulfated galactan presents lower interaction energies with all these AT amino acid residues, and correlates well with the difference in the anticoagulant activity presented by the two compounds.

Conversely, it is known that these sulfated polysaccharides, obtained both from marine invertebrates, are equally potent in inducing the acrossomic reaction of sea urchin sperm [31], which suggests that the conformational requirements for such specific activity are distinct from those required for the expression of the AT-mediated anticoagulant effect. Since neither the sequence nor the structure of the receptor responsible for the recognition of marine polysaccharides in the acrossome are available so far, we were unable to identify and explore at the molecular level the main features required for the expression of such interesting biological activity presented by these compounds in this invertebrate system.

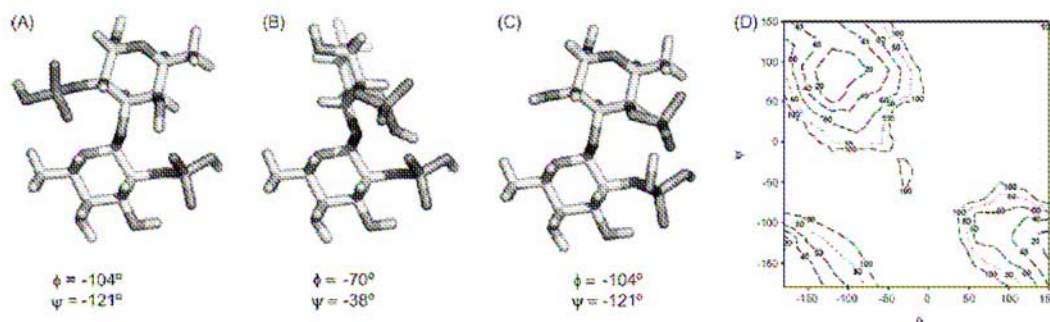


Fig. 4. (A) Protonated 2-sulfated  $\alpha$ -L-fucan disaccharide in a MD obtained conformation; (B) protonated 2-sulfated  $\alpha$ -L-fucan disaccharide in an intramolecular hydrogen bonded conformation; (C) protonated 2,4-sulfated  $\alpha$ -L-fucan disaccharide in an intramolecular hydrogen bonded conformation; (D) contour plot for the 2,4-sulfated  $\alpha$ -L-fucan disaccharide. The  $\phi$  and  $\psi$  angles for each conformation are also presented. All residues lie in the  ${}^1C_4$  form, and the intramolecular hydrogen bonds in (B) and (C) occurs between the adjacent sulfate groups in its protonated forms.

### 3.5. Molecular mechanism of a selective 2-desulfation reaction of sulfated fucans by mild acid hydrolysis

On previous work we have described an approach, based on mild acid hydrolysis, to preferentially remove a specific 2-sulfate ester from the sulfated fucans and to obtain low-molecular weight derivatives [32]. This specific 2-desulfation requires an adjacent 4-sulfated residue, as occurs with the fucan from *Lytechinus variegatus* but not with the fucan from *S. franciscanus* (2-sulfated  $\alpha$ -L-fucan). While the molecular basis for such phenomenon is still unknown, the proposed conformations observed in the contour plots for the glycosidic linkage of the 2,4-sulfated  $\alpha$ -L-fucan disaccharide (Fig. 4D) and for the 2-sulfated  $\alpha$ -L-fucan disaccharide (Fig. 2E) may offer a possible explanation for this unique preferential desulfation reaction.

Considering the highly acidic medium usually required for the specific 2-desulfation reaction in absence of an adjacent 4-sulfated residue (for instance, 5 mg of sulfated fucan dissolved in 1 mL of 0.01 M HCl, and long incubation at 60 °C [32]), it can be considered that at least a quarter part of the polysaccharide is in a protonated form, taking into account that the  $pK_a$  for heparin sulfate groups ranges from 0.5 to 1.5 [33], and that the sulfated  $\alpha$ -L-fucan is less acidic than heparin. With the protonation, formation of intramolecular hydrogen bonds between two adjacent sulfates became possible, thus promoting intramolecular interactions capable to modify the reactivity of these compounds. Such putative interactions are depicted in Fig. 4.

In fact, the MD obtained conformation of the 2-sulfated  $\alpha$ -L-fucan in solution (Fig. 4A) shows no intramolecular hydrogen bond between the two adjacent sulfate groups, presenting only an interaction between one 2-sulfate and the subsequent 4-hydroxyl. Contrarily, the conformations presented in Fig. 4B (protonated 2-sulfated  $\alpha$ -L-fucan) and 4C (protonated 2,4-sulfated  $\alpha$ -L-fucan) show intramolecular hydrogen bonds between two adjacent sulfate groups, which are dependent on acidic mediums. Based on the contour plot presented in Fig. 2D and subsequent reproduction of its minimum energy

conformation by MD simulation in explicit water (Table 2), we can extrapolate the energy penalty in adopting the conformational states pointed in Fig. 4B and C. According to this assumption, the intramolecular hydrogen bonded in protonated 2-sulfated  $\alpha$ -L-fucan is more than 100 kJ/mol less stable than in a protonated 2,4-sulfated  $\alpha$ -L-fucan with similar interaction. Altogether these data can explain the molecular basis for the preferred 2-desulfation of the 2-sulfated residue linked to a 4-sulfated unit, even in a mild acid condition, in comparison to  $\alpha$ -L-fucan exclusively 2-sulfated. The intramolecular interaction assists in the removal of the sulfate group, for example, in a nucleophilic substitution reaction in acidic aqueous solution.

This reaction mechanism (a 2-desulfation assisted by an adjacent 4-sulfate group) also correlates to the low reactivity of 2-sulfated  $\alpha$ -L-fucan, as reported for the polysaccharide from *S. franciscanus* [32]. The high energy penalty associated to a conformation capable to present an intramolecular interaction between protonated sulfate groups (Fig. 3B) require a far more aggressive condition to remove sulfate groups compared to the 2,4-sulfated  $\alpha$ -L-fucan, which presents no penalty to adopt similar interaction. In addition, this energy penalty can be considerably higher in polysaccharide with longer chains, since the entire molecule is less flexible than a simple disaccharide. Finally, it is expected that after the removal of 2-sulfate ester from the polysaccharide, glycosidic linkage will become more susceptible to hydrolysis due to the removal of steric/electrostatic protection supplied by this charged bulky substituent. In fact, the desulfated units are preferentially cleaved by the acid [32], thus helping the fragmentation of the polymer and to obtain lower molecular weight derivatives.

## 4. Conclusions

Comparison between the obtained geometries of the glycosidic linkages of a sulfated fucan and a sulfated galactan indicate a high degree of structural similarity between these two polysaccharides. The scalar coupling constants, obtained by theoretical calculation and determined by NMR spectra, indicate that the monosaccharides are predominant in the  ${}^1C_4$



form in the sulfated galactan and in the sulfated fucan. Such conformations were further docked to AT and the complexes thus obtained were refined through MD. Considering the interaction energy between both ligands and the target receptor, as well as the orientation adopted by the compounds when complexed to AT, the so obtained structures fully explain the differences in the expressed anticoagulant activity existing between sulfated fucan, sulfated galactan and heparin.

In addition, the molecular modeling calculations described here allowed the understanding of the molecular mechanism of a curious and unique desulfation reaction described for sulfated fucan. We interpreted that the selective removal of a 2-sulfate adjacent to a 4-sulfate group in the saccharide unit is consequent to the formation of a hydrogen bond that is able to assist in the removal of such charged group. In the case of an adjacent 2-sulfate group, the intramolecular hydrogen bond is not formed.

Overall, our results show that molecular modeling techniques can be adequately used to describe the conformation of polysaccharides in solution, as well as to study the interaction of these molecules with their target proteins and to elucidate their structure-activity relationships. Finally, these observations can contribute to the design of new antithrombotic agents through the identification of new synthetic derived lead compounds, not structurally related to heparin.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian Agencies, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq – Minister of Science and Technology and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES – Minister of Education, Brasília, Brazil.

#### References

- [1] B. Mulloy, The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides, *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 77 (2005) 651–664.
- [2] C.A.A. van Boeckel, M. Petitou, The unique antithrombin III binding domain of heparin: a lead to new synthetic antithrombotics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32 (1993) 1671–1818.
- [3] A. Dementiev, M. Petitou, J.M. Herbert, P.G.W. Gettins, The ternary complex of antithrombin–antihydrothrombin–heparin reveals the basis of inhibitor specificity, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 863–867.
- [4] A.P. Alves, B. Mulloy, J.A. Diniz, P.A.S. Mourão, Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 6965–6971.
- [5] A.P. Alves, B. Mulloy, G.W. Moy, V.D. Vacquier, P.A.S. Mourão, Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans, *Glycobiology* 8 (1998) 939–946.
- [6] M.S. Pereira, B. Mulloy, P.A.S. Mourão, Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7656–7667.
- [7] A.C.E.S. Vilela-Silva, A.P. Alves, A.P. Valente, V.D. Vacquier, P.A.S. Mourão, Structure of the sulfated alpha-1-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition, *Glycobiology* 9 (1999) 927–933.
- [8] A.C.E.S. Vilela-Silva, M.O. Castro, A.P. Valente, C. Biermann, P.A.S. Mourão, Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 379–387.
- [9] M.S. Pereira, F.R. Melo, P.A.S. Mourão, Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology* 12 (2002) 573–580.
- [10] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* 131 (1983) 5–7.
- [11] D.M.F. van Aalten, B. Bywater, J.B.C. Findlay, M. Hendlich, R.W.W. Hoofi, G. Vriend, PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 10 (1996) 255–262.
- [12] M.W. Schmidt, K.K. Baldrige, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S.J. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery, General atomic and molecular electronic structure system, *J. Comp. Chem.* 14 (1993) 1347–1363.
- [13] G. Schaftenaar, MOLDEN, CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands, 1997.
- [14] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, A.R. van Buuren, E. Apol, P.J. Meulenhoff, D.P. Tieleman, A.L.T.M. Sijbers, K.A. Feenstra, R. van Drunen, H.J.C. Berendsen, GROMACS User Manual Version 3.2, Groningen, The Netherlands, 2004.
- [15] H. Verli, J.A. Guimarães, Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 281–290.
- [16] H. Verli, J.A. Guimarães, Insights into the induced fit mechanism in Antithrombin–heparin interaction using molecular dynamics simulations, *J. Mol. Graph. Mod.* 24 (2005) 203–212.
- [17] C.F. Becker, J.A. Guimarães, H. Verli, Molecular dynamics and atomic charge calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 1499–1507.
- [18] C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. de Leeuw, C. Altona, The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities. I. An empirical generalization of the Karplus equation, *Tetrahedron* 36 (1980) 2783–2792.
- [19] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662.
- [20] H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, T.P. Straatsma, The missing term in effective pair potentials, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 6269–6271.
- [21] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: an  $N \log(N)$  method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089–10092.
- [22] D. Mikhailov, R.J. Linhardt, K.H. Mayo, NMR solution conformation of heparin-derived hexasaccharide, *Biochem. J.* 328 (1997) 51–61.
- [23] M. Karplus, Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2870–2871.
- [24] E.R. Caffarena, A.C. Lorenzo, Conformational and dynamical properties of the *niruriside* in aqueous solution: a molecular dynamics approach, *J. Mol. Struct.* 714 (2005) 189–197.
- [25] D.A. Horta, F.J. Hajduk, L.E. Lerner, Solution dynamics of the 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranose ring, *Glycoconj. J.* 14 (1997) 691–696.
- [26] G. Gatti, B. Casu, G.K. Hamer, A.S. Perlin, Studies on the conformation of heparin by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, *Macromolecules* 12 (1979) 1001–1007.
- [27] C.A.A. van Boeckel, P.D.J. Grootenhuis, A. Visser, A mechanism for heparin-induced potentiation of antithrombin-III, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1 (1994) 423–425.
- [28] M. Hricovini, M. Guerrini, A. Bisio, G. Torri, M. Petitou, B. Casu, Conformation of heparin pentasaccharide bound to antithrombin III, *Biochem. J.* 359 (2001) 265–272.
- [29] F.R. Melo, M.S. Pereira, D. Foguel, P.A.S. Mourão, Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20824–20835.
- [30] A. Imberty, S. Pérez, Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations, *Chem. Rev.* 100 (2000) 4567–4588.
- [31] N. Hirohashi, A.C.E.S. Vilela-Silva, P.A.S. Mourão, V.D. Vacquier, Structural requirements for species-specific induction of the sperm

- acrosome reaction by sea urchin egg sulfated fucan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 403–407.
- [32] V.H. Pomín, A.P. Valente, M.S. Pereira, P.A.S. Mourão, Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: a selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides, *Glycobiology* 15 (2005) 1376–1385.
- [33] B. Casu, U. Gennaro, A conductimetric method for the determination of sulphate and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides, *Carbohydr. Res.* 39 (1975) 168–176.
- [34] M.S. Pereira, E.S.A.C. Vilela-Silva, A.P. Valente, P.A.S. Mourão, A 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide, *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 2231–2238.

### **4.3 Trabalho II**

A AT é uma glicoproteína que co-existe sob duas isoformas,  $\alpha$  e  $\beta$ -AT, as quais diferem na quantidade de carboidrato ligado à parte protéica. Tal diferença é responsável pelas distintas atividades anticoagulantes de ambas isoformas. Dada a influência da parte glicosídica de proteínas em suas atividades biológicas, este trabalho visa descrever o perfil conformacional da estrutura de glicosilação da AT utilizando métodos de MM.

Os mapas de contorno dos dissacarídeos da parte glicosídica da AT mostraram as preferências conformacionais da ligação glicosídica dos mesmos. Contudo, as conformações de alguns destes dissacarídeos sofreram modificações após as simulações de DM na presença de moléculas de solvente explícito. Particularmente para o dissacarídeo  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ , a ligação glicosídica apresenta um equilíbrio particular entre três conformações preferenciais. As simulações de DM do oligossacarídeo completo mostraram que a geometria da ligação glicosídica de  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  é responsável pela determinação da geometria global do oligossacarídeo.

A estrutura tridimensional da estrutura glicosídica da AT determinada por simulações de DM difere significativamente da conformação cristalográfica, o que sugere que efeitos de empacotamento estejam influenciando a flexibilidade e a conformação da parte glicosídica na estrutura cristalográfica. Os resultados confirmam que as simulações de DM são capazes de reproduzir e descrever adequadamente a conformação de estruturas glicosídicas.

## **Conformational characterization of the glycan structure of antithrombin**

**Camila F. Becker**, Jorge A. Guimarães e Hugo Verli

*Carbohydrate Research*, **2007b**, em preparação.

# Conformational characterization of the glycan structure of antithrombin

**Camila Franco Becker<sup>a</sup>,**

**Jorge A. Guimarães<sup>a</sup> and Hugo Verli<sup>a,b,\*</sup>**

*<sup>a</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves, 9500, CP 15005,  
Porto Alegre 91500-970, Brazil*

*<sup>b</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-  
000, Brazil*

Running title: Conformation of the glycan structure of antithrombin

Key words: carbohydrate modeling/ carbohydrate structure/ molecular dynamics/  
crystallographic contacts

---

\* Corresponding author to whom correspondence should be addressed. Tel.: +55-51-3316-7770; fax: +55-51-3316-7309; e-mail address: hverli@cbiot.ufrgs.br.

**Abstract**

Molecular modeling techniques were used to analyze the conformational profile of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -antithrombin glycosylation structures (ATg), which confers to antithrombin (AT) distinct affinities for heparin. Applying both GROMACS force field and simulation suite, energy contour plots were constructed for each ATg glycosidic linkage. The so obtained geometries were conformationally sampled using molecular dynamics (MD) simulations in order to refine the minimum energy conformation of each contour plot in explicit solvent. The employed methodology allowed us to characterize ATg conformation in solution and suggest  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$   $\omega$  angle as the major responsible for the global oligosaccharide shape. Furthermore, the comparison between the MD obtained ATg conformations and its X-ray derived structures suggests the occurrence of a set of contacts in the crystallographic structure, able to distort the ATg conformation. Globally, the authors expect that the obtained data contributes in the description of the dynamics of AT closest to its biological properties and opens the perspective of contributing in the understanding of biological processes dependent on glycoproteins.

## 1. Introduction

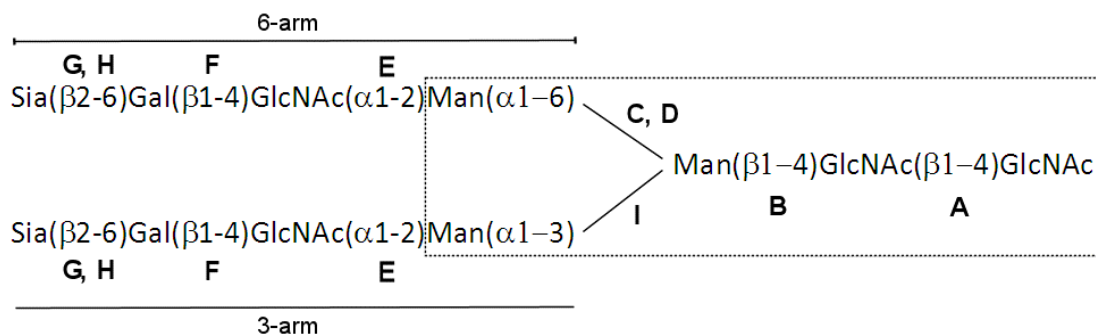
Carbohydrates are involved in many biological processes, being able to modulate protein interaction with its surrounding environment and, consequently, influence macromolecules solubility, activity and biological fate (Marchal *et al.*, 2003). Such influence can occur through non-covalent modulation, as it is the case for heparin, or due to the post-translational modifications, as occurs in glycoproteins (McCoy *et al.*, 2003; Helenius and Aebi, 2001). Additionally, they are also involved in protein folding, oligomerization, quality control, sorting, targeting and transport (Helenius and Aebi, 2001).

Glycosylation is one of the most frequent posttranslational modifications in proteins and more than a half of known proteins are predicted to be modified by glycosylation (Apweiler *et al.*, 1999). It is also a versatile modification, with highly diverse structures ranging from mono- to polysaccharides and from linear to branched molecules, attached to the protein core. There are two major types of glycosylation: *O*-glycosylation, where the sugar is bound to the hydroxyl group from serine or threonine residues, and *N*-glycosylation, where the sugar is attached to the amide function from asparagine in the consensus sequence Asn-X-Ser/Thr, being X any residue but proline.

While the three-dimensional structure of glycoproteins is frequently determined through X-ray crystallographic methods, only few studies have been able to observe the associated oligosaccharides (Hashimoto, *et al.*, 1999; Davies and Lachmann, 1993; Rigby *et al.*, 1999; Sticht *et al.*, 1998). This is partially due to the fact that carbohydrate chains may hinder crystal growth and thus are frequently cleaved off before the crystallizing process (von der Lieth *et al.*, 2006). Furthermore, carbohydrates are highly flexible molecules and consequently, may not have sufficient electron density to be detected by X-ray diffraction methods (von der Lieth *et al.*, 2006).

One example of circumvention of such difficulties is antithrombin (AT). AT is a member of the serine-protease inhibitors family, known as serpins, and inhibits several proteases in the coagulation system, including thrombin and factor Xa, thus, playing a major role in the regulation of blood coagulation. This protease is conformationally activated when bound to unfractionated heparin, which has been used for several decades as an anticoagulant (Nader *et al.*, 2001). This serpin consists of a single polypeptide chain containing 464 amino acid residues and occurs in the blood as a glycoprotein that co-exists in two isoforms,  $\alpha$ - and  $\beta$ -AT, which differ in the amount of glycosylation (N-glycosylation) attached to the protein (Figure 1). In fact, the conformation of its glycosylation structure was almost completely determined by X-ray crystallography (McCoy *et al.*, 2003).

The AT glycosylation structure (ATg) is classified as a complex bi-antennal N-glycans, with terminal sialic acids. It also contains mannose, galactose and N-acetylglucosamine residues (McCoy *et al.*, 2003) (Figure 1).  $\beta$ -AT is glycosylated at three amino acid residue positions, i.e., asparagines 96, 155, and 192, while  $\alpha$ -AT is additionally glycosylated at asparagine 135 (Figure 1). As a consequence,  $\beta$ -AT is bound in a higher degree to the vessel wall than  $\alpha$ -AT, has a higher affinity for heparin, and thus functions as the major inhibitory form of plasma proteases, as thrombin and factor Xa, *in vivo*, although it is the less abundant form (82-90%  $\alpha$ :4-10%  $\beta$ ; Witmer and Hatton, 1991). One additional role of ATg is to control the clearance of AT, since in its absence, AT half-life is extremely reduced *in vivo* (McCoy *et al.*, 2003).



**Figure 1.** Schematic representation of AT glycan structure. The “core” pentasaccharide is limited by dashes. The letters A-I indicate the disaccharide they represent. The 3- and 6-arms are limited by solid lines.

Considering the lack of structural information regarding the effect of glycosylation in heparin-AT recognition and the difficulty in adequately describe carbohydrate behavior in solution using crystallographic and single structure NMR data, this work intends to analyze and properly describe the conformational profile of the  $\alpha$ -ATg and  $\beta$ -ATg structures in aqueous solution using molecular modeling techniques.

## 2. Experimental

### 2.1 Nomenclature and software

Recommended IUPAC (IUPAC-IUB) symbols and nomenclature were used. The relative orientation of a pair of contiguous sugar residues is described by three torsional angles at the glycosidic linkage, denoted  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\omega$  angles. For a (1 $\rightarrow$ 4) linkage, the definitions become those shown in Eqs. (1) and (2),

$$\phi = \text{O-5-C-1-O-1-C-3}' \quad (1)$$

$$\psi = \text{C-1-O-1-C-3}'\text{-C-4}' \quad (2)$$

and for a (1 $\rightarrow$ 6) linkage the definitions become those shown in Eqs. (3), (4) and (5),

$$\phi = \text{O-5-C-1-O-6-C-6}' \quad (3)$$

$$\psi = \text{C-1-O-6-C-6}'\text{-C-5}' \quad (4)$$

$$\omega = \text{O-6-C-6}'\text{-C-5}'\text{-C-4}' \quad (5)$$



The mannose residues are abbreviated by Man; galactose residues by Gal; N-acetylglucosamine residues by GlcNAc, and sialic acids residues by Sia. The disaccharides and the whole ATg topologies were generated with the PRODRG server (van Aalten *et al.*, 1996), the *ab-initio* calculations were performed using GAMESS (Schmidt *et al.*, 1993), manipulation of structures was performed with MOLDEN program (Schaftenaar, 1995) and all MD calculations and analysis were performed using the GROMACS simulation suite and force field (Berendsen, *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2004).

## 2.2 Topology construction

The methodology used for force field conformational description of carbohydrates was previously described by the group (Verli and Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005; Verli and Guimarães, 2005, Becker *et al.*, 2007). Briefly, the constituent ATg disaccharides were built with MOLDEN. The pyranose chair form of each residue was kept in the observed form as described in AT crystallographic structures (PDB IDs: 1E03, 1E04 and 1E05). Each disaccharide was then submitted to the PRODRG server and the initial geometries and crude topologies were retrieved. The same proceeding was used to build the whole ATg structure.

The employed atomic charges are derived from Löwdin scheme (Verli and Guimarães, 2004), obtained at HF/6-31G\*\* level using GAMESS program. Previous data of our group indicates that the atomic charges obtained by this scheme reproduce with high accuracy the geometry of polysaccharides in solution (Becker *et al.*, 2005) and in complex with its target proteins (Verli and Guimarães, 2005, Becker *et al.*, 2007).

## 2.3 Calculation of energy contour plots

The conformational preference of each AT disaccharide was described using energy contour plots. These plots were obtained by varying  $\Phi$ ,  $\Psi$  and  $\omega$  dihedral angles from  $-180$  to  $180^\circ$ , using a  $30^\circ$  step, resulting in a total of 144 conformers for each pair of angles. All conformers were energy minimized with double precision and conjugated gradients for

10,000 steps, using restraints only for  $\Phi$ ,  $\Psi$  and  $\omega$  angles and thus allowing the rest of the molecule to be properly energy minimized. Due to the observation of highly positive intramolecular interactions in some conformations, the energy of the system was further reduced in a molecular dynamics simulation of 5ps at 10K, with an integration step of 0.5fs (Becker *et al.*, 2007). The relative stabilities of each conformation, based on GROMACS force field (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2004) and HF/6-31G\*\* Löwdin atomic charges (Verli and Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005), were used to construct the contour plots.

## 2.4 Molecular dynamics calculations

The main minimum energy conformations for each glycosidic linkage as described in the contour plots, were further refined in 5.0ns molecular dynamics (MD) simulations in aqueous solution using the GROMACS suite. The average geometries so obtained from MD for each linkage were used to build the whole glycan structure (ATg). Only the ATg, without AT proteic structure, was conformationally sampled in a 10.0ns MD simulation in aqueous solution. The disaccharides and the whole oligosaccharide were solvated in a rectangular box using periodic boundary conditions and SPC/E water model (Berendsen *et al.*, 1995). The total system size comprised from ~2.500 to ~2800 atoms for the disaccharide MD simulations and ~5.100 for the whole oligosaccharide MD simulation.

These di- or oligosaccharide-water systems were submitted to a steepest descent minimization and MD simulations applying the Particle-Mesh Ewald method (Darden *et al.*, 1993), at 310 K. The system was slowly heated from 50 to 310 K, in steps of 5 ps, each one increasing the reference temperature by 50K (Verli and Guimarães, 2004). The thermalization, together with the first nanosecond, was considered as equilibration, and all analyses were performed over the remaining part of the trajectory. The geometrical criteria for

a hydrogen bond were  $r \leq 0.35\text{nm}$  (donor – acceptor distance) and  $\alpha \geq 120^\circ$  (donor – hydrogen – acceptor angle; van der Spoel *et al.*, 2004).

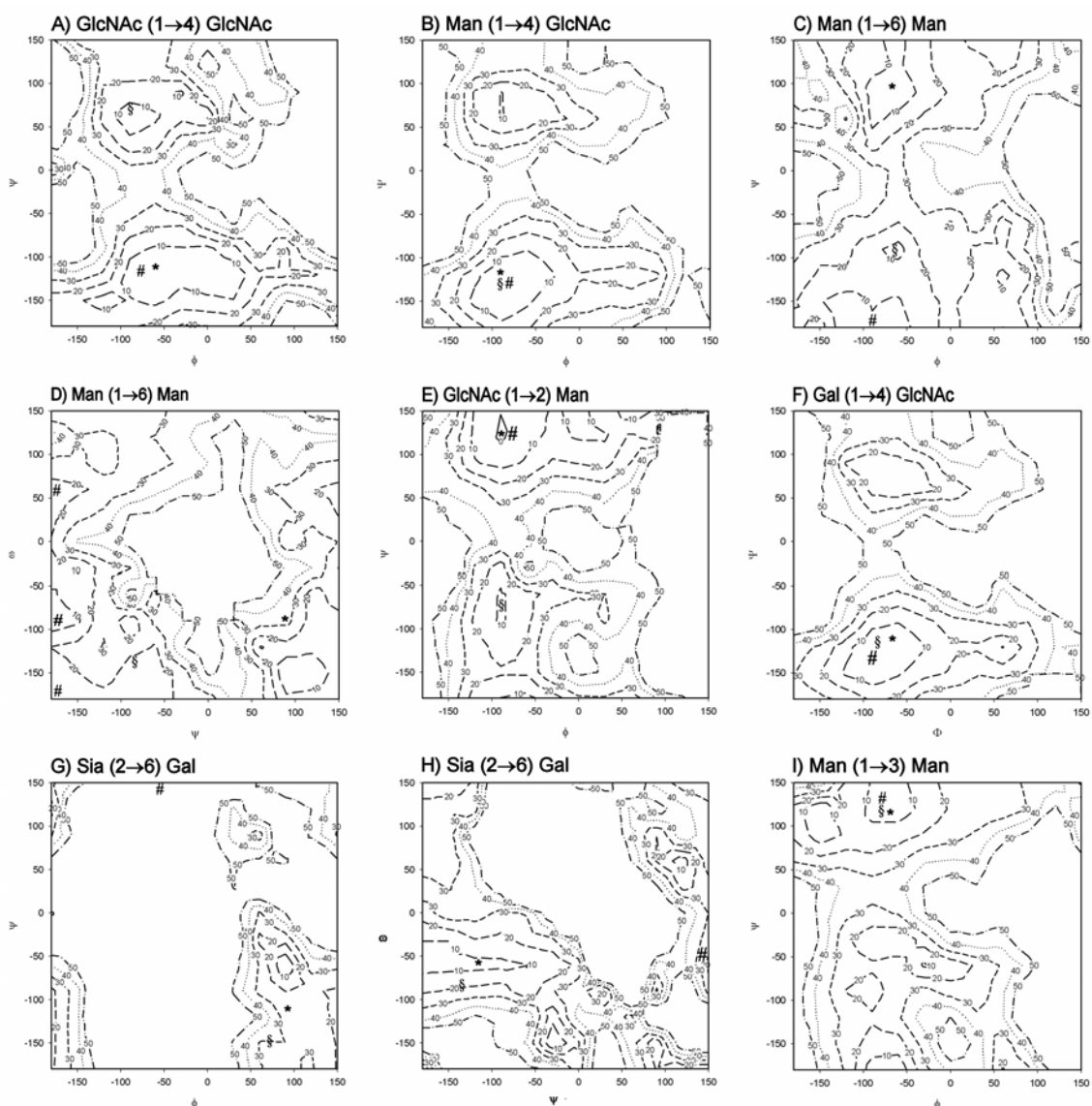
### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Conformational analysis of ATg glycosidic linkages

In order to properly describe the conformational preference of ATg, its geometry was initially sampled at the glycosidic linkage level through the use of disaccharide models. Each model was used to build contour plots indicating the preferred conformation of each ATg linkage, as described in Figure 2.

All  $\beta(1\rightarrow4)$  linkages (GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc, Man $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc and Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc) show a remarkable conformational similarity, independently on the residue type attached to the linkage (Figures 2A, B, and F). This profile agrees with the discrete structural modifications between Man and Gal, as well as indicates that the *N*-acetyl group from GlcNAc has a minor participation in controlling the conformation of these linkages.

All disaccharides present at least two main minimum energy regions. The 1 $\rightarrow$ 6 and 2 $\rightarrow$ 6 linkages present a more complex picture, as expected due to the greater flexibility associated with the  $\omega$  angle (Qasba *et al.*, 1997). However, a distinction should be made between Man $\alpha(1\rightarrow6)$ Man and Sia $\beta(2\rightarrow6)$ Gal disaccharides. As the last one has a series of attached groups close to the linkage, *i.e.* a carboxyl group in position C2 and a bulky substituent in position C5, its flexibility is reduced due to higher steric hindrance. This profile can be observed around  $\phi$  and  $\psi$  angles (Figure 2G compared to Figure 2C), as well as around  $\psi$  and  $\omega$  angles (Figure 2D compared to Figure 2H).



**Figure 2.** Glycosidic linkages contour plots for disaccharides describing ATg glycosidic linkages. The conformational preference of the following linkages is presented: A) GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc; B) Man $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc; C) Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man; D) Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man; E) GlcNAc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)Man; F) Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc; G) Sia $\beta$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal  $\phi$  and  $\psi$  angles; H) Sia $\beta$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal  $\psi$  and  $\omega$  angles; I) Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)Man. Contour levels are shown at every 10 kJ.mol $^{-1}$  from 0 to 50 kJ.mol $^{-1}$ . Asterisks (\*) indicate the input minimum energy conformations for MD refinement, sharps (#) indicate disaccharides final conformations after 5ns MD simulations and (§) indicate oligosaccharide with Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man starting  $\omega$  angle

of 180° conformations after 10ns MD simulations (§ in E represents 6 and 3-arms angles; in F the 3-arm angle and in G the 6-arm angle) .

Additionally, according to previous studies (Qasba *et al.*, 1997), except for the Man $\alpha$ (1→6)Man (Figure 2C, 2D) and for Man $\alpha$ (1→3)Man (Figure 2I) disaccharide moieties, the other constituent disaccharides were more rigid than these two, because they present small and defined minimum energy regions. Man $\alpha$ (1→6)Man disaccharide maps (Figure 2C, 2D) show that its greater flexibility is due to larger minimum energy regions. This occurs because Man $\alpha$ (1→6)Man disaccharide presents an extra linkage between the constituent monosaccharides, *i.e.*, its conformation is described by three torsion angles, which increases the number of possible fluctuations, allowing more conformations to be located in energy minimum regions.

### 3.2 MD simulations

The location and flexibility of the glycosidic linkages play important roles in determining the properties of carbohydrates, especially because these molecules contain side-chains (predominantly hydroxyl, hydroxymethyl and acidic groups such as carboxyl) whose structure and dynamics are of particular significance in the interaction of the carbohydrate with its environment, such as intermolecular interactions with water or solvent molecules, with proteins or with other carbohydrate molecules. Considering that the energy contour plots as those presented in Figure 2 are obtained in vacuum conditions, we proceeded to the refinement of the so obtained minimum energy conformations through MD simulations in explicit solvent.

#### 3.2.1 Disaccharide MD simulations

In order to explicitly include the solvent effects on ATg description, MD simulations in aqueous solution were performed for each ATg disaccharide, using as starting geometry for

the glycosidic linkage the minimum energy conformations described by the contour plots (Figure 2 and Table 1). The average values observed for each disaccharide glycosidic linkage are presented in Table 1. The presence of solvent molecules is of extremely importance, because hydrogen bonds are a significant feature in the study of carbohydrates, due to the presence of a large number of hydroxyl functional groups (Jeffrey, 1990).

**Table 1.** Comparison among average glycosidic linkage angles of the AT constituent disaccharides of the ATg determined by disaccharide energy contour plots, by disaccharides MD simulations and by X-ray crystallographic methods (PDB average).

	<i>Glycosidic linkage</i>	<i>Disaccharide Structure</i>	<i>Average Angle (degree)</i>		
			$\phi$	$\psi$	$\omega$
A	GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	PDB Average <sup>a</sup>	-85.4	-124.8	-----
		Contour plot <sup>b</sup>	-60	-120	-----
		MD	-78.0 $\pm$ 16.7	-128.1 $\pm$ 13.5	-----
B	Man $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	PDB Average <sup>a</sup>	-108.5	-119.6	-----
		Contour plot <sup>b</sup>	-60	-120	-----
		MD	-83.1 $\pm$ 29.1	-134.7 $\pm$ 19.4	-----
C, D	Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man	1E04 <sup>c</sup>	82.1	88.0	135.3
		1E05 <sup>c</sup>	88.0	-175.7	128.0
		Contour plot <sup>b</sup>	-60	90	-90
		MD	-87.9 $\pm$ 20.9	170.0 $\pm$ 44.7	60, 180, -90 <sup>d</sup>
E	GlcNAc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)Man	PDB Average <sup>a</sup>	-84.4	-50.6	-----
		Contour plot <sup>b</sup>	-90	120	-----
		MD	-82.4 $\pm$ 15.9	128.9 $\pm$ 16.3	-----
F	Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	PDB Average <sup>a</sup>	-96.9	64.2	-----
		Contour plot <sup>b</sup>	-60	-120	-----
		MD	-81.7 $\pm$ 23.3	-128.1 $\pm$ 14.1	-----
G, H	Sia $\beta$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal	PDB Average <sup>a</sup>	-----	-----	-----
		Contour plot <sup>b</sup>	90	-120	-60
		MD	-52.1 $\pm$ 32.3	-190.1 $\pm$ 29.0	-70.2 $\pm$ 25.4 <sup>e</sup>
I	Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)Man	1E04 <sup>c</sup>	-65.4	124.7	-----
		1E05 <sup>c</sup>	88.4	128.7	-----
		Contour plot <sup>b</sup>	-60	120	-----
		MD	-80.3 $\pm$ 20.1	123.8 $\pm$ 16.0	-----

<sup>a</sup>Average of the glycosidic linkages of the AT glycan structures from PDB entries 1E03, 1E04, 1E05;

<sup>b</sup>The minimum energy values in each contour plot are the reference geometry used to construct the disaccharides that were further refined by MD simulations;

<sup>c</sup>Glycosidic linkages of the AT glycan structures of PDB entries 1E03, 1E04, 1E05;

<sup>d</sup>Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man  $\omega$  angle presents a fluctuation among three preferred conformations;

<sup>e</sup>Sia $\beta$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal  $\omega$  angle presents a fluctuation among two preferred conformations (also  $\omega$ =65.3 $\pm$ 50.9).

As can be observed in Figure 2 and Table 1, the influence of solvent molecules is not noted in most of the simulated glycosidic linkage, as GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc, Man $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc, GlcNAc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)Man, Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc and Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)Man linkages. Regarding MD simulations of the Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man disaccharide (Figure 2D; Table 1), the  $\omega$  angle frequently fluctuates between 180°, +60° and -90°, and the percentage distributions are around 52%, 32% and 18%, respectively. This behavior is in agreement with previous observations pointing to the high flexibility of 1 $\rightarrow$ 6 linkages (Qasba *et al.*, 1997), being possibly an important source of conformational flexibility and variability. These results suggest that this angle adopts three major preferred conformations and that transitions between different minimum energy conformations can easily take place. This correlates with previous works in which Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man disaccharide from the pentasaccharide core of glycan structures are more flexible than the other disaccharides, and thus, play important roles in determining the overall shape of the whole glycan (Qasba *et al.*, 1997).

Contrarily to the majority of the analyzed linkages, the Sia $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal showed a high dependence on the presence of solvent (Figure 2G, 2H). In fact, the conformation obtained from MD simulations populates a region that corresponds to high energy conformations on the contour plot. It appears that the interactions with solvent molecules are able of reducing the steric constraints imposed by the carboxylate group in C2 and by the bulky substituent in C5.

In addition to the MD description of ATg glycosidic linkages, the obtained data was compared to the previously determined crystallographic structure of AT including its glycosylation structure (PDB IDs 1E03, 1E04 and 1E05; Table 1). As doing so, both  $\phi$  and  $\psi$  dihedral angles in disaccharides GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc, Man $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc and Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)Man (Figure 2A, 2B, 2I; Table 1) present a close agreement among X-ray data, contour plot minimum energy and solution MD conformations, which suggest that such

linkages are less susceptible to conformational influence by solvent molecules. GlcNAc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)Man and Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc  $\psi$  angle (Figure 2E, 2F) are susceptible to solvent influence, despite the  $\phi$  angle is close to the value observed in AT crystal.

Moreover, solvent molecules can notably influence the conformational preferences of Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man glycosidic linkages (Figure 2C, 2D; Table 1), since MD simulation geometries for such linkages are different from that in AT crystal structures. As Sia $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal disaccharide is not usually observed in AT crystal structures, there is no X-ray reference data for comparison.

Considering that the interaction between not directly connected carbohydrate residues closer in space can influence the conformation of the whole glycan structure, we carried out MD simulations of the whole ATg.

### 3.2.2 Whole glycan structure MD simulations

It was generally assumed that the conformational properties of non-branched polysaccharides could be determined from the conformational freedom of their constituent monosaccharides (von der Lieth *et al.*, 1997; Berman *et al.*, 2002). However, despite monosaccharides influence over carbohydrate global conformations some authors report that the probable conformations of an oligosaccharide cannot be suggested only by the conformational studies of its constituent disaccharides (Qasba *et al.*, 1997).

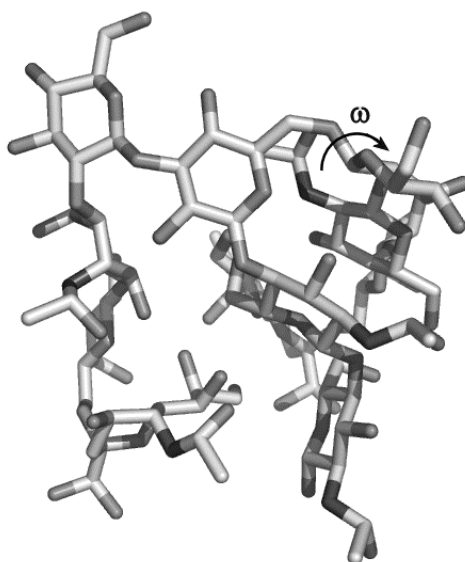
In order to account for the interactions between monosaccharides that are not directly linked, but are spatially close in the oligosaccharide, MD simulations were performed for the whole ATg structure, without considering AT proteic part, based on the average angle value observed for the MD simulation of each glycosidic linkage (Figure 2#; Table 1). Additionally, considering that during the MD simulation of Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man linkage the  $\omega$  angle was observed to fluctuate among three preferred conformations, three MD simulations of the complete glycosidic structure were carried out, varying the starting  $\omega$  angle as 180°, -90° and



60°.

However, the trajectories of each ATg conformation shows a progressive transition between each  $\omega$ . The oligosaccharides with the initial geometries of  $\omega=+60^\circ$  and  $\omega=-90^\circ$  convert to values around  $\omega=180^\circ$  (Table 2). As previously described for complex biantennary structures, the  $\omega$  angle varies preferentially between  $+60^\circ$  and  $180^\circ$ , which confirms our results (Brisson and Carver, 1983). Thus, in the disaccharide,  $\omega$  angle presents three conformer populations in solution and, after ATg MD simulation, such angle adopts a preferential geometry, *i.e.*,  $\omega=180^\circ$ . This result shows that the whole carbohydrate context can stabilize a particular conformation in a situation where more than one conformer is available.

As shown in Figure 3, the simulated AT oligosaccharide with  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  starting  $\omega$  angle of  $180^\circ$  has a globular solution conformation, with the 3- and the 6-arm (depicted in Figure 1) folded back toward the core. Additionally, the dihedral angle values observed for the glycosidic linkages  $\text{GlcNAc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$ ,  $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$  and  $\text{Sia}\beta(2\rightarrow6)\text{Gal}$  are different when each arm is analyzed (Figure 2E, 2F, 2G, 2H; Table 2).



**Figure 3.** Sticks representation of ATg structure obtained after 10.0ns of MD simulations, from  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  starting  $\omega$  angle of  $180^\circ$ .

As the  $\omega$  angle adopts preferentially  $180^\circ$ , the oligosaccharide with  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  starting  $\omega$  angle of  $180^\circ$  will be used for comparison. In general, glycosidic linkage conformations in such simulation underwent conformational changes in relation to that observed for the disaccharides simulated by MD, which indicates that the predicted conformations do not represent their “real” conformations in solution (Table 2).

Some glycosidic linkage conformations changed from the values observed in the disaccharides MD to another minima region observed in the respective contour plots, as  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  disaccharide, which presents alterations in both  $\psi$  and  $\omega$  angles, and  $\text{GlcNAc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$   $\psi$  angle, that has suffered a change in both arms (Figure 2C, 2D, 2E; Table 1 and Table 2). An interconversion of  $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$   $\psi$  angle (Figure 2A; Table 1; Table 2), in oligosaccharide with  $\omega=180^\circ$  starting geometry, to another minimum energy vacuum conformation was also observed. This is because the core fragment  $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{Man}$  is influenced to a great extent by  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  disaccharide geometry. Moreover, since  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  geometry can influence the arms conformations and is suggested as accountable for the global conformation of the oligosaccharide, it is by a consequence, also responsible for determining the core glycosidic linkage angles.

Interestingly,  $\text{Sia}\beta(2\rightarrow6)\text{Gal}$  geometry is altered to regions that comprise high energy value conformations in the respective contour plots (Figure 2G, 2H; Table 1; Table 2). Thus, such conformations (Figure 2A, 2C, 2D, 2E, 2G, 2H) are influenced by the environment, indicating that in an oligosaccharide, the most populated geometry is not necessarily the same as for a disaccharide, alone or in vacuum conditions.

In contrast,  $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$ ,  $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$  and  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$  conformations (Figure 2B, 2F, 2I; Table 1; Table 2) did not present any changes in relation to the geometry observed for disaccharides in aqueous solution or in vacuum. Thus, according to our results

and to previous works (Brisson and Carver, 1983; Qasba *et al.*, 1997),  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$  is not susceptible to solvent effects or to the presence of substituents in any position.

**Table 2.** Comparison of the average glycosidic linkage angles of each disaccharide in the whole oligosaccharide structures determined by MD simulations, with  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$   $\omega$  angle starting with the reference geometry of  $180^\circ$ ,  $-90^\circ$  or  $60^\circ$ .

<i>Glycosidic linkage from MD structure</i>		<i>Average angle (degree)</i>			
		$\phi$	$\psi$	$\omega$	
A	$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	$-78.9\pm14.2^a$	$75.0\pm9.5^{a,d}$	-----	
		$-89.5\pm15.9^b$	$-138.8\pm23.6^b$	-----	
		$-100.3\pm11.9^c$	$-145.7\pm12.2^c$	-----	
B	$\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	$-90.8\pm13.5^a$	$-125.1\pm9.3^a$	-----	
		$-84.9\pm11.6^b$	$-124.7\pm8.8^b$	-----	
		$-51.0\pm13.2^c$	$-121.8\pm10.0^c$	-----	
C, D	$\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$	$-68.6\pm9.8^a$	$-85.1\pm10.6^a$	$-142.4\pm11.6^a$	
		$-67.5\pm10.2^b$	$-89.4\pm10.7^b$	$-143.9\pm11.7^b$	
		$-101.1\pm36.7^c$	$-51.1\pm21.2^c$	$180.5\pm23.8^c$	
E	$\text{GlcNAc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$	6-arm	$-92.0\pm9.1^a$	$69.9\pm11.6^a$	-----
			$-88.7\pm9.4^b$	$68.4\pm11.2^b$	-----
			$-93.1\pm8.7^c$	$61.1\pm10.4^c$	-----
		3-arm	$-87.6\pm13.0^a$	$66.1\pm15.3^a$	-----
			$-78.1\pm13.2^b$	$70.5\pm14.1^b$	-----
			$-141.4\pm10.5^c$	$-147.7\pm11.3^c$	-----
F	$\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$	6-arm	$-63.1\pm17.0^a$	$146.6\pm12.8^a$	-----
			$-75.3\pm16.5^b$	$149.8\pm12.5^b$	-----
			$-69.2\pm16.6^c$	$140.7\pm10.6^c$	-----
		3-arm	$-86.5\pm12.1^a$	$-129.8\pm10.7^a$	-----
			$-77.0\pm14.0^b$	$-122.2\pm12.7^b$	-----
			$-74.6\pm11.0^c$	$-123.7\pm10.5^c$	-----
G, H	$\text{Sia}\beta(2\rightarrow6)\text{Gal}$	6-arm	$73.8\pm21.0^a$	$-140.7\pm21.4^a$	$-81.6\pm27.7^a$
			$95.5\pm44.3^b$	$-171.5\pm35.5^b$	$-76.6\pm22.2^b$
			$69.5\pm9.2^c$	$-133.3\pm16.7^c$	$-73.5\pm14.3^c$
		3-arm	$62.3\pm138^a$	$189.6\pm14.8^a$	$170.8\pm15.7^a$
			$73.1\pm28.8^b$	$187.9\pm20.0^b$	$164.4\pm33.8^b$
			$64.3\pm9.6^c$	$189.5\pm11.7^c$	$184.3\pm13.4^c$
I	$\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$	$-79.0\pm12.4^a$	$121.6\pm12.0^a$	-----	
		$-102.8\pm22.8^b$	$105.2\pm16.1^b$	-----	
		$-84.2\pm11.7^c$	$92.0\pm12.0^c$	-----	

<sup>a</sup>  $\omega = 180^\circ$ ; <sup>b</sup>  $\omega = -90^\circ$ ; <sup>c</sup>  $\omega = 60^\circ$ ; <sup>d</sup> From 0-4500ps the average angle is  $-128.5\pm11.2$ .

It seems that exists an interdependence among the preferred conformations of each disaccharide glycosidic linkage, *i.e.*, the preferred values for the glycosidic linkage angles are

influenced by the presence of close or even distant monosaccharide residues and their conformations, as the average angles are different compared to MD simulations of the disaccharides (Table 1) and the complete ATg structure (Table 2).

As already pointed and as our results show, the  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$   $\omega$  angle is responsible for determining the global shape of this oligosaccharide. The different environments that each arm provides and the different starting geometries for  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  glycosidic linkage  $\omega$  angle modify the environment for each monosaccharide, modulating the whole oligosaccharide geometry. Also, the core and the arms residues are closely located in the oligosaccharide structure. Such observations hence explain the differences between the conformations observed for the glycosidic linkages in the disaccharides and in the complete ATg structure.

These observations show the importance of studying the conformations of the complete oligosaccharide, as molecular models based on the global minimum energy conformations of disaccharides do not necessarily lead to reliable results. Our results underline the importance of simulating the oligosaccharides explicitly considering all the constituent monosaccharides, which stands out for the use of MD simulations in the characterization and refinement of carbohydrates tridimensional structures and conformations.

Differences between the AT glycan conformations determined by crystallographic experiments and by MD simulations were also observed (Table 1 and Table 2), thus raising the possibility that packing effects may be influencing such conformations in the crystal structure.

### **3.3 Crystallographic contacts**

The presence of certain types of interactions between a protein with solvent molecules, other proteins of the crystal unit and oligosaccharides in structures determined by X-ray crystallographic methods, can be undesirable if they are unrepresentative of macromolecules

behavior in biological situations.

Such interactions characterize crystallographic contacts and previous works have already pointed out the existence of packing effects in the determination of protein structures (Jacobson *et al.*, 2002; Eyal *et al.*, 2005; Rapp and Pollack, 2005). In fact, for proteins, hydrogen bonds between aminoacid residues and the different crystallographic waters in two or more different crystals may be responsible for the differences in the hydrogen bond patterns in both crystals, and thus contributing to the differences in the packing modes of two crystals of the same protein (Marfo-Owusu and Kato, 2006). There are also available *on-line* tools that can be used to construct the crystal environment, to analyse the atomic contacts and to graphically represent the surface areas of crystal contacts (Eyal *et al.*, 2005). Though, these programs present some limitations, as they cannot show a graphical representation of the hydrogen bonds between the protein of interest and other proteins of the crystal environment. This limitations can be solved by MD simulation analysis tools that are able to provide a more adequate description of such contacts (Figure 4). Furthermore, most of the crystal contacts are formed by polar aminoacid sidechains (Dasgupta *et al.*, 1997), which increases the possibilities that oligosaccharides, which are characterized by a high polar functionality (Imberty and Pèrez, 2000), may be influenced by such contacts.

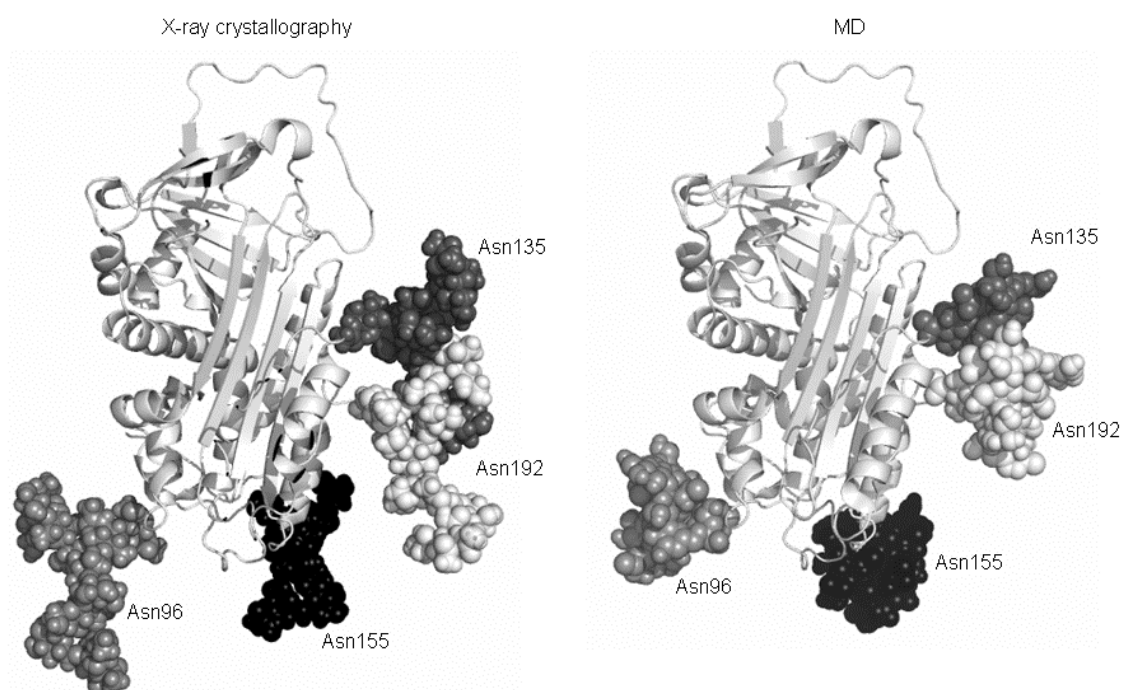
Through the analysis of AT crystalline unit reproduction (using AT structures from PDB entries 1E03, 1E04 and 1E05), interactions like hydrogen bonds, eletrostatic interactions and van der Waals interactions, may occur between ATg and aminoacids from other proteins of the crystal environment, and as a consequence, contribute to the occurrence of interactions that do not characterize such structure conformations in their natural environment.

Some AT aminoacids exemplify suchinteractions with ATg monosaccharides: as Lys 332, Lys 348 and Glu 347, that perform hydrogen bonds, and Tyr363 and Glu 336 that represent electrostatic interactions and backbone interactions between AT and ATg, respectively (data

not shown). As already reported Lys, Glu, Gln and Tyr sidechains are strongly influenced by crystallographic contacts, especially if the crystal structures are determined in different media (Eyal *et al.*, 2005) and as we show, are also the aminoacid residues involved in the major interactions responsible for the misrepresentation of ATg structure.

Moreover, the glycosidic linkages of carbohydrates in solution have considerably greater flexibility than in the crystalline state to an extent that depends on the linkage type and environmental conditions. Thus the interactions observed in AT crystal unit explain the evident differences observed for the conformation of ATg structure determined by MD simulations and by X-ray crystallographic methods (Figure 4).

Therefore, there is mutual influence between two ATg and between protein and ATg that alter both flexibility and conformation of each structure and hence, crystallographic contacts are probably being responsible for the distortion on ATg conformation.



**Figure 4.**  $\alpha$ -ATg structures determined by X-ray crystallographic methods and by MD simulations.

Also, although we have not evaluated ATg conformation when attached to AT proteic structure, it is expected that ATg glycosidic linkages conformations will be different from that observed in solution, since the complexity and the degree of interactions increases, when considering the entire glycoprotein in solution.

Finally, carbohydrate conformations and tridimensional structures determined by MD simulations can be more adequately described and refined than those from X-ray crystallographic methods, even though structure determination by these methods cannot be excluded.

### **Major conclusions**

Also, we cannot evaluate ATg influence in AT function, especially regarding to its interaction with heparin.

The tridimensional structure of the ATg determined by MD simulations presents a conformation that differs in a great extent from the crystallographic conformation. A comparison of the ATg conformations determined by X-ray crystallographic methods and MD simulations suggest the occurrence of crystal contacts, capable of influencing the geometry of ATg in the crystal structure. In addition, disaccharides glycosidic linkage geometries are also affected by the presence of other ATg monosaccharides, which is confirmed by individual disaccharides and whole glycan conformations determined by MD simulations.

The characterization and the effort to unequivocally describe the correct conformation of glycan parts of glycoproteins are especially important since the degree of flexibility may determine to some extent the activity and function of the glycoproteins. Consequently, mimicking the glycosidic linkage geometry of glycosylation structures will hopefully help the understanding of glycans influence in protein function and biological activities.

In this context, the data shown opens the perspective to build the complete structure of AT, both in its  $\alpha$ - and  $\beta$ - isoforms, as well as to evaluate, at the atomic level, the molecular

recognition events responsible for the distinct activation of each AT isoform by heparin. Since it allows a description of the dynamics of AT closest to its biological properties, it can be expected that these data contribute in the understanding of biological processes dependent on glycoproteins, as well as in the design of new synthetic derivatives of heparin.

### Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq – Minister of Science and Technology and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES – Minister of Education, Brasília, Brazil.

### References

- Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1473*, 4–8.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Verli, H. *Carbohydr. Res.*, **2005**, *340*, 1499–1507.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Mourão, P. A. S., Verli, H. *J. Mol. Graph. Model.*, **2007**, *in press*.
- Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. *Comp. Phys. Comm.*, **1995**, *91*, 43-56.
- Berman, H. M.; Battistuz, T.; Bhat, T. N.; Bluhm, W. F.; Bourne, P. E.; Burkhardt, K.; Feng, Z.; Gilliland, G. L.; Iype, L.; Jain, S. et al. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2002**, *58*, 899-907.
- Bohne-Lang, A.; von der Lieth, C. W. GlyProt: in silico glycosylation of proteins. *Nucl. Acids Res.*, **2005**, *33*, W214-W219.  
<http://www.glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php>.
- Brisson, J. R.; Carver, J. P. *Biochem.*, **1983**, *22*, 3671-3680.
- Cremer, D.; Szabo, K. J. In *Conformational Behavior of Six-Membered Rings: Analysis, Dynamics, and Stereoelectronic Effects*, Juaristi, E., Ed.; VCH Publishers Inc., New York, **1995**, pp 71-77.



- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 10089-10092.
- Dasgupta, S.; Iyer, G. H.; Bryant, S. H.; Lawrence, C. E.; Bell, J. A. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **1997**, *28*, 494-514.
- Davies, A.; Lachmann, P. L. *Immunol. Res.*, **1993**, *12*, 258-275.
- Eyal, E.; Gerzon, S.; Potapov, V.; Edelman, M.; Sobolev, V. *J. Mol. Biol.*, **2005**, *351*, 431-442.
- Feizi, T.; Mulloy, B. Editorial overview. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2003**, *13*, 602-604.
- Hashimoto, Y.; Toma, K.; Nishikido, J.; Yamamoto, K.; Haneda, K.; Inazu, T.; Valentin, K.; Opella, S. J. *Biochem.*, **1999**, *38*, 8377-8384.
- Helenius, A.; Aebi, M. *Science*, **2001**, *291*, 2364-2369.
- Imberty, A.; Pérez, S. *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4567-4588.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/psac.html>. Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Xiang, Z.; Honig, B. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *320*, 597-608.
- Jeffrey, G. A. *J. Mol. Struct.*, **1990**, *237*, 75-79.
- Marchal, I.; Glier, G.; Dugas, O.; Majed, M. *Biochimie*, **2003**, *85*, 75-81.
- Marfo-Owusu, E; Kato, T. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **2006**, *452*, 37-48.
- McCoy, A. J.; Pei, X. Y.; Skinner, R.; Abrahams, J. P.; Carrell, R. W. *J. Mol. Biol.*, **2003**, *326*, 823-833.
- Mrksich, M. *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 739-740.
- Nader, H. B.; Pinhal, M. A. S.; Baú, E. C.; Castro, R. A. B.; Medeiros, G. F.; Chavante, S. F.; Leite, E. L.; Trindade, E. S.; Shinjo, S. K.; Rocha, H. A.; Tersariol, I. L. S.; Mendes, A.; Dietrich, C. P. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2001**, *34*, 699-709.
- Qasba, P. K.; Balaji, P. V.; Rao, V. S. R. *J. Mol. Struct.(Theochem)*, **1997**, *395-396*, 333-360.
- Rapp, C. S.; Pollack, R. M. *Proteins: Struct. Func. Bioinf.*, **2005**, *60*, 103-109.

- Rigby, A. C.; Lucas-Meunier, E.; Kalume, D. E.; Czerwiec, E.; Hambe, B.; Dahlqvist, I.; Fossier, P.; Baux, G.; Roepstorff, P.; Baleja, J. D.; Furie, B. C.; Furie, B.; Stenflo, J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 5758-5763.
- Schaftenaar, G. **1997** MOLDEN. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands.
- Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsua, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. *J. Comp. Chem.*, **1993**, *14*, 1347-1363.
- Sticht, H.; Pickford, A. R.; Potts, J. R.; Campbell, I. D. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *276*, 177-187.
- van Aalten, D. M. F.; Bywater, B.; Findlay, J. B. C.; Hendlich, M.; Hooft, R. W. W.; Vriend, G. *J. Comp. Aid. Mol. Des.*, **1996**, *10*, 255-262.  
<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>.
- van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Feenstra, K. A.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. **2004** GROMACS user manual version 3.2, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands.
- Verli, H.; Guimarães, J. A. *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339*, 281-290.
- Verli, H.; Guimarães, J.A. *J. Mol. Graph. Mod.*, **2005**, *242*, 203-212.
- von der Lieth, C.-W.; KozBr', T.; Hulla, W.E. *J. Mol. Struc. (Theochem)*, **1997**, *395-396*, 225-244.
- von der Lieth, C.-W.; Lütteke, T.; Frank, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1760*, 568-577.
- Witmer, M. R.; Hatton, M. W. *C. Arterioscl. Thromb.*, **1991**, *11*, 530-539.

## 5 Discussão Geral

### 5.1 Galactana e fucana

A descrição da galactana e da fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas insere-se no contexto da aplicação de métodos computacionais no desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes, baseados na estrutura e mecanismo de ação da heparina. De fato, o entendimento da estrutura 3D e das propriedades dinâmicas de oligossacarídeos constitui-se em um importante pré-requisito para a compreensão das bases moleculares do reconhecimento destes compostos por suas proteínas-alvo (Imberty e Pérez, 2000). Assim, os métodos de MM foram aplicados para o estudo de novos compostos capazes de servir como protótipos de novos agentes e de mimetizar as atividades anticoagulantes da heparina, como as galactanas e as fucanas.

#### 5.1.1 Descrição da geometria das ligações glicosídicas

Anéis de 6 membros (hexopiranoses) apresentam diversas conformações possíveis (Cremer e Szabo, 1995). No que refere-se à atividade anticoagulante da heparina, tais conformações são de extrema relevância, pois representam aspectos conformacionais que influenciam a atividade da heparina. Os resíduos de IdoA apresentam uma elevada mobilidade por adotarem um equilíbrio conformacional não usual entre uma mistura de confôrmeros, principalmente entre estados de cadeiras ( ${}^1C_4$  e  ${}^4C_1$ ) e bote-torcido ( ${}^2S_0$ ) (Ferro *et al.*, 1990; Tabela 2). A flexibilidade deste resíduo confere à molécula de heparina aspectos conformacionais próprios (Danielsson *et al.*, 1986) e sugere-se que esta característica do IdoA contribua para as propriedades anticoagulantes da heparina (Mikhailov *et al.*, 1996), embora a predominância dos confôrmeros do IdoA tenha permanecido controversa por algum tempo (Rees *et al.*, 1985; Casu *et al.*, 1986).

Em geral, a maioria da hexopiranoses existe como um único confôrmero em solução, principalmente nas formas de cadeiras  ${}^1C_4$  ou  ${}^4C_1$  (Pérez *et al.*, 1996; Horita *et al.*, 1997). Assim, de forma a verificar a influência da conformação do anel na geometria das ligações glicosídicas, as conformações  ${}^4C_1$  e  ${}^1C_4$  foram analisadas para os resíduos de L-galactose e L-fucose (Tabela 2). A descrição da conformação de carboidratos é avaliada em função dos ângulos de diedro de suas ligações glicosídicas, denominados  $\phi$  e  $\psi$  (e  $\omega$ , para ligações 1 $\rightarrow$ 6). Em função destas

características, a geração de mapas de contorno é uma ferramenta útil para prever a conformação das ligações glicosídicas de carboidratos. Estes mapas descrevem a energia associada a cada conformação gerada pela combinação de diferentes valores de  $\phi$  e  $\psi$  sugerindo, assim, as prováveis conformações mais estáveis para uma determinada ligação glicosídica (Figura 11).

A análise dos mapas de contorno das ligações glicosídicas dos dissacarídeos 2-sulfatados de galactana e de fucana mostrou apenas uma região de mínimo de energia principal para os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  de cada dissacarídeo. A interconversão entre as conformações  ${}^4C_1$  e  ${}^1C_4$  não introduziu grandes mudanças nas preferências conformacionais das ligações glicosídicas descritas pelos mapas de contorno, indicando ausência de influência da forma do resíduo para a conformação destes polissacarídeos. Este tipo de resposta é observada para o resíduo de IdoA da estrutura da heparina, pois não são observadas diferenças nas mudanças conformacionais induzidas na AT pela heparina com este resíduo nas conformações de cadeira ( ${}^1C_4$ ) ou bote-torcido ( ${}^2S_0$ ) (Verli e Guimarães, 2005). Embora a forma da cadeira não implique em diferenças significativas na geometria da ligação glicosídica, as energias observadas nos mapas de contorno para cada conformação mostram que a forma  ${}^1C_4$  confere maior estabilidade às ligações glicosídicas dos dissacarídeos, do que quando os resíduos estão na forma  ${}^4C_1$ . Estes dados sugerem então, que para os dissacarídeos de L-galactose e L-fucose a conformação  ${}^1C_4$  é preferida em relação à forma  ${}^4C_1$ .

De acordo com estes dados, a comparação das constantes de acoplamento experimentais e teóricas sugere ainda, que a conformação  ${}^1C_4$  é a predominante em solução para os resíduos de L-galactose e L-fucose. Contudo, os valores obtidos pelos cálculos de Karplus para a determinação das constantes de acoplamento teóricas apresentam um desvio das constantes de acoplamento experimentais (maiores que 2,0Hz). Tal desvio ocorre em razão de que o equilíbrio dos confôrmeros é sensível aos substituintes ligados ao fragmento H-C-C-H e a relação da equação de Karplus entre as constantes de acoplamento e os ângulos de diedro é mal parametrizada para carboidratos carregados (Horita *et al.*, 1997). Apesar deste desvio, os valores teóricos e experimentais são semelhantes, o que indica que os métodos de MM são capazes de descrever o comportamento de tais monossacarídeos mesmo na ausência de dados experimentais.

Além da conformação das hexopiranoses, grupamentos sulfato também são capazes de influenciar a preferência conformacional das ligações glicosídicas. Neste sentido, foram construídos mapas de contorno para dissacarídeos de galactana e fucana não-sulfatados de forma a verificar a susceptibilidade da conformação dos dissacarídeos à este grupamento. De fato, as regiões de mínimo de energia dos mapas de contorno corresponderam a ângulos semelhantes para as ligações glicosídicas na presença e na ausência dos grupos sulfato. Contudo, os dissacarídeos não sulfatados apresentaram um perfil conformacional mais flexível que na presença de sulfato. Isto indica que, na ausência do sulfato, a flexibilidade da ligação glicosídica é maior que na presença do mesmo. Assim, a presença do sulfato está relacionada com a rigidez do carboidrato e não com determinação da preferência conformacional.

#### 5.1.2 DM de polissacarídeos de ouriço-do-mar

A característica altamente polar de carboidratos implica em uma interação forte com as moléculas de água circundantes, das quais importantes forças para o enovelamento e as funções dos carboidratos podem surgir (Smithrud *et al.*, 1991; Kirschner e Woods, 2001). Assim, a inclusão de moléculas de solvente explícito é importante para refinar e padronizar as conformações de mínimo de energia obtidas através da análise conformacional de carboidratos (Pèrez *et al.*, 1998).

Com este intuito, foram realizadas simulações de DM de decassacarídeos de galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas. A análise dos ângulos de diedro das ligações glicosídicas de tais decassacarídeos após simulações de DM mostraram que a média das geometrias obtidas correspondem às regiões de mínimo de energia dos respectivos mapas de contorno, indicando que o solvente não exerce influência significativa na conformação dos decassacarídeos de galactana e fucana.

Contudo, ao contrário do observado nos mapas de contorno, a conformação dos resíduos influencia consideravelmente a dinâmica global do polissacarídeo, pois a geometria das ligações glicosídicas é similar entre a galactana e a fucana quando seus resíduos estão na forma  ${}^1C_4$ , enquanto que com os resíduos na forma  ${}^4C_1$ , observam-se diferenças consideráveis na conformação da ligação glicosídica entre as mesmas. Assim, nestes decassacarídeos, a geometria das ligações glicosídicas pode sofrer alterações significativas em função da conformação das hexopiranoses.

### 5.1.3 Caracterização dos complexos galactana-AT e fucana-AT

Os cálculos de *docking* realizam a exploração dos possíveis modos de ligação de um ligante em um determinado receptor, enzima ou proteína-alvo (van de Waterbeemd *et al.*, 1997). Os algoritmos de *docking* tentam identificar a conformação/orientação do ligante mais favorável energeticamente quando ligado à proteína, objetivando encontrar a interação que resulta em menor energia (Thomsen, 2003). A descrição dos complexos dos decassacarídeos de galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas, com os resíduos na forma  ${}^1C_4$ , na ligação à AT por experimentos de *docking* permitiu a identificação do papel de alguns dos resíduos de aminoácidos da AT na interação entre ligante e receptor, bem como auxiliou na identificação das diferenças nas atividades apresentadas pela galactana e pela fucana.

Alguns fatores importantes devem ser considerados para os experimentos de *docking*, tais como: fatores estéricos, eletrostáticos, interações por ligações de hidrogênio, desolvatação, entropia rotacional e entropia translacional (Kitchen *et al.*, 2004). Dentro destes fatores estão incluídas algumas limitações dos programas de *docking*, as quais referem-se à dificuldade de previsão de afinidade, além da não consideração de efeitos de solvente e a descrição do sistema de forma rígida (Kitchen *et al.*, 2004). Assim, os cálculos de *docking* podem ser utilizados para a previsão da conformação e orientação iniciais (Warren *et al.*, 2005). Contudo, o *docking* pode ser complementado por simulações de DM, as quais incluem as variáveis acima citadas e funcionam como uma estratégia para o refinamento do sistema em estudo.

Desta forma, buscando considerar moléculas de solvente na interação galactana- e fucana-AT e permitir o relaxamento dos sistemas, foram realizadas simulações por DM dos complexos obtidos por *docking*, em solução aquosa. Os sistemas simulados foram avaliados quanto à energia de interação entre os decassacarídeos e a AT.

A energia de interação entre galactana-AT e fucana-AT após as simulações por DM mostrou-se equivalente para ambos decassacarídeos, estando de acordo com a semelhança conformacional dos mesmos em solução aquosa. Contudo, conforme observado através dos experimentos de *docking*, a orientação destes polissacarídeos na interação com a AT é diferente. A orientação da galactana assemelha-se à orientação cristalográfica do pentassacarídeo sintético complexado

à AT, ao contrário do que observa-se para a fucana. Assim, ambos polissacarídeos são capazes de interagir com a AT, mas apenas para a galactana seria possível a interação com trombina, o que explica a ausência de atividade anticoagulante da fucana e confirma os resultados que indicam que a galactana atuaria através do mecanismo de ponte (Melo *et al.*, 2004).

A contribuição específica de cada resíduo de aminoácido para o complexo heparina-AT demonstra os resíduos-chave para a formação dos complexos, auxiliando assim no desenvolvimento de novos compostos bioativos ao identificar sítios-alvo para o desenho de tais compostos. Na interação do pentassacarídeo sintético com a AT (PDB 1E03), os resíduos de aminoácidos mais importantes são a Arg129, a qual está localizada na região N-terminal da hélice D e envolvida na expansão da mesma na ativação da AT por GAGs (Verli e Guimarães, 2005), e a Lys125, que apresenta papel fundamental no reconhecimento da heparina pela AT (Schedin-Weiss *et al.*, 2002). De fato, as interações mais importantes na interação entre a galactana 2-sulfatada, 3-ligada ( $^1C_4$ ) e a AT são com os resíduos Arg129 e Lys125, cujos valores de energia de interação ( $E_{int}$ ) com a galactana são de -61,7kJ/mol e -72,6 kJ/mol, respectivamente. Tais interações da galactana diferem das  $E_{int}$  destes resíduos com a heparina, pois os valores de energias da última com a Arg129 e a Lys125 são de -27,4kJ/mol e -25,2 kJ/mol. Os resíduos Arg 47 e Lys114, que apresentam energia de interação elevada com o pentassacarídeo sintético (Verli e Guimarães, 2005), não contribuem na formação dos complexos galactana-AT e fucana-AT, o que corrobora a menor atividade anticoagulante destes compostos em relação ao pentassacarídeo sintético.

As interações da fucana com a Lys125 e a Arg129, realizadas através de interações eletrostáticas com grupos sulfato, e com resíduos hidrofóbicos (Phe121, Phe122, Tyr131; Figura 13B), realizados com os grupos metila na posição C6, representam interações responsáveis pela conservação da orientação distinta da cadeia polissacarídica da fucana na complexação à AT em relação à galactana. Enquanto a manutenção da orientação da galactana na complexação à AT pode ser exemplificada pela ausência destas interações hidrofóbicas e pela existência de interações com resíduos polares e básicos como Lys125, Arg129, Arg132, Lys136 e Lys275 (Figura13A), o que sugere que as interações eletrostáticas predominem na sua complexação à AT.

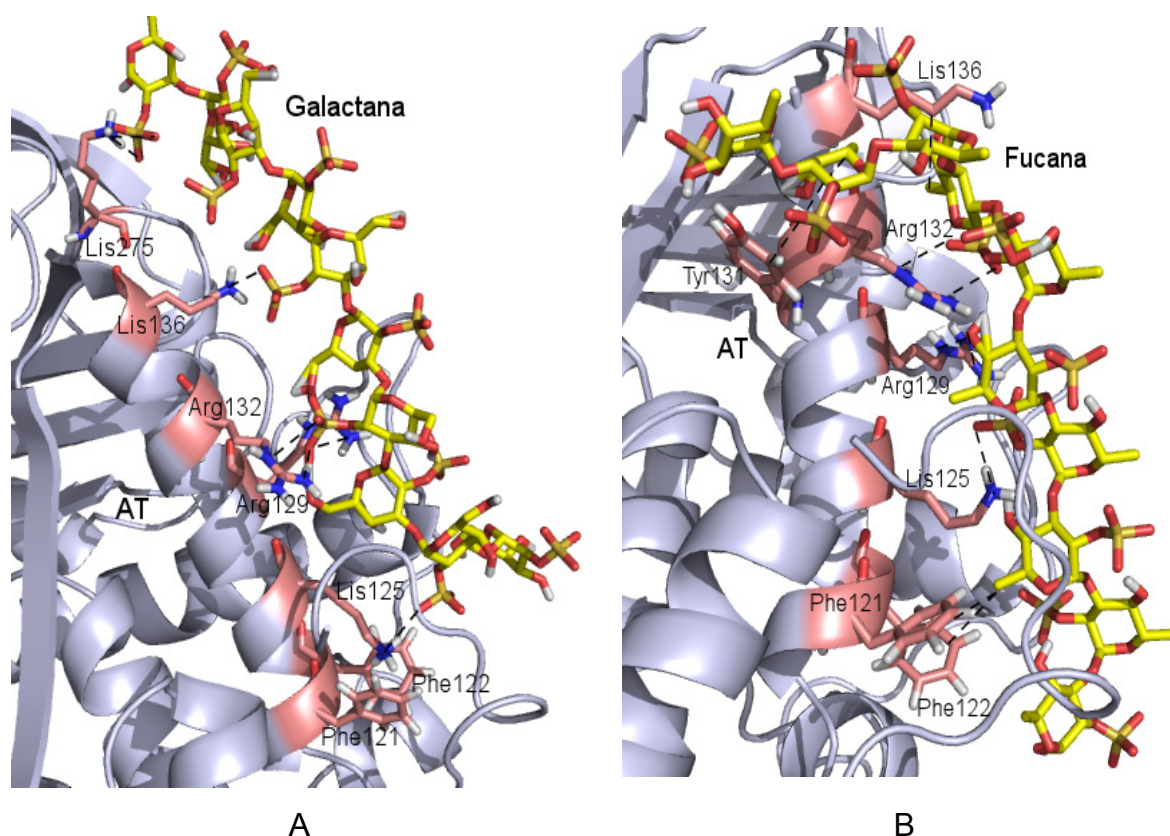


Figura 13. Interações da galactana (A) e da fucana (B) com aminoácidos da AT.

De fato, algumas interações devem ser mantidas para estabilizar os complexos galactana-AT e fucana-AT. Para que tal manutenção ocorra em cada complexo, os grupos de átomos dos polissacarídeos, bem como os aminoácidos envolvidos nas interações, são distintos (Figura 13), embora as energias de interação dos complexos formados sejam estatisticamente semelhantes ( $E_{\text{int}} = -635.4 \pm 93.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$  para galactana-AT e  $E_{\text{int}} = -758.0 \pm 85.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$  para fucana-AT). Logo, apesar da semelhança conformacional da galactana e fucana, mesmo complexadas à AT (Tabela 3), a interação de tais polissacarídeos com as cadeias laterais dos aminoácidos da proteína, bem como a orientação destes resíduos na formação dos complexos são diferentes, explicando, portanto, as orientações distintas da galactana e fucana na complexação à AT.



Tabela 3: Ângulos de diedro médios das ligações glicosídicas dos decassacarídeos de galactana e fucana 2-sulfatadas, livres em solução ou complexados à AT.

Ângulo de diedro	Diedro médio (°)			
	<i>Galactana sulfatada</i> ${}^1C_4$		<i>Fucana sulfatada</i> ${}^1C_4$	
	Livre	Complexo	Livre	Complexo
$\Phi$	$-104 \pm 14$	$-100 \pm 11$	$-104 \pm 15$	$-98 \pm 12$
$\Psi$	$-107 \pm 15$	$-105 \pm 12$	$-121 \pm 15$	$-114 \pm 11$

As simulações DM mostraram, ainda, a acomodação da galactana e da fucana na interação com a AT sem, contudo, haver mudanças significativas nas suas conformações globais (Tabela 3; Figura 14), reforçando assim a importância da DM para o refinamento e a descrição de complexos obtidos por cálculos de *docking*.

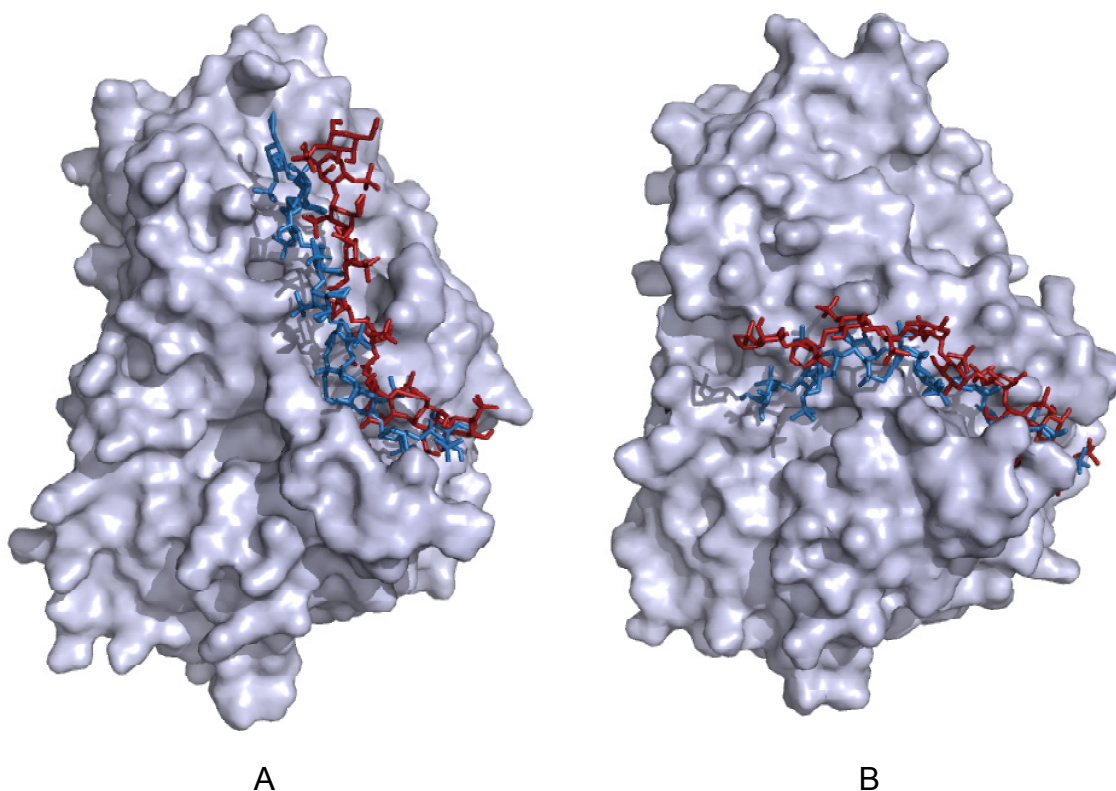


Figura 14. Complexos galactana-AT (A) e fucana-AT (B), no início (vermelho) e após 5.2ns (azul) de simulação de DM. A AT está na mesma orientação em A e em B.

Assim, os processos de docking permitiram caracterizar a conformação da galactana e da fucana quando complexadas à AT e explicar, após refinamento por simulações de DM, as diferenças nas atividades anticoagulantes das mesmas.

## 5.2 Estrutura de glicosilação da AT

As glicoproteínas estão amplamente distribuídas na natureza e ocorrem em todos os compartimentos celulares. As estruturas glicosídicas apresentam papel fundamental na modulação da interação de uma proteína com seu meio circundante, influenciando suas atividades e destinos biológicos. Estas também estão envolvidas no enovelamento correto de proteínas, controle de qualidade, seleção e transporte (Helenius e Aebi, 2001). Apresentam particular importância na superfície das células, onde regulam processos críticos fundamentais na comunicação intercelular, como interações célula-célula e célula-matriz extracelular, proliferação celular e infecção (Helenius e Aebi, 2001). O papel biológico dos oligossacarídeos distingue as proteínas que são cruciais para o funcionamento e desenvolvimento de um organismo, pois estão envolvidos na mediação do reconhecimento específico ou na modulação de processos biológicos (Varki, 1993). Em função da enorme importância das estruturas de glicosilação das proteínas para as suas atividades biológicas, surge a necessidade do estudo da estrutura e conformação da parte sacarídica de glicoproteínas.

Existem informações importantes acerca da estrutura e função da AT, seja de origem cristalográfica (McCoy *et al.*, 2003), seja bioquímica (Franzén *et al.*, 1980; Turk *et al.*, 1997; Demelbauer *et al.*, 2005). Contudo, embora já esteja descrita a importância da glicosilação da AT para as suas propriedades hemostáticas (McCoy *et al.*, 2003), pouca informação estrutural está disponível acerca de sua forma completa, glicoprotéica. A única fonte de informação neste sentido é cristalográfica (McCoy *et al.*, 2003), e não elucidada o papel da glicosilação na modulação das propriedades anticoagulantes da AT. Adicionalmente, carboidratos podem ser particularmente sensíveis a efeitos de empacotamento cristalino, o que pode comprometer o uso da conformação cristalográfica na interpretação dos aspectos estruturais de suas funções hemostáticas.

Nosso grupo demonstrou previamente a aplicação de simulações de DM na descrição da ativação da AT pelo pentassacarídeo sintético (Verli e Guimarães, 2005). Contudo, à época, a inclusão da descrição de informações estruturais acerca do padrão de glicosilação da AT humana apresentava dificuldades metodológicas, além de demandar um elevado custo computacional. A partir da determinação da estrutura cristalográfica da AT glicosilada, partimos para o refinamento de nossos modelos computacionais desta serpina, buscando descrever suas propriedades de

forma o mais próximo possível das observadas no plasma. Neste processo, a primeira etapa envolve a determinação da conformação da parte glicosídica da AT em solução, confrontando-a aos dados cristalográficos. A partir dos dados obtidos, será possível em um segundo momento, avaliar o papel desta estrutura de glicosilação na conformação da AT e no seu reconhecimento pela heparina.

Para esta primeira etapa do trabalho, a estratégia escolhida envolveu a geração de mapas de contorno para os dissacarídeos da estrutura de glicosilação, seguido de simulações de DM dos mesmos para avaliar a influência do solvente na conformação das ligações glicosídicas. Por fim, foram realizadas simulações de DM da estrutura de glicosilação completa, bem como a comparação das estruturas finais com a conformação cristalográfica da parte glicosídica nos cristais da AT.

### 5.2.1 Descrição das ligações glicosídicas da estrutura de glicosilação da AT

O método utilizado para acessar o espaço conformacional de unidades dissacarídicas foi a construção de mapas de contorno tipo Ramachandran, relacionando a energia de cada conformação aos ângulos de torção  $\phi$ ,  $\psi$  e  $\omega$  das ligações glicosídicas (Figuras 11 e 15). A conformação dos monossacarídeos foi mantida como  ${}^4C_1$ , conforme estruturas cristalográficas (PDB IDs 1E03, 1E04 e 1E05). De fato, hexopiranosos na forma  ${}^4C_1$  são preferidas, pois apresentam os substituintes na posição equatorial, enquanto que na forma  ${}^1C_4$  os substituintes estão na posição axial (Pérez *et al.*, 1996). Conformações onde os grupos hidroxila estão em orientações equatoriais são preferenciais, pois apresentariam menor interferência com o solvente em comparação com grupos em posição axial (Uedaira *et al.*, 2001).

Os mapas de contorno permitiram a descrição gráfica das mudanças de energia como uma função da orientação relativa dos monossacarídeos e apontaram a conformação do mínimo de energia, as rotas de interconversão entre os confôrmeros e a altura das barreiras de transição. Para a estrutura de glicosilação, os mapas indicaram que cada ligação glicosídica apresenta duas conformações preferenciais, exceto pelas ligações glicosídicas dos dissacarídeos  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  e  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$ , para os quais observam-se mais de duas regiões de mínimo de energia. A presença de substituintes volumosos no dissacarídeo  $\text{Sia}\beta(2\rightarrow6)\text{Gal}$  parece ainda, diminuir a flexibilidade da ligação glicosídica devido a efeitos de interferência estérica intramolecular.

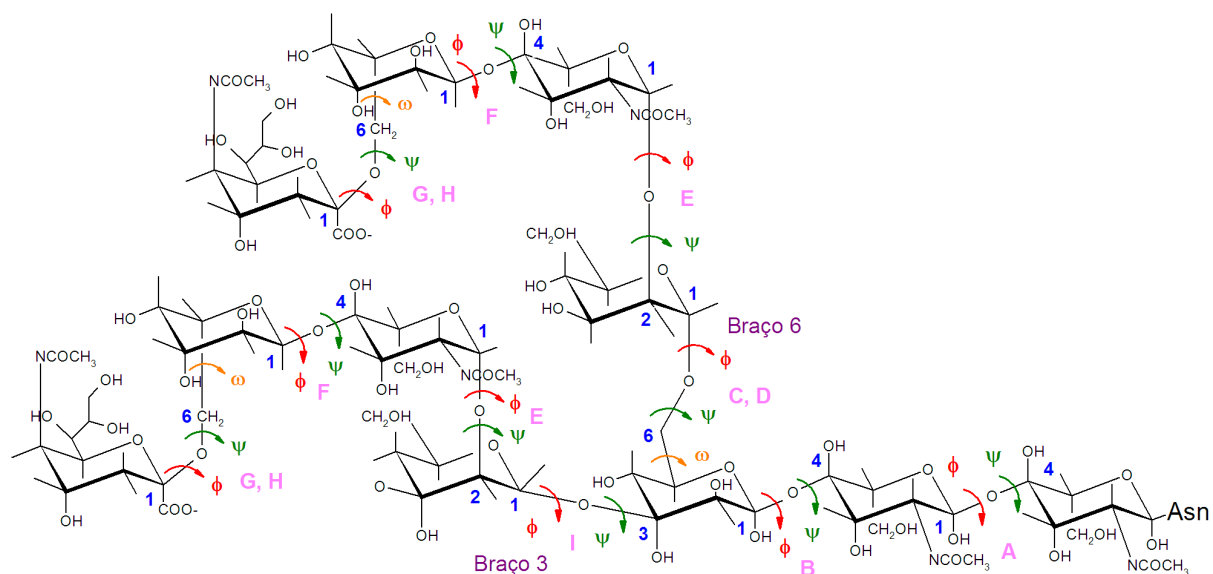


Figura 15. Ângulos de diedro da estrutura glicosídica da AT analisados. As letras representam os dissacarídeos estudados: GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc (A), Man $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc (B), Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man (C, D), Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)GlcNAc (E), Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)Man (F), Sia $\beta$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal (G, H), Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)Man (I). Os ângulos de diedro  $\phi$  (vermelho),  $\psi$  (verde) e  $\omega$  (laranja) definem a ligação glicosídica de cada ligação glicosídica.

A presença de moléculas de solvente é crucial para a determinação da estrutura tridimensional de carboidratos, dada sua alta polaridade e sua habilidade de realizar interações por ligações de hidrogênio (Item 5.1.2). Neste contexto, de forma a incluir moléculas de solvente explícito para avaliar sua influência na caracterização da conformação das ligações glicosídicas da estrutura de glicosilação da AT, foram realizadas simulações por DM dos dissacarídeos que constituem a ATg. Cada dissacarídeo foi construído utilizando-se a conformação correspondente à região de mínimo de energia dos respectivos mapas de contorno. Para mapas de contorno com mais de uma região de mínimo de energia, a geometria do dissacarídeo foi determinada pela escolha da conformação correspondente ao centro da região de mínimo de energia nos respectivos mapas tal que sua orientação fosse similar à observada na estrutura cristalográfica da AT. De fato, os resultados obtidos indicaram a ausência da influência do solvente na determinação da conformação da maioria dos dissacarídeos, pois exceto pelas geometrias obtidas para as ligações glicosídicas dos dissacarídeos Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man e Sia $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal, as médias obtidas para os demais dissacarídeos estão de acordo com os valores previstos pelos mapas de contorno.

No caso do dissacarídeo Sia $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 6)Gal em solução aquosa, a diferença observada em relação à geometria no mapa de contorno pode ser devido à redução da interferência estérica causada pelo grupamento carboxila na posição C2 do resíduo de ácido siálico e pela maior flexibilidade deste dissacarídeo em solução aquosa, pois, assim como o dissacarídeo Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man, sua conformação é determinada por três ângulos de diedro ( $\phi$ ,  $\psi$  e  $\omega$ ). O aspecto mais importante observado durante as simulações realizadas refere-se ao ângulo  $\omega$  do dissacarídeo Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man, que adota três conformações principais: 180°, +60° e 90°. Tal observação é de grande relevância, já que este ângulo têm sido descrito como o dissacarídeo responsável por determinar a conformação global de oligossacarídeos N-ligados (Qasba *et al.*, 1997).

### 5.2.2 Descrição da estrutura de glicosilação da AT

A elucidação da conformação da ATg é importante para a posterior descrição das estruturas completas da  $\alpha$ -AT e  $\beta$ -AT, e para a caracterização das razões moleculares para o reconhecimento distinto destas isoformas de AT pela heparina. De forma a considerar as interações entre monossacarídeos não ligados covalentemente, mas próximos espacialmente, e em função da observação de que a geometria em torno da ligação glicosídica do dissacarídeo Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man apresenta mais de uma conformação preferencial, três simulações de DM da estrutura de glicosilação da AT completa foram realizadas.

A diferença entre os oligossacarídeos simulados consistiu na geometria inicial do ângulo  $\omega$  de Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man, cujos valores no início da simulação de DM foram de 180°, 60° ou -90°. As conformações obtidas em cada simulação, apresentaram uma forma globular, com ambos braços (Figura 4) voltados para o pentassacarídeo central da estrutura de glicosilação da AT. Apesar da forma globular semelhante, a conformação das ligações glicosídicas no braço 6 é distinta nas três estruturas, mostrando a influência do ângulo  $\omega$  para a geometria das ligações glicosídicas deste braço. O ângulo  $\omega$ , nas simulações em que seu valor inicial foi de +60° ou -90°, tende à conversão para valores próximos de 180°, indicando que transições entre as conformações preferenciais ocorrem facilmente (Figura 16).

Estes dados estão de acordo com a proporção das conformações do ângulo  $\omega$  no dissacarídeo Man $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)Man, onde o valor 180° é majoritário e corresponde a

mais de 50% da população de conformações para este ângulo (Figura 16). Trabalhos anteriores confirmam os valores observados no presente trabalho para oligossacarídeos N-ligados do subtipo complexo e bi-antenal, de forma que o ângulo  $\omega$  varia geralmente entre  $+60^\circ$  e  $180^\circ$  neste subtipo (Brisson e Carver, 1983).

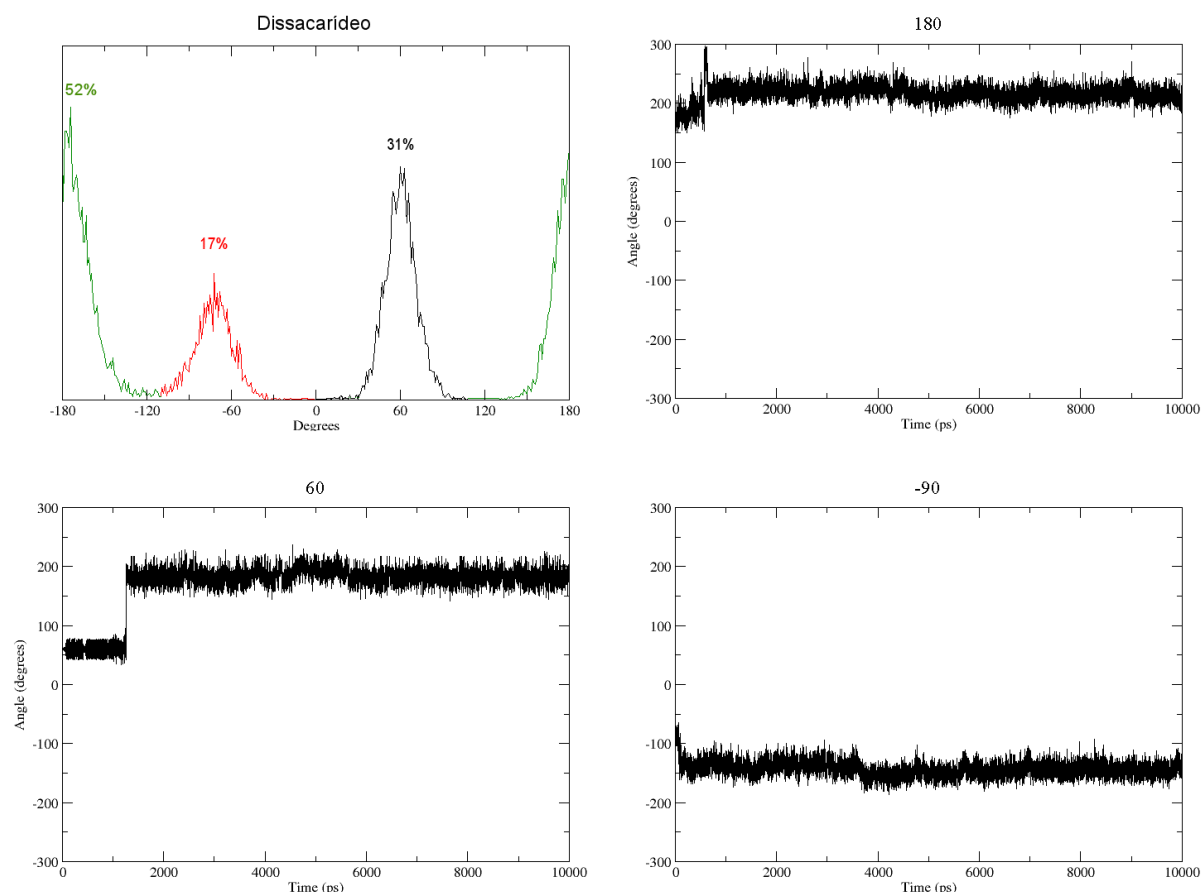


Figura 16. Análise populacional do ângulo  $\omega$  após simulações por DM do dissacarídeo  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ . O ângulo  $\omega$  no valor de  $180^\circ$  (verde) corresponde a 52%;  $60^\circ$  (vermelho) corresponde a 31%; e  $90^\circ$  (preto) corresponde a 17%. Variação do ângulo  $\omega$  do dissacarídeo  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  ao longo de 10.000ps de simulação de DM, com o valor inicial para o ângulo  $\omega = 180^\circ$ ,  $60^\circ$  e  $-90^\circ$ .

As simulações de DM do oligossacarídeo mostraram ainda que a geometria de alguns dissacarídeos ( $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$  e  $\text{GlcNAc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$  em ambos braços,  $\text{Sia}\beta(2\rightarrow6)\text{Gal}$  do braço 3 e  $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$  do braço 6) sofrem uma mudança em relação à observada nos dissacarídeos isoladamente (mapas de contorno e simulações de DM). Estas alterações incluem mudanças para a geometria

relacionada ao outro mínimo de energia previsto pelos respectivos mapas de contorno. Adicionalmente, ocorrem alterações no braço 3, pois dissacarídeos de mesma constituição em cada braço da estrutura oligossacarídica, como os dissacarídeos E, F e G,H (Figura 15), apresentam geometrias distintas. Tais resultados mostram não só a influência do ângulo  $\omega$  de  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ , mas da presença de outros resíduos, mesmo que não diretamente ligados, na conformação dos dissacarídeos. Assim, diferenças significativas nas preferências conformacionais dos ângulos de torção das ligações glicosídicas são observadas pela presença ou ausência de outros monossacarídeos, indicando que diferentes monossacarídeos são capazes de influenciar a geometria das ligações glicosídicas.

De acordo com os dados obtidos, mesmo monossacarídeos distantes podem influenciar a preferência conformacional de uma determinada ligação glicosídica, existindo portanto, uma interdependência entre as conformações preferidas da ligação glicosídica de cada dissacarídeo. Neste caso, como cada conformação é definida em função do ângulo  $\omega$  do dissacarídeo  $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ , este parece ser o principal responsável pela determinação da conformação global deste oligossacarídeo.

### 5.2.3 Contatos cristalográficos

A aplicação de métodos de cristalografia e de RMN para o estudo de carboidratos apresenta alguns problemas associados à descrição da estrutura 3D e conformação dos mesmos e, geralmente, resultam em um único modelo 3D, o que dificulta a representação adequada das propriedades dinâmicas de tais compostos (Pèrez e Mulloy, 2005). Assim, a determinação de estruturas 3D de biomoléculas por RMN e por métodos de cristalografia de raios-X são áreas que se beneficiam diretamente da DM, pois esta possibilita a descrição dinâmica e, portanto, o refinamento do sistema em estudo (Karplus e Petsko, 1990).

Trabalhos anteriores apontaram a existência de efeitos de empacotamento na determinação da estrutura de proteínas (Jacobson *et al.*, 2002; Eyal *et al.*, 2005; Rapp e Pollack, 2005). Esta inferência pode ser estendida para a conformação de polissacarídeos, já que a maioria dos contatos cristalográficos são formados por cadeias laterais de aminoácidos polares (Dasgupta *et al.*, 1997), o que aumenta as possibilidades de interações com os oligossacarídeos. É importante observar que a conformação do oligossacarídeo no cristal é mantida por uma série de interações

por ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas, de van der Waals e pontes salinas entre o oligossacarídeo e aminoácidos da AT compondo a unidade cristalina. Tais interações podem ser responsáveis pela distorção da estrutura glicosídica da AT no cristal.

As simulações de DM nos permitiram observar mudanças nas propriedades conformacionais da estrutura de glicosilação da AT: a comparação da conformação da estrutura glicosídica da AT determinada por experimentos de cristalografia de raios-X (Códigos PDB: 1E03, 1E04 e 1E05) e por simulações de DM evidenciaram a existência de distorções na estrutura cristalográfica da AT e demonstraram a contribuição de interações cristalográficas que caracterizam a existência de efeitos de empacotamento, capazes de influenciar a conformação adotada pela estrutura glicosídica da AT no meio cristalográfico. Existe assim, uma influência mútua entre proteína-oligossacarídeo que leva a alteração da flexibilidade e da conformação de cada estrutura.

### **5.3 Simulações por DM na caracterização da estrutura e conformação de carboidratos**

Ao longo dos anos, a MM vem se mostrando como uma importante ferramenta no estudo de macromoléculas e pequenos ligantes, bem como a interação entre os mesmos, principalmente através de simulações por DM. A elucidação da estrutura tridimensional, bem como das propriedades dinâmicas de oligossacarídeos são pré-requisitos para um melhor entendimento das bases moleculares de reconhecimento das proteínas-alvo (Imberty e Pérez, 2000) e do papel dos carboidratos em sistemas biológicos. As técnicas de MM, juntamente com métodos experimentais, auxiliam na determinação das conformações que podem influenciar o comportamento dos carboidratos (Ferro *et al.*, 1995) e as simulações de DM permitem a caracterização dos carboidratos em seu ambiente natural, complementando técnicas experimentais (Verli e Guimarães, 2004).

O uso de simulações por DM é indicado para o estudo de carboidratos em solução (Longhi *et al.*, 2000). Contudo, existe a necessidade do desenvolvimento na parametrização dos campos de força para essa classe de macromoléculas, pois os métodos de DM apresentam uma série de dificuldades para a descrição da estrutura 3D de carboidratos (Ragazzi *et al.*, 1990), embora alguns trabalhos neste sentido tenham sido realizados (Spiwok *et al.*, 2005; Yui e Ogawa, 2005; Tschampel *et al.*,



2006). A presença de grupos polares (grupos N- e O-sulfato), elevada flexibilidade, presença de anéis de 6 membros (adotam grande variedade de conformações) e as diferenças nas propriedades eletrônicas que podem ocorrer durante modificações conformacionais e configuracionais são características que influenciam fortemente a conformação de carboidratos (Longhi *et al.*, 2000) e que dificultam a parametrização dos campos de força para estes compostos (Imberty *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1998; Yui e Ogawa, 2005; Tschampel *et al.*, 2006). Polissacarídeos formam a família mais abundante de biopolímeros e, assim, outro fator que dificulta o estudo de carboidratos por métodos de MM refere-se a sua diversidade estrutural, que varia desde simples homopolímeros lineares a heteropolímeros ramificados, em função da existência de um grande número de monômeros, os quais podem ser ligados entre si através de maneiras diversas (Pérez *et al.*, 1996; Imberty e Pérez, 2000). A simulação da interação de carboidratos com proteínas também apresenta obstáculos como baixa superfície de complementaridade e alta densidade de carga nas áreas de interação (Pérez *et al.*, 1998).

Angulo e colaboradores realizaram a simulação por DM da heparina (Angulo *et al.*, 2003) utilizando o campo de força AMBER (Weiner *et al.*, 1986), com a adição de modificações nos parâmetros desenvolvida para carboidratos, no GLYCAM93 (Woods *et al.*, 1995). Contudo, tal estudo não descreveu o polissacarídeo em termos de sua geometria, isto é, ligação glicosídica ao longo da cadeia polissacarídica (Ernst *et al.*, 1998; Mulloy e Forster, 2000).

Objetivando contornar as dificuldades na simulação de carboidratos e possibilitar a descrição da conformação dos mesmos, nosso grupo já realizou a parametrização de simulações por DM para carboidratos utilizando uma metodologia mais simples (Verli e Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005, Verli e Guimarães 2005). Tais parâmetros incluem a geração de cargas atômicas e definição de ângulos de diedro para manutenção da conformação de anéis de 6 membros, bem como de ângulos de diedro para a descrição das ligações glicosídicas. Esta metodologia permitiu a representação adequada da estrutura da heparina em solução aquosa, no GROMACS (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2004), um campo de força não específico para carboidratos. Este pacote/campo de força é gratuito e veloz, o que é essencial para a redução dos custos computacionais associados principalmente ao tempo da simulação de sistemas moleculares maiores, como os complexos galactana-AT e fucana- AT.

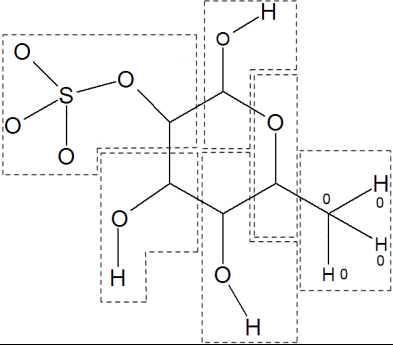
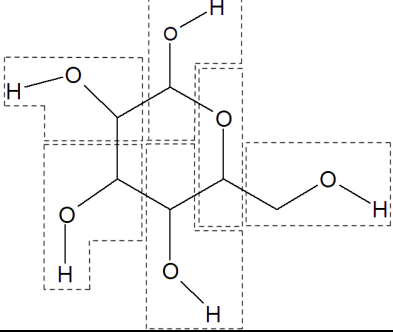
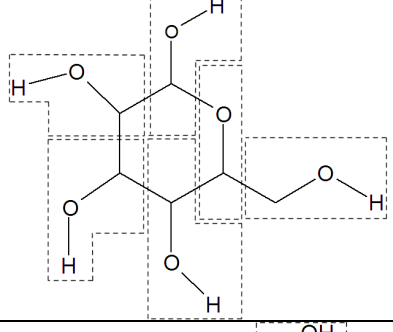
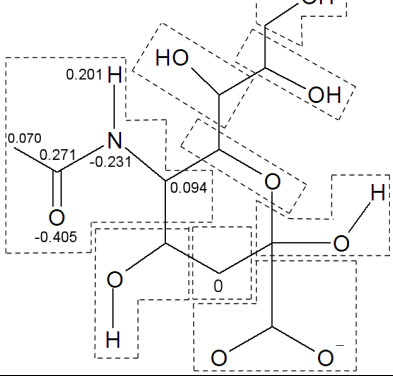
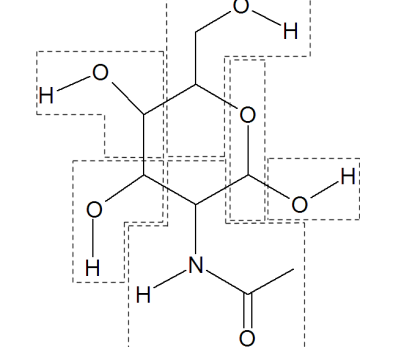
Através destes protocolos foram geradas cargas atômicas através do esquema de cargas de Löwdin, para os resíduos da heparina (IdoA, GlcA e GlcN; Verli e Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005), para os monossacarídeos da galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas, para os resíduos da estrutura de glicosilação da AT (Gal, Man, Sia e GlcNAg) e para os monossacarídeos constituintes do exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Burkholderia tropica* (Rha2Ac, Rha, Glcp; Reis *et al.*, 2004; Serrato *et al.*, 2006). Estes resíduos foram divididos em grupos de cargas, de forma que as cargas atômicas calculadas possam ser aplicadas para diferentes resíduos de carboidratos e campos de força (Tabela 4).

Entender a conformação dos carboidratos e a sua interação em nível molecular com os componentes do sistema fisiológico é essencial para o entendimento dos processos biológicos no quais estas macromoléculas estão envolvidas. Em função das dificuldades em resolver estruturas glicosídicas por métodos de cristalografia de raios-X, bem como por experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN), que sugerem apenas uma conformação que é a média de uma população de conformações, as simulações por dinâmica molecular (DM) são uma ferramenta essencial na determinação das conformações acessíveis de oligossacarídeos. Assim, a bioinformática estrutural e a MM apresentam importante papel em processar a grande quantidade de dados acerca de carboidratos, gerando informações biológicas relevantes e/ou complementares aos dados pré-existentes.

Tabela 4: Representação esquemática das cargas atômicas parciais parametrizadas para os resíduos da heparina (IdoA, GlcA e GlcN), para resíduos da estrutura glicosídica da AT (Man, Gal, Sia e GlcNAg), para resíduos da galactana e fucana (Gal e Fuc 2-sulfato) e para resíduos do EPS (Rha2Ac, Rha, Glcp), no campo de força GROMACS.

Monossacarídeo	Abreviatura	Estrutura e grupos de carga <sup>a</sup>	Referência
Ácido Idurônico 2-sulfatado	IdoA		[1, 2]

Ácido Glicurônico	GlcA		[1, 2]
Glicosamina 2,6-disulfatado	GlcN		[1, 2]
Ligação $\alpha 1 \rightarrow 4$	----		[1, 2]
Galactose 2-sulfato	Gal2S		[3]

Fucose 2-sulfato	Fuc2S		[3]
Manose	Man		[4]
Galactose	Gal		[4]
Ácido Siálico	Sia		[4]
N-acetil-glicosamina	GlcNAg		[4]

Ligação $\alpha 1 \rightarrow 6$	----		[4]
2-O-acetil-ramnose	Rha2Ac		[5]
Ramnose	Rha		[5]
Glicose	Glc <sub>p</sub>		[5]

<sup>a</sup>Os valores das cargas individuais estão apresentados apenas para grupos novos. Grupos repetidos aparecem demarcados, sem os valores de cargas.

[1] Verli e Guimarães, 2004; [2] Becker *et al.*, 2005; [3] Becker *et al.*, 2007a; [4] Becker *et al.*, 2007b; [5] resultados não publicados.

## 6 Conclusões

A partir dos objetivos traçados, o presente trabalho permitiu:

- Construção de mapas de contorno para descrever a conformação das ligações glicosídicas da galactana e da fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas;
- Descrição do comportamento conformacional da galactana e fucana sulfatadas em solução aquosa;
- Proposição, por métodos de *docking* e DM, dos complexos galactana-AT e fucana-AT;
- Análise quantitativa da contribuição de cada resíduo de aminoácido para a formação dos complexos galactana-AT e fucana-AT;
- Através da orientação da galactana e da fucana quando complexadas à AT, foi proposta uma explicação para as diferenças nas suas atividades anticogulantes;
- Construção de mapas de contorno para descrever a conformação das ligações glicosídicas da parte glicosídica da AT;
- Caracterização e refinamento da conformação cristalográfica da parte glicosídica da AT por DM;
- Observação da existência de distorções na estrutura cristalográfica da AT glicosilada, resultantes de efeitos de empacotamento.

Globalmente, os resultados obtidos confirmam o potencial de ferramentas de MM no estudo de sistemas biológicos, particularmente na caracterização molecular das propriedades bioquímicas e farmacológicas de polissacarídeos.

## 7 Perspectivas

Considerando-se os procedimentos de simulação do presente trabalho, assim como as informações obtidas acerca da estrutura glicosídica da AT, as seguintes perspectivas podem ser traçadas:

- Avaliar o efeito da glicosilação na dinâmica da AT e na formação do complexo heparina-AT;
- Caracterização da interação da galactana e fucana 2-sulfatadas, 3-ligadas com a AT glicosilada;
- Caracterização da complexação da galactana 2-sulfatada, 3-ligada e da fucana 2-sulfatada, 3-ligada com o fIIa e fXa;
- Dado o fato de que a estrutura de glicosilação da AT e da trombina são iguais, avaliar o efeito da glicosilação na dinâmica da trombina e na formação de seu complexo com a AT.

## 8 Referências Bibliográficas

### Referências citadas no texto e nos artigos publicados

- Abildgaard, U. Highly purified antithrombin III with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **1968**, 21, 89–90.
- Agno, W.; Turpie, A. G. G. thrombosis prophylaxis with low-molecular-weight heparin in medical patients. Em *New therapeutic agents in thrombosis and thrombolysis*, 2<sup>a</sup> Ed., Sasahara, A. A.; Loscalzo, J. Eds.; Marcel Dekker, Inc., Nova York, **2003**, 117-125.
- Alban, S. From heparins to factor Xa inhibitors and beyond. *Eur. J. Clin. Invest.*, **2005**, 35, 12-20.
- Alves, A. P., Mulloy, B.; Diniz, J. A.; Mourão, P. A. S. Sulfated Polysaccharides from the Egg Jelly Layer Are Species-specific Inducers of Acrosomal Reaction in Sperms of Sea Urchins. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 6965-6971.
- Alves, A. P.; Mulloy, B.; Moy, G. W.; Vacquier, V. D.; Mourão, P. A. S. Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans. *Glycobiology*, **1998**, 8, 939-946.
- Anderson, J. A. M.; Fredenburgh, J. C.; Stafford, A. R.; Guo, Y. S.; Hirsh, J.; Ghazarossian, V.; Weitz, J. I. Hypersulfated low molecular weight heparin with reduced affinity for antithrombin acts as an anticoagulant by inhibiting intrinsic tenase and prothrombinase. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 9755-9761.
- Angulo, J.; Nieto, P. M.; Martin-Lomas, M. A molecular dynamics description of the conformational flexibility of the L-iduronate ring in glycosaminoglycans. *Chem. Comm.*, **2003**, 1512.
- Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1473, 4–8.
- Bauer, K. A.; Petitou, M.; Herbert, J.-M.; van Boeckel, C. A. A.; Meuleman, D. G. Fondaparinux, a synthetic pentasaccharide: the first in a new class of antithrombotic agents – the selective factor Xa inhibitors. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **2002**, 20, 37–52.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Verli, H. Molecular dynamics and atomic charges



- calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2005**, *340*, 1499-1507.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Mourão, P. A. S.; Verli, H. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities. *J. Mol. Graph. Model.*, **2007a**, in press.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Verli, H. Conformational study and molecular dynamics simulations in aqueous solution of the glycan structure of antithrombin. *Carbohydr. Res.*, **2007b**, in preparation.
- Béguin, S.; Lindhout, T.; Hemker; H. C. The mode of action of heparin in plasma. *Thromb. Haemostas.*, **1988**, *60*, 457-462.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R.: Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**, *81*, 3684-3690.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 6269-6271.
- Berendsen. H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS – a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.*, **1995**, *91*, 43-56.
- Berman, H. M.; Westbrook J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235–242.
- Berman, H. M.; Battistuz, T.; Bhat, T. N.; Bluhm, W. F.; Bourne, P. E.; Burkhardt, K.; Feng, Z.; Gilliland, G. L.; Iype, L.; Jain, S.; Fagan, P.; Marvin, J.; Padilla, D.; Ravichandran, V.; Schneider, B.; Thanki, N.; Weissig, H.; Westbrook, J.D.; Zardecki, C. The protein data bank. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **2002**, *58*, 899-907.
- Berteau, O.; Mulloy, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiol.*, **2003**, *13*, 29R-40R.
- Björk, I.; Lindahl, U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Mol. Cell. Biochem.*, **1982**, *48*, 161-182.
- Bohne-Lang, A.; von der Lieth, C. W. GlyProt: in silico glycosylation of proteins. *Nucl. Acids Res.*, **2005**, *33*, W214-W219.  
<http://www.glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php>.

- Boneu, B. Pharmacokinetic studies of standard unfractionated heparin and low molecular weight heparins in the rabbit. *Thromb. Res.*, **2000**, *100*, V113-V120.
- Brinkhous, K. M.; Smith, H. P.; Warner, E. D.; Seegers, W. H. The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. *Am. J. Physiol.*, **1939**, *125*, 683–687.
- Brisson, J. R.; Carver, J. P. Solution conformation of asparagine-linked oligosaccharides - alpha(1-2)-linked, alpha(1-3)-linked, beta(1-2)-linked, and beta(1-4)-linked units. *Biochem.*, **1983**, *22*, 3671-3680.
- Broze, G. J. Jr. Tissue-factor inhibitor is also a factor Xa inhibitor. *Clin. Res.*, **1987**, *35*, 597.
- Broze, G. J. Jr.; Warren, L. A.; Novotny, W. F.; Higuchi, D. A.; Girard, J. J.; Miletich, J. P. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood*, **1988**, *71*, 335-343.
- Broze, G. J. Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.*, **1995**, *74*, 90-93.
- Caffarena, E. R.; Lorenzo, A. C. Conformational and dynamical properties of the *niruriside* in aqueous solution: a molecular dynamics approach. *J. Mol. Struc. (THEOCHEM)*, **2005**, *714*, 189–197.
- Cappello, M.; Vlasuk, G. P.; Bergum, P.W.; Huang, S; Hotez, P. J. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: a hookwormderived inhibitor of human coagulation factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 6152-6156.
- Carrel, R. W.; Stein, P. E.; Fermi, G.; Wardell, M. R. Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin. *Structure*, **1994**, *2*, 257-270.
- Casu, B.; Gennaro, U. A conductimetric method for the determination of sulphate and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides. *Carbohydr. Res.*, **1975**, *39*, 168-176.
- Casu, B.; Choay, J.; Ferro, D. R.; Gatti, G.; Jacquinet, J. C.; Petitou, M., Provasoli, A.; Ragazzi, M.; Sinay, P.; Torri, G. Controversial glycosaminoglycan conformations. *Nature*, **1986**, *322*, 215-216.
- Cheng, J. W. M. Fondaparinux: a new antithrombotic agent. *Clin. Ther.*, **2002**, *24*, 1757-1769.

- Choay, J.; Petitou, M.; Lormeau, J. C.; Sinay, P.; Casu, B.; Gatti, G. Structure-activity relationship in heparin: A synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, *116*, 492-499.
- Clare, B.; Supuran, C. T. Semi-empirical atomic charges and dipole moments in hypervalent sulfonamide molecules: descriptors in QSAR studies. *Theochem.*, **1998**, *428*, 109-121.
- Cohen, N. C.; Blaney, J. M.; Humblet, C.; Gund, P.; Barry, D. C. Molecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry? *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 883-894.
- Colman, R. W.; Clowes, A. W.; George, J. N.; Goldhaber, S. Z.; Marder, V. J. *Em Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*; Colman, R. W.; Clowes, A. W.; Goldhaber, S. Z.; Marder, V. J.; George, J. N., eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2006, pp.3-16.
- Cremer, D.; Szabo, K. J. Ab Initio Studies of Six-Membered Rings: Present Status and Future Developments. In *Conformational Behavior of Six-Membered Rings: Analysis, Dynamics, and Stereoelectronic Effects*, Juaristi, E., Ed.; VCH Publishers Inc., New York, **1995**, pp 71-77.
- Dahlbäck, B. Blood coagulation. *Lancet*, **2000**, *355*, 1627-1632.
- Danielson, A.; Raub, E.; Lindahl, U.; Björk, I. Role of ternary complexes, in which heparin binds both antithrombin and proteinase, in the acceleration of the reactions between antithrombin and thrombin or factor Xa. *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 15467-15473.
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald – an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 10089-10092.
- Dasgupta, S.; Iyer, G. H.; Bryant, S. H.; Lawrence, C. E.; Bell, J. A. Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **1997**, *28*, 494–514.
- Davies, A.; Lachmann, P. L. Membrane defence against complement lysis: the structure and biological properties of CD59. *Immunol. Res.*, **1993**, *12*, 258-275.
- de Groot, B. L.; Grubmüller, H. Water permeation across biological membranes:

- mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **2001**, *294*, 2353-2357.
- Deitelzweig, S.; Jaff, M. R. Medical management of venous thromboembolic disease. *Tech. Vasc. Interv. Radiol.*, **2004**, *7*, 63-67.
- Demelbauer, U. M.; Plematl, A.; Kremser, L.; Allmaier, G.; Josic, D.; Rizzi, A. Characterization of glyco isoforms in plasma-derived human antithrombin by on-line capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-quadrupole ion trap-mass spectrometry of the intact glycoproteins. *Electrophoresis*, **2004**, *25*, 2026-2032.
- Demelbauer, U. M.; Plematl, A.; Josic, D.; Allmaier, G.; Rizzi, A. On the variation of glycosylation in human plasma derived antithrombin. *J. Chromat. A.*, **2005**, *1080*, 15–21.
- Dementiev, A.; Petitou, M.; Herbert, J. M.; Gettins, P. G. W. The ternary complex of antithrombin–anhydrothrombin–heparin reveals the basis of inhibitor specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 863-867.
- Desai, U. R.; Petitou, M.; Björk, I.; Olson, S. T. Mechanism of Heparin activation of antithrombin: Role of individual residues of the pentasaccharide sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7478-7487.
- Desai, U.; Swanson, R.; Bock, S. C.; Björk, I.; Olson, S. T. Role of arginine 129 in heparin binding and activation of antithrombin. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 18976-18984.
- Dietrich, C. P.; Silva, M. E.; Michelacci, Y. M. Sequential degradation of heparin in *Flavobacterium heparinum*. Purification and properties of five enzymes involved in heparin degradation. *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 6408-6846.
- DiMasi, J. A. Risks in new drug development: Approval success rates for investigational drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2001**, *69*, 297-307.
- Djuranovic, D.; Hartmann, B. Molecular Dynamics Studies on Free and Bound Targets of the Bovine Papillomavirus Type I E2 Protein: The Protein Binding Effect on DNA and the Recognition Mechanism. *Biophys. J.*, **2005**, *89*, 2542–2551.
- Drozd, N. N.; Makarov, V. A.; Galbraikh, L. S. Vikhoreva, G. A.; Gorbachiova, I. N. Comparison of antithrombin activity of the sulfate chitosan derivatives in *in*

- vivo* and *in vitro* system. *Thromb. Res.*, **2001**, *102*, 445-455.
- Dyke, C. K.; Becker, R. C.; Kleiman N. S.; Hochman, J. S.; Bovill, E. G.; Lincoff, A. M.; Gerstenblith, G.; Dzavik, V.; Gardner, L. H.; Hasselblad, V.; Zillman, L. A.; Shimoto, Y.; Robertson, T. L.; Kunitada, S.; Armstrong, P. W.; Harrington, R. A. First experience with direct factor Xa inhibition in patients with stable coronary disease: a pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Circulation*, **2002**, *105*, 2385-2391.
- Eaton, D.; Rodriguez, H.; Vehar, G. A. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulation activity. *Biochem.*, **1986**, *25*, 505-512.
- Ernst, S.; Venkataraman, G.; Sasisekharan, V.; Langer, R.; Cooney, C. L.; Sasisekharan, R. Pyranose ring flexibility. Mapping of physical data for iduronate in continuous conformational space. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2099-2107.
- Esmon, C. T. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 4743-4746.
- Esmon, C. T.; Ding W.; Yasuhiro K.; Gu, J. M.; Ferrell, G.; Regan, L. M.; StearnsKurosawa, D. J.; Kurosawa, S.; Mather, T.; Laszik, Z.; Esmon, N. L. The protein C pathway: new insights. *Thromb. Haemost.*, **1997**, *78*, 70-74.
- Eyal, E.; Gerzon, S.; Potapov, V.; Edelman, M.; Sobolev, V. The limit of accuracy of protein modeling: Influence of crystal packing on protein structure. *J. Mol. Biol.*, **2005**, *351*, 431-442.
- Faber-Barata, J.; Mohana-Borges, R.; Mauricio, L.; Lima, T. R. Specificity in DNA recognition by a peptide from papillomavirus E2 protein. *Febs. Letters.*, **2006**, *580*, 1919-1924.
- Fareed, J. W.; Hoppensteadt, D.; Bick, R. L. An update of heparins at the beginning of the new millenium. *Sem. Thromb. Hemost.*, **2000**, *26*, 5-21.
- Farias, W. R. L.; Valente, A. P.; Pereira, M. S.; Mourão, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 29299-29307.

- Feizi, T.; Mulloy, B. Carbohydrates and glycoconjugates: never a dull moment in glycoscience. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2003**, *13*, 602–604.
- Ferro, D. R.; Provasoli, A.; Ragazzi, M.; Casu, B.; Torri, G.; Bossennec, V.; Perly, B.; Sinay, P.; Petitou, M.; Choay, J. Conformer populations of L-iduronic acid residues in glycosaminoglycan sequences. *Carbohydr. Res.*, **1990**, *195*, 157-167.
- Ferro, D. R.; Gajdos, J.; Ragazzi, M.; Ungarelli, F.; Piani, S. Conformational analysis of heparin epoxide: molecular mechanics computations. *Carbohydr. Res.*, **1995**, *277*, 25-38.
- Franzén, L.-E.; Svensson, S.; Larm, O. Structural studies on the carbohydrate portion of human anti-thrombin-III. *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 5090–5093.
- Furie, B.; Furie, B. C. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N. Engl. J. Med.*, **1992**, *326*, 800-806.
- Gahmberg, C. G.; Tolvanen, M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.*, **1996**, *21*, 308-311.
- Garone, L.; Edmunds, T.; Hanson, E.; Bernasconi, R.; Huntington, J. A.; Meagher, J. L.; Fan, B.; Gettins, P. G. W. Antithrombin-Heparin Affinity Reduced by Fucosylation of Carbohydrate at Asparagine 155. *Biochem.*, **1996**, *35*, 8881-8889.
- Gatti, G.; Casu, B.; Hamer, G. K.; Perlin, A. S. Studies on the conformation of heparin by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Macromolecules*, **1979**, *12*, 1001-1007.
- Geerts, W. H.; Heit, J. A.; Clagett, G. P.; Pineo, G. F.; Colwell, C. W.; Anderson Jr, F. A.; Wheeler, H. B. Prevention of venous thromboembolism. *Chest*, **2001**, *119*, 132S-175S.
- Gettins, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4751-4803.
- Grootenhuys, P. D. J.; Westerduin, P.; Meuleman, D.; Petitou, M.; van Boeckel, C. A. Rational design of synthetic heparin analogues with tailor-made coagulation inhibitory activity. *Nat. Struct. Biol.*, **1995**, *2*, 736–739.
- Guex, N.; Peitsch, M. C. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723. <http://www.expasy.org/spdbv>.

- Guillon, J.; Grellier, P.; Labaied, M.; Sonnet, P.; Léger, J.-M.; Déprez-Poulain, R.; Forfar-Bares, I.; Dallemagne, P.; Lemaître, N.; Pe´hourcq, F.; Rochette, J.; Sergheraert, C.; Jarry, C. Synthesis, Antimalarial Activity, and Molecular Modeling of New Pyrrolo [1,2-*a*] quinoxalines, Bispyrrolo [1,2-*a*] quinoxalines, Bispyrido [3,2-*e*] pyrrolo [1,2-*a*] pyrazines, and Bispyrrolo [1,2-*a*] thieno [3,2-*e*] pyrazines. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1997-2009.
- Guinto, E. R.; Esmon, C. T. Loss of prothrombin and of factor Xa-factor Va interactions upon inactivation of factor Va by activated protein C. *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 13986-13992.
- Gustafsson, D.; Nystrom, J. E.; Carlsson, S.; Bredberg, U.; Eriksson, U.; Gyzander, E.; Elg, M.; Antonsson, T.; Hoffmann, K.-J.; Ungell, A.-L.; Sörensen, H.; Någård, S.; Abrahamsson, A.; Bylund, R. The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res.*, **2001**, *101*, 171-181.
- Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I: An empirical generalization of the karplus equation. *Tetrahedron*, **1980**, *36*, 2783-2792.
- Harrison, L.; McGinnis, J.; Crowther, M.; Ginsberg, J.; Hirsh, J. Assessment of outpatient treatment of deep-vein thrombosis with low-molecular-weight heparin. *Arch. Intern. Med.*, **1998**, *158*, 2001-2003.
- Hashimoto, Y.; Toma, K.; Nishikido, J.; Yamamoto, K.; Haneda, K.; Inazu, T.; Valentin, K.; Opella, S. J. Effects of Glycosylation on the Structure and Dynamics of Eel Calcitonin in Micelles and Lipid Bilayers Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochem.*, **1999**, *38*, 8377-8384.
- Heit, J. A.; Silverstein, M. D.; Mohr, D. N.; Petterson, T. M.; O'Fallon, W. M.; Melton III, L. J. Predictors of Survival After Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: A Population-Based, Cohort Study. *Arch. Intern. Med.*, **1999**, *159*, 445-453.
- Helenius, A.; Trombetta, E. S.; Hebert, D. N.; Simons, J. F. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell. Biol.*, **1997**, *7*, 193-200.

- Helenius, A.; Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **2001**, *291*, 2364-2369.
- Herbert, J. M.; Bernat, A.; Dol, F.; Herault, J. P.; Crepon, B.; Lormeau, J. C. DX-9065a, a novel synthetic, selective and orally active inhibitor of factor Xa: in vitro and in vivo studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1996**, *276*, 1030–1038.
- Herbert, J. M.; Héraul, J. P.; Bernat, A.; Savi, P.; Schaeffer, P.; Driguez, P. A.; Duchaussoy, Ph.; Petitou, M. SR123781A, a synthetic heparin mimetic. *Thromb. Haemost.*, **2001**, *85*, 852–860.
- Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*, 1463-1472.
- Hirohashi, N.; Vilela-Silva, A. C. E. S., Mourão, P. A. S.; Vacquier, V. D. Structural requirements for species-specific induction of the sperm acrosome reaction by sea urchin egg sulfated fucan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, *298*, 403-407.
- Hirsh, J.; Warkentin, T. E.; Raschke, R.; Granger, C.; Ohman, E. M.; Dalen, J. E. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest*, **1998**, *114*, 489S-510S.
- Hirsh, J. Current anticoagulant therapy - unmet clinical needs. *Thromb. Res.*, **2003**, *109*, S1-S8.
- Hirsh, J.; O'Donnell M.; Weitz J. I. New anticoagulants. *Blood*, **2005**, *105*, 453-463.
- Horita, D. A.; Hajduk, P. J.; Lerner, L. E. EGC1 Solution dynamics of the 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranose ring. *Glycoconj. J.*, **1997**, *14*, 691-696.
- Hricovini, M.; Guerrini, M.; Bisio, A.; Torri, G.; Petitou, M.; Casu, B. Conformation of heparin pentasaccharide bound to antithrombin III. *Biochem. J.*, **2001**, *359*, 265-272.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, **1996**, *14*, 33-38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
- Huntington, J. A.; Olson, S. T.; Fan, B.; Gettins, P. G. W. Mechanism of heparin activation of antithrombin. Evidence for reactive center loop preinsertion with expulsion upon heparin binding. *Biochem.*, **1996**, *35*, 8495-8503.
- Hursting, M. J.; Alford, K.L.; Becker, J. C.; Brooks, R. L.; Joffrion, J. L.;



- Knappenberger, G. D.; Kogan, P. W.; Kogan, T. P.; McKinney, A. A.; Schwars, R. P. Novastan (brand of argatroban): a small-molecule, direct thrombin inhibitor. *Semin. Thromb. Haemost.*, **1997**, *23*, 503-516.
- Imberty, A. Oligosaccharide structure: theory versus experiment. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **1997**, *7*, 617-623.
- Imberty, A.; Pérez, S. Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations. *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4567–4588.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), Conformational nomenclature for five- and six-membered ring forms of monosaccharides and their derivatives (Recommendations 1980). *Eur. J. Biochem.*, **1980**, *111*, 295-298.  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/psac.html>
- Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Xiang, Z.; Honig, B. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *320*, 597–608.
- Jaques, L. B.: Heparins - anionic polyelectrolyte drugs. *Pharmacol. Rev.*, **1979**, *31*, 99-166.
- Jay, R. M.; Geerts, W. H. Low-molecular-weight heparins in prevention of venous thromboembolism. Em *New therapeutic agents in thrombosis and thrombolysis*, 2<sup>a</sup> Ed., Sasahara, A. A.; Loscalzo, J. Eds.; Marcel Dekker, Inc., Nova York, **2003**, 127-153.
- Jeffrey, G. A. J. Modeling OH..O hydrogen-bonds in carbohydrates. *Mol. Struct.*, **1990**, *237*, 75-79.
- Jenny, N. S.; Mann, K. G. Em *Thrombosis and Hemorrhage*; Loscalzo, J.; Schafer, A. I., eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, **1998**, cap.1.
- Jeske, W.; Messmore Jr., H. L.; Farred, J. Em *Thrombosis and Hemorrhage*; Loscalzo, J.; Schafer, A. I., eds.; Williams and Wilkins: Baltimore, 1998, cap. 55.
- Jin, L.; Abrahams, J. P.; Skinner, R.; Petitou, M.; Pike, R. N.; Carrel, R. W. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 14683-14 688.
- Jordan, R. E.; Favreau, L. V.; Braswell, E. H.; Rosenberg, R. D. Heparin with two

- binding sites for antithrombin or platelet factor 4. *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 400-406.
- Kaitin, K. I.; DiMasi, J. A. Measuring the pace of new drug development in the user fee era. *Drug. Inf. J.*, **2000**, *34*, 673-680.
- Kaitin, K. I.; Healy, E. M. The new drug approvals of 1996, 1997, and 1998: drug development trends in the user fee era. *Drug. Inf. J.*, **2000**, *34*, 1-14.
- Kalafatis, M.; Swords, N. A.; Rand, M. D.; Mann, K. G. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochem. Biophys. Acta*, **1994**, *1227*, 113-129.
- Karplus, M. Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2870-2871.
- Karplus, M.; Petsko, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, **1990**, *347*, 631-639.
- Killing, H. Zur biochemie der Meersalgen. *Z. Physiol. Chem.*, **1913**, *83*, 171-197.
- Kirschner, K. N.; Woods, R. J. Solvent interactions determine carbohydrate conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, *98*, 10541-10545.
- Kitchen, D. B.; Decorne, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Docking* and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Rev. Drug. Discov.*, **2004**, *3*, 935-949.
- Kort, M.; Buijsman, R. C.; van Boeckel, C. A. A. Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs. *Drug Discov. Today*, **2005**, *10*, 769-779.
- Kubitza, D.; Becka, M.; Wensing, G.; Voith, B.; Zuehlsdorf, N. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-792 – an oral, direct factor Xa inhibitor – after multiple doses in healthy male subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **2005**, *61*, 873–880.
- Lane, D. A.; Pejler, G.; Flynn, A. M.; Thompson, E. A.; Lindahl, U. Neutralization of heparin-related saccharides by histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4. *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 3980-3986.
- Lassen, M. R.; Davidson, B. L.; Gallus, A.; Pineo, G.; Ansell, J.; Deitchman, D. A phase II randomized, double-blind, five-arm, parallel-group, dose-response study of a new oral directly-acting factor Xa inhibitor, Razaxaban, for the prevention of deep vein thrombosis in knee replacement surgery. *Blood*, **2003**, *102*, 15a (abstract 41).

- Leach, A. R.: *Molecular Modelling Principles and Applications*, 2<sup>nd</sup> Ed., **2001**, Longman, Cingapura.
- Lee, A. Y.; Vlasuk, G. P. Recombinant nematode anticoagulant protein c2 and other inhibitors targeting blood coagulation factor VIIa/tissue factor. *J. Intern. Med.*, **2003**, *254*, 313-321.
- Levine, M.; Gent, M.; Hirsh, J., Jacques Leclerc, J.; Anderson, D.; Weitz, J.; Ginsberg, J.; Turpie, A. G.; Demers, C.; Kovacs, M.; Geerts, W.; Kassis, J.; Desjardins, L.; Cusson, J.; Cruickshank, M.; Powers, P.; Brien, W.; Haley, S.; Willan, A. A comparison of low-molecular-weight heparin administered primarily at home with unfractionated heparin administered in the hospital for proximal deep-vein thrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **1996**, *334*, 677–681.
- Lin, P. H.; Sinha, U.; Betz, A. Antithrombin binding of low molecular weight heparins and inhibition of factor Xa. *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, *1526*, 105-113.
- Lindahl, U.; Axelsson, O. Identification of Iduronic Acid as the Major Sulfated Uranic Acid of Heparin. *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 74-82.
- Lindahl, U.; Backström, G.; Thunberg, L. The antithrombin-binding sequence in heparin. Identification of an essential 6-O-sulfate group. *J. Biol. Chem.*, **1983**, *258*, 9826-9830.
- Liu, L.; Dewar, L.; Song, Y.; Kulczycky, M.; Blajchman, M. A.; Fenton, J. W.; Andrew, M.; Delorme, M.; Ginsberg, J.; Preissner, K. T.; Oforu, F. A. Inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II in vivo. *Thromb. Haemost.*, **1995**, *73*, 405-412.
- Longhi, G.; Malandrino, M.; Abbate, S. Investigations on the mobility of the glycosidic linkage in sucrose by study of the phase space structure of a two-degrees of freedom model. *J. Mol. Graph. Model.*, **2000**, *18*, 153-162.
- Loscalzo, J. e Schafer, A. I. Em *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*; Sasahara, A. A.; Loscalzo, J., eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2003, cap. 1.
- Lütteke, T.; Frank, M.; von der Lieth, C.-W. Data mining the protein data bank: automatic detection and assignment of carbohydrate structures. *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339*, 1015–1020.
- Maraganore, J. M.; Bourdon, P.; Jablonski, J., Ramachandran, K. L.; Fenton, J. W.

- Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochem.*, **1990**, *29*, 7095-7101.
- Marchal, I.; Glier, G.; Dugas, O.; Majed, M. Bioinformatics in glycobiology. *Biochimie*, **2003**, *85*, 75-81.
- Marfo-Owusu, E; Kato, T. Crystal packing and hydrogen-bonding studies: The crystal and molecular structures of the nonhydrate and hydrate forms of 2,6-di(propanoylamino)pyridine. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **2006**, *452*, 37-48.
- McCoy, A. J.; Pei, X. Y.; Skinner, R.; Abrahams, J. P.; Carrell, R. W. Structure of  $\beta$ -Antithrombin and the Effect of Glycosylation on Antithrombin's Heparin Affinity and Activity. *J. Mol. Biol.*, **2003**, *326*, 823-833.
- McLean, J. The thromboplastic action of cephalin. *Am. J. Physiol.*, **1916**, *41*, 250-257.
- Medeiros, G. F.; Mendes, A.; Castro, R. A. B.; Baú, E. C.; Nader, H. B.; Dietrich, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1475*, 287-294.
- Melo, F. R.; Pereira, M. S.; Foguel, D.; Mourão, P. A. S. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 20824-20835.
- Mikhailov, D.; Mayo, K. H.; Vlahov, I. R.; Toida, T.; Pervin, A.; Linhardt, R. J. NMR solution conformation of heparin-derived tetrasaccharide. *Biochem. J.*, **1996**, *318*, 93-102.
- Mikhailov, D.; Linhardt, R. J.; Mayo, K. H. NMR solution conformation of heparin-derived hexasaccharide. *Biochem. J.*, **1997**, *328*, 51-61.
- Millane, R. P. Polysaccharide structures: X-ray fiber diffraction studies. Em *Computer Modeling of Carbohydrate Molecules*, French, A. D.; Brady, J. W. Eds.; ACS Symposium Series 430, American Chemical Society, Washington D. C., **1990**, 315-331.
- Miyamoto, S.; Kollman, P. A.: SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, **1992**, *13*, 952-962.
- Mizuochi, T.; Fujii, J.; Kurachi, K.; Kobata, A. Structural studies of the carbohydrate moiety of human anti-thrombin-III. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1980**, *203*, 458-

465.

- Moll, S.; Lindley, C.; Pescatore S.; Morrison, D.; Tsuruta, K.; Mohri, M.; Serada, A.; Sata, M.; Shimizu, H.; Yamada, K.; White, G. C. Phase 1 study of a novel recombinant human soluble thrombomodulin ART-123. *J. Thromb. Haemost.*, **2004**, *2*, 1745-1751.
- Monkhouse, F. C.; France, E. S.; Seegers, W. H. Studies on the antithrombin and heparin cofactor activities of a fraction absorbed from plasma by aluminium hydroxide. *Circ. Res.*, **1955**, *3*, 397-402.
- Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated *docking* using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, **1998**, *19*, 1639-1662.
- Mourão, P. A. S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: Future perspectives. *Curr. Pharm. Des.*, **2004**, *10*, 967-981.
- Mrksich, M. An early taste of functional glycomics. *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 739-740.
- Mulloy, B.; Ribeiro, A.-C.; Alves, A.-P.; Vieira, R. P.; Mourão, P. A. S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the o-2 and o-4 positions. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 22113-22123.
- Mulloy, B.; Forster, M. J. Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiol.*, **2000**, *10*, 1147-1156.
- Mulloy, B. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **2005**, *77*, 651-664.
- Murayama, N.; Tanaka, M.; Kunitada, S.; Yumada, H.; Inoue, T.; Terada, Y.; Fujita, M.; Ikeda, Y. Tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of DX-9065a, a new synthetic potent anticoagulant and specific factor Xa inhibitor, in healthy male volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1999**, *66*, 258-264.
- Nader, H. B.; Pinhal, M. A. S.; Baú, E. C.; Castro, R. A. B.; Medeiros, G. F.; Chavante, S. F.; Leite, E. L.; Trindade, E. S.; Shinjo, S. K.; Rocha, H. A. O.; Tersariol, I. L. S.; Mendes, A.; Dietrich, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2001**, *34*, 699-709.
- Nakagaki, T.; Foster, D. C.; Berkner, K. L. e Kisiel, W. Initiation of the extrinsic

- pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochem.*, **1991**, *30*, 10819-10824.
- O'Brien B.; Levine, M.; Willan, A.; Goeree, R.; Haley, S.; Blackhouse, G.; Gent, M. Economic evaluation of outpatient treatment with low-molecular weight heparin for proximal vein thrombosis. *Arch. Intern. Med.*, **1999**, *159*, 2298–2304.
- Olson, S. T.; Bjork, I.; Sheffer, R.; Craig, P. A.; Shore, J. D.; Choay, J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions: resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 12528-12538.
- Olson, S. T.; Björk, I. Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. *Semin. Thromb. Hemostasis*, **1994**, *20*, 373-409.
- Olson, S. T.; Bjork, I.; Shore, J. D.: Kinetic characterization of heparin-catalyzed and uncatalyzed inhibition of blood coagulation proteinases by antithrombin. *Methods Enzymol.*, **1997**, *222*, 525-559.
- Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar A. D.; Madsen, S. K. The structure of malaria pigment b-haematin. *Nature*, **2000**, *404*, 307-310.
- Parkinson, J. F.; Grinnell, B. W.; Moore, R. E.; Hoskins, J.; Vlahos, C. J.; Bang, N. U. Stable expression of a secretable deletion mutation of recombinant human thrombomodulin in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 12602–12610.
- Patankar, M. S.; Oehninger, S.; Barnett, T.; Williams, R. L.; Clark, G. F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological-activities. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 21770–21776.
- Pengo, V.; Pegoraro, C.; Iliceto, S. New trends in anticoagulant therapy. *Isr. Med. Assoc. J.*, **2004**, *6*, 479-481.
- Pereira, M. S.; Mulloy, B.; Mourão, P. A. S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 7656-7667.
- Pereira, M. S.; Vilela-Silva, E. S. A. C.; Valente, A. P. V.; Mourão, P. A. S. A 2-

- sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. *Carbohydr. Res.*, **2002a**, 337, 2231-2238.
- Pereira, M. S.; Melo, F. R.; Mourão, P. A. S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiol.*, **2002b**, 12, 573-580.
- Pérez, S.; Imberty, A.; Engelsen, S. B.; Gruza, J.; Mazeau, K.; Jimenez-Barbero, J.; Poveda, A.; Espinosa, J.-F.; van Eyck, B. P.; Johnson, G.; French, A. D.; Kouwijzer, M. L. C. E.; Grootenuis, P. D. J.; Bernardi, A.; Raimondi, L.; Senderowitz, H.; Durier, V.; Vergoten, G.; Rasmussen, K. A comparison and chemometric analysis of several molecular mechanics force fields and parameter sets applied to carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, **1998**, 314, 141–155.
- Pérez, S.; Mulloy, B. Prospects for glycoinformatics. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2005**, 15, 517-524.
- Pérez, S.; Kouwijzer, M.; Mazeau, K.; Engelsen, S. B. Modeling polysaccharides: Present status and challenges. *J. Mol. Graph.*, **1996**, 14, 307-321.
- Petitou, M.; Héroult, J. P.; Bernat, A.; Driguez, P. A.; Duchaussoy, P.; Lormeau, J. C.; Hernert, J. M. Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects. *Nature*, **1999**, 398, 417-422.
- Petitou, M.; Casu, B.; Lindahl, U. 1976–1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochimie*, **2003**, 85, 83–89.
- Picard, V.; Ersdal-Badju, E.; Bock, S. C. Partial glycosylation of antithrombin-III asparagine-135 is caused by the serine in the 3rd position of its n-glycosylation consensus sequence and is responsible for production of the beta-antithrombin-III isoform with enhanced heparin affinity. *Biochem.*, **1995**, 34, 8433-8440.
- Plematl, A.; Demelbauer, U. M.; Josic, D.; Rizzi, A. Determination of the site-specific and isoform-specific glycosylation in human plasma-derived antithrombin by IEF and capillary HPLC-ESI-MS/MS. *Proteomics*, **2005**, 5, 4025-4033.
- Pol-Fachin, L.; Verli, H. Heparin glycosidic linkage: relations to the polysaccharide geometry, flexibility, and induced fit activation of antithrombin. *Carbohydr.*

Res., **2007**, em preparação.

- Pomin, V. H.; Valente, A. P.; Pereira, M. S.; Mourão, P. A. S. Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: a selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides. *Glycobiology*, **2005**, *15*, 1376-1385.
- Ponder, J. W.; Case, D. A. Force fields for protein simulations. Em *Advances in protein chemistry, volume 66: protein simulations*. Richards, F. M.; Eisenberg, D. S.; Kuriyan, J. Eds., Elsevier Academic Press, San Diego, **2003**, pp 27-85.
- Potempa, J.; Korzus, E.; Travis, J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 15957-15960.
- Qasba, P. K.; Balaji, P. V.; Rao, V. S. R. Conformational analysis of Asn-linked oligosaccharides: Implications in biological processes. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1997**, *395-396*, 333-360.
- Ragazzi, M.; Ferro, D. R., Perly, B.; Petitou, M.; Choay, J. Conformation of the pentasaccharide corresponding to the binding site of heparin for antithrombin III. *Carbohydr. Res.*, **1990**, *195*, 169-185.
- Rapp, C. S.; Pollack, R. M. Crystal packing effects on protein loops. *Proteins: Struct. Func. Bioinf.*, **2005**, *60*, 103-109.
- Rees, D. A.; Morris, E. R.; Stoddart, J. F.; Stevens, E. S. Controversial glycosaminoglycan conformations. *Nature*, **1985**, *317*, 480-480.
- Reis, V. M.; Estrada-de los Santos, P.; Tenorio-Salgado, S.; Vogel, J.; Stoffels, M.; Guyon, S.; Mavingui, P.; Baldani, V. L. D.; Schmid, M.; Baldani, J. I.; Balandreau, J.; Hartmann, A.; Caballero-Mellado, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2004**, *54*, 2155–2162.
- Rezaie, A. R. Prothrombin protects factor Xa in the prothrombinase complex from inhibition by the heparin-antithrombin complex. *Blood*, **2001**, *97*, 2308-2313.
- Rigby, A. C.; Lucas-Meunier, E.; Kalume, D. E.; Czerwiec, E.; Hambe, B.; Dahlqvist, I.; Fossier, P.; Baux, G.; Roepstorff, P.; Baleja, J. D.; Furie, B. C.; Furie, B.; Stenflo, J. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 5758-5763.



- Rocha, H. A. O.; Moraes, F. A.; Trindade, E. S.; Franco, C. R. C.; Torquato, R. J. S.; Veiga, S. S.; Valente, A. P.; Mourão, P. A. S.; Leite, E. L.; Nader, H. B.; Dietrich, C. P. Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 41278–41288.
- Sant'Anna, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 505-512.
- Schaftenaar, G. MOLDEN. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, **1997**.
- Schedin-Weiss, S.; Desai, U. R.; Bock, S. C.; Gettins, P. G. W.; Olson, S. T.; Björk, I. Importance of lysine 125 for heparin binding and activation of antithrombin. *Biochem.*, **2002**, *41*, 4779-4788.
- Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comp. Chem.*, **1993**, *14*, 1347-1363.
- Serrato, R. V.; Sasaki, G. L.; Cruz, L. M.; Pedrosa, F. O.; Gorin, P. A.; Iacomini, M. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Can. J. Microbiol.*, **2006**, *52*, 489-493.
- Silva, M. E.; Dietrich, C. P. Structure of heparin: characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 6841-6846.
- Skrzypczak-Jankun, E.; Carperos, V. E.; Ravichandran, K. G.; Tulinsky, A.; Westbrook, M.; Maraganore, J. M.; Structure of the hirugen and hirulog 1 complexes of alpha-thrombin. *J. Mol. Biol.*, **1991**, *221*, 1379-1393.
- Smithrud, D. B.; Wyman, T. B.; Diederich, F. Enthalpically driven cyclophane-arene inclusion complexation: solvent-dependent calorimetric studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 5420-5426.
- Sorin, E. J.; Pande, V. S. Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations. *Biophys. J.*, **2005**, *88*, 2472-2493. <http://folding.stanford.edu/ffamber/>.
- Spiwok, V.; Lipovova, P.; Skalova, T.; Vondráčková, E.; Dohnálek, J.; Hašek,

- J.; Králová, B. Modelling of carbohydrate-aromatic interactions: *ab initio* energetics and force field performance. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2005**, *19*, 887-901.
- Sticht, H.; Pickford, A. R.; Potts, J. R.; Campbell, I. D. Solution structure of the glycosylated second type 2 module of fibronectin. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *276*, 177-187.
- Streusand, V. J.; Björk, I.; Gettins, P. G. W.; Petitou, M.; Olson, S. T. Mechanism of Acceleration of Antithrombin-Proteinase Reactions by Low Affinity Heparin. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 9043-9051.
- Szyperski, T.; Guntert, P.; Stone, S. R.; Wuthrich, K. Nuclear magnetic resonance solution structure of hirudin(1-51) and comparison with corresponding three-dimensional structures determined using the complete 65-residue hirudin polypeptide chain. *J. Mol. Biol.*, **1992**, *228*, 1193-1205.
- Taylor, F. B. Jr. Role of tissue factor and factor VIIa in the coagulant and inflammatory response to LD100 *Escherichia coli* in the baboon. *Haemostasis*, **1996**, *26*, 83-91.
- Thomsen, R. Flexible ligand *docking* using evolutionary algorithms: investigation of the effects of the variation operators and local search hybrids. *BioSystems*, **2003**, *72*, 57-73.
- Thunberg, L.; Bäckström, G.; Lindahl U. Further characterization of antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydr. Res.*, **1982**, *100*, 393-410.
- Tschampel, S. M.; Kirschner, K. N.; Woods, R. J. Incorporation of carbohydrates into macromolecular force fields: Development and validation. *ACS Symposium Series*, **2006**, *930*, 235-257
- Turk, B.; Brieditis, I.; Bock, S. C.; Olson, S. T.; Björk, I. The Oligosaccharide Side Chain on Asn-135 of  $\alpha$ -Antithrombin, Absent in  $\beta$ -Antithrombin, Decreases the Heparin Affinity of the Inhibitor by Affecting the Heparin-Induced Conformational Change. *Biochem.*, **1997**, *36*, 6682-6691.
- Tvaroska, I.; Carver, J. P. Ab initio molecular orbital calculation of carbohydrate model compounds .4. Flexibility of Psi-type glycosidic bonds in carbohydrates. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1997**, *395-396*, 1-13.
- Uedaira, H.; Okouchi, S.; Tsuda, S.; Uedaira, H. Hydration of Glucose and Galactose Derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2001**, *74*, 1857-1861.

- van Aalten, D. M. F.; Bywater, B.; Findlay, J. B. C.; Hendlich, M.; Hooft, R. W. W.; Vriend, G. PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, **1996**, *10*, 255-262. <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>.
- van Boeckel, C. A. A.; Petitou, M. The unique antithrombin III binding domain of heparin: a lead to new synthetic antithrombotics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, *32*, 1671-1818.
- van Boeckel, C. A. A.; Grootenhuis, P. D. J.; Visser, A.: A mechanism for heparin-induced potentiation of antithrombin-III. *Nat. Struct. Biol.*, **1994**, *1*, 423-425.
- van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L.T. M.; Feenstra, K. A.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C.: **2004**. GROMACS user manual version 3.2, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands.
- van de Waterbeemd, H.; Tute, M. S.; Carter, R. E.; Grassy, G.; Kubinyi, H.; Martin, Y. C.; Willet, P. Glossary of Terms Used in Computational Drug Design. *Pure Appl. Chem.*, **1997**, *69*, 1137-1152.
- Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiol.*, **1993**, *3*, 97-130.
- Varki, A., Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J.; Chrispeels, M.; Hindsgaul, O.; Paulson, J. C.; Manzi, A.; Powell, L.; van Halbeek, H.; Janssen, K.; CozzaSialiano, M.; Brown, D.; deBruin, D.; Weiss, D.; Urgo, T. Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York, **1999**. The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.
- Vasseur, E. Chemical studies on the jelly coat of the sea-urchin egg. *Acta Chem. Scand.*, **1948**, *2*, 900-913.
- Verli, H.; Guimarães, J. A. Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339*; 281-290.
- Verli, H.; Guimarães, J. A. Insights into the induced fit mechanism in Antithrombin-heparin interaction using using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Mod.*, **2005**, *24*; 203-212.

- Verli, H.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, **2005**.
- Vilela-Silva, A. C. E. S.; Alves, A. P.; Valente, A. P.; Vacquier, V. D.; Mourão, P.A.S. Structure of the sulfated alpha-1-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition. *Glycobiol.*, **1999**, *9*, 927-933.
- Vilela-Silva, A. C. E. S.; Castro, M. O.; Valente, A. P.; Biermann, C.; Mourão, P. A. S. Sulfated Fucans from the Egg Jellies of the Closely Related Sea Urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* Ensure Species-specific Fertilization. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 379-387.
- von der Lieth, C.-W.; Kozár, T.; Hull, W. E. A (critical) survey of modelling protocols used to explore the conformational space of oligosaccharides. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1997**, *395-396*, 225-244.
- von der Lieth, C.-W.; Lütkeke, T.; Frank, M. The role of informatics in glycobiology research with special emphasis on automatic interpretation of MS spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1760*, 568-577.
- Walenga, J. M.; Jeske, W. P.; Samama, M. M.; Frapaise, F. X.; Bick, R. L.; Fareed, J. Fondaparinux: a synthetic heparin pentasaccharide as a new antithrombotic agent. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2002**, *11*, 397-404.
- Walenga, J. M.; Jeske, W. P.; Fareed, J.; Samama, M. M. Development of a synthetic heparin pentasaccharide as an antithrombotic drug. Em *New therapeutic agents in thrombosis and thrombolysis*, 2<sup>a</sup> Ed., Sasahara, A. A.; Loscalzo, J. Eds.; Marcel Dekker, Inc., Nova York, **2003**, 241-264.
- Wallis, R. B. Hirudins: from leeches to man. *Semin. Thromb. Hemost.*, **1996**, *22*, 185-196.
- Warren, G. L.; Andrews, C. W.; Capelli, A.-M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; Tedesco, G.; Wall, I. D.; Woolven, J. M.; Peishoff, C. E.; Head, M. S. A Critical Assessment of *Docking* Programs and Scoring Functions. *J. Med. Chem.*, **2005**, *49*, 5912-5931.
- Waugh, D. F.; Fitzgerald, M. A. Quantitative aspects of antithrombin and heparin in plasma, *Am. J. Physiol.*, **1956**, *184*, 627-639.
- Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. An all atom force-field for

- simulations of proteins and nucleic-acids. *J. Comput. Chem.*, **1986**, 7, 230-252.
- Weitz, J. I.; Crowther, M. Direct thrombin inhibitors. *Thromb. Res.*, **2002**, 106, V275-V284.
- Weitz, J. I.; Hirsh, J. Em *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*, Sasahara, A. A.; Loscalzo, J., eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, **2003**, cap.2.
- Weitz, J. I. Emerging anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.*, **2006**, 96, 274–84.
- Witmer, M. R.; Hatton, M. W. C. Antithrombin-III-beta associates more readily than antithrombin-III-alpha with uninjured and deendothelialized aortic-wall *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscl. Thromb.*, **1991**, 11, 530–539.
- Woods, R. J.; Dwek, R. A.; Edge, C. J.; Fraserreid, B. Molecular Mechanical and Molecular Dynamic Simulations of Glycoproteins and Oligosaccharides. 1. GLYCAM\_93 Parameter Development. *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 3832-3246.
- Wun, T. C.; Kretzmer, K. K.; Girard, T. J.; Miletich, J. P.; Broze, G. J. Jr. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 6001-6004.
- Zehnder, J. L.; Galli, S. J. Mast-cell heparin demystified. *Nature*, **1999**, 400, 714-715.
- Yui, T.; Ogawa, K. Computer modeling of carbohydrate molecules. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2005**, 17, 159-176.

## 9 Anexos

Durante a realização desta dissertação tive a oportunidade de realizar colaborações com os grupos do Prof. Dr. Luís Maurício T. R. Lima, da Faculdade de Farmácia, UFRJ, acerca do refinamento da estrutura cristalográfica da trombina complexada a suramina e do Prof. Dr. Fábio Klampt, do Departamento de Bioquímica, UFRGS, acerca da descrição conformacional das formas oxidadas da proteína cofilina. Destas colaborações surgiram alguns trabalhos que estão em fase de finalização.

### 9.1 Trabalho III

*Em preparação*

#### **Refinement of the Thrombin-Suramin Complex by Molecular Dynamics Simulations**

**Camila F. Becker**, Hugo Verli, Luís Maurício T. R. Lima

It has been progressively evidenced the influence of crystal environment on protein conformation(1) and, consequently, on the correlation between the three-dimensional structure of a given molecule and its biological function. So in order to refine the thrombin-SVR crystallographic complex we decided for the use of molecular dynamics (MD) simulations. Indeed, with the isolation of just one thrombin-SVR complex from its crystallographic environment, replacing crystal contacts by water molecules, such methodology is capable to evaluate the extent of conformational modification induced by non-biological interactions(2-4).

Two 10ns MD simulations were performed, one for the thrombin-SVR complex and one for the uncomplexed thrombin. All simulations were stable during the performed time scale (Figure1A), with an average RMSD for the protein moiety of about 0.3nm (Supplemental). Increased flexibilities were observed for thrombin L chain (average value = 0.34nm) and for SVR (average value = 0.43nm). Such deviations are located in the first 2ns and correspond to a large modification of SVR orientation at the binding site (Figure1D). Through this process, a series of

interactions are augmented, as those with residues Lys87, Lys107, Lys236, Trp237, and Phe245, and other are lost, as with Arg93, Asp243, and Glu247, resulting in an increase of about -300kJ/mol in SVR interaction with thrombin (Table 1 and Supplemental).

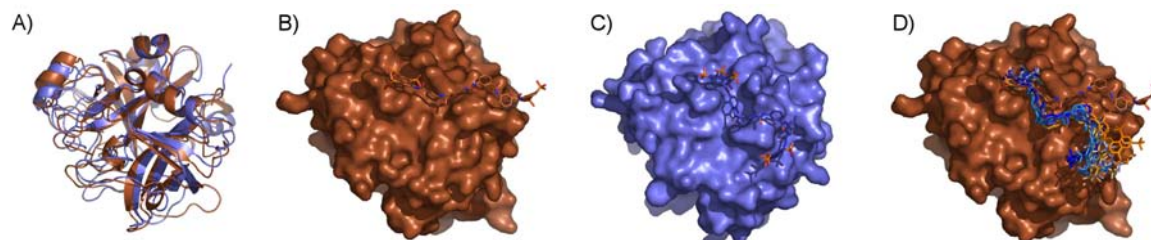


Figure 1: Comparison between crystal (brown) and MD (blue) conformations of the thrombin-suramin complex. A) superimposition between crystal and the final frame from MD, B) crystallographic orientation of suramin, C) solution orientation of suramin after 10ns, and D) superimposition of 10 suramin conformations, collected from each 1ns (the change in suramin color from brown to blue consent with the simulation progression). All thrombin structures are in the same orientation.

Table 1: Average interaction energy between SVR and thrombin.

Thrombin residues	Average interaction energy (kJ/mol) <sup>a</sup>
Lys87	-28.2 ± 22.6
Pro92	-15.7 ± 3.3
Arg93	-19.4 ± 12.9
Arg101	-26.7 ± 11.2
Lys107	-5.9 ± 8.0
Lys236	-46.8 ± 18.2
Trp237	-60.9 ± 13.4
Lys240	-56.4 ± 24.4
Asp243	-2.7 ± 4.0
Gln244	-52.8 ± 6.6
Phe245	-45.5 ± 10.4
Glu247	-14.6 ± 11.9
Total	-492.0 ± 51.7

<sup>a</sup> Sampled over all the 10ns MD simulation.

In addition, the comparison between MD and the X-ray data suggest that the origin for the SVR behavior in the performed simulations lies in crystal contacts. As shown in Figure 1, one part of SVR occupies in MD the same region as in the crystal, while the opposite part modifies its orientation. The fixed part of SVR is held in crystal by a series of contacts with the Glu14C-Ser14I helix and with a tight packing against Asp186A-Glu186B of the neighbor thrombin molecule in the crystal cell, which conformationally restrict the orientation of SVR in crystallographic structure. Upon removal of this contacts and inclusion of water molecules, the L chain accommodates in solution, originating the increased RMSD value observed in the simulations (Supplemental).

### Supplemental Material

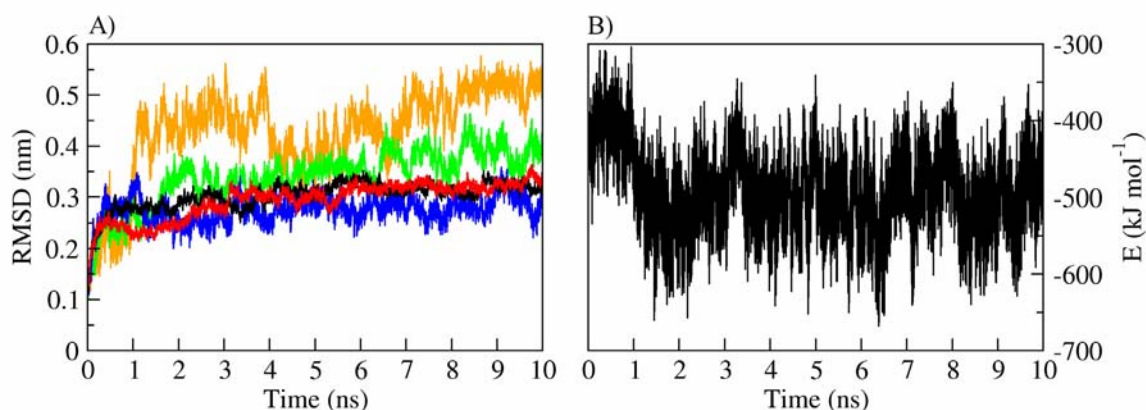


Figure 1S: A) All atom RMSD for thrombin H chain (black for thrombin-SVR complex and red for uncomplexed thrombin) and L chain (green for thrombin-SVR complex and blue for uncomplexed thrombin), and for SVR complexed with thrombin. B) Interaction energy between thrombin and SVR.



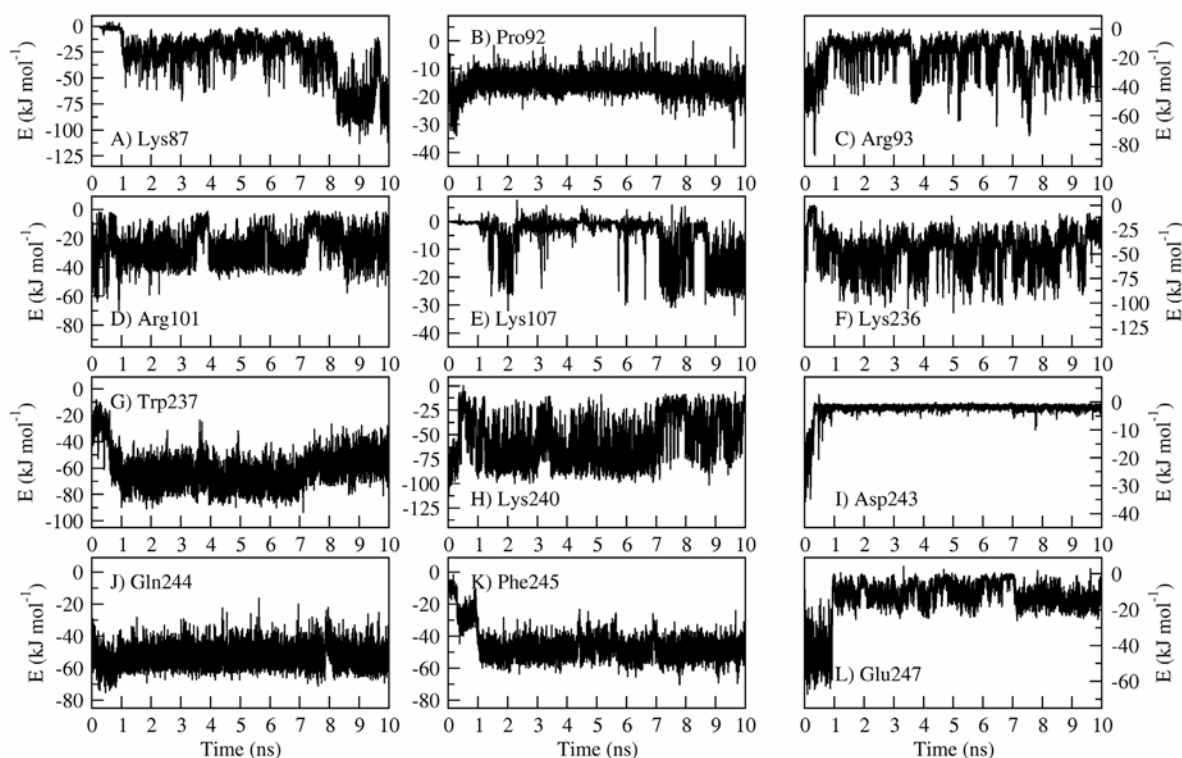


Figure 2S: Interaction energy between a set of thrombin amino acid residues and SVR.

#### References

1. Eyal, E.; Gerzon, S.; Potapov, V.; Edelman, M.; Sobolev, V. The Limit of Accuracy of Protein Modeling: Influence of Crystal Packing on Protein Structure. *J. of Mol. Biol.*, **2005**, *351*, 431-442.
2. Verli, H.; Guimarães, J. A. Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.*, **2005**, *24*, 203-212.
3. Verli, H.; Calazans, A.; Brindeiro, R.; Tanuri, A.; Guimaraes, J. A. Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: Clarifying differences between crystallographic and solution structures. *J. Mol. Graph. Model.*, *In Press, Corrected Proof*.
4. Terra, R. M. S.; Guimaraes, J. A.; Verli, H. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *J. Mol. Graph. Model.*, *In Press, Corrected Proof*.

## 9.2 Trabalho IV

*Em preparação*

### **Conformational description of cofilin oxidation state**

**Camila F. Becker, Fábio Klamt, Hugo Verli**

O citoesqueleto de actina apresenta papel essencial em muitos processos celulares, tais como citocinese, mudança na forma das células, endocitose e exocitose. Todos estes processos são dependentes da correta organização espacial e temporal do citoesqueleto de actina, ou seja, regulação da des- e da polimerização. Esta reorganização no citoesqueleto é regulada por uma variedade de proteínas ligadoras de actina, as quais por sua vez são reguladas por estímulos externos como níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , pH e fosforilação reversível (Pfannstiel *et al.*, 2001; Pope *et al.*, 2004).

A cofilina pertence a uma família de proteínas ligadoras de actina e é capaz de ligar-se a actina e assim, realizar a despolimerização dos filamentos de actina através da aceleração da taxa de dissociação das subunidades (Pfannstiel *et al.*, 2001; Pope *et al.*, 2004). Além disso, a cofilina é capaz de auto-associar-se, formando dímeros e oligômeros de cofilina através de ligações tiol-específicas. A cofilina parece existir em duas isoformas *in vivo*: monômeros exibindo atividade de separação e oligômeros exibindo atividade de indução do empacotamento da actina. Em células submetidas a estresse oxidativo, a cofilina está associada com empacotamento de actina e assim, extrapola-se que a cofilina possa apresentar a atividade de indução do empacotamento da actina *in vivo* (Pfannstiel *et al.*, 2001).

Como a dimerização da cofilina parece ser realizada através de pontes dissulfídicas, o objetivo deste trabalho é investigar a influência da oxidação dos resíduos de cisteína na estrutura da cofilina. Assim, a estrutura cristalográfica da cofilina humana utilizada está depositada sob o código PDB 1Q8G. A forma oxidada da cofilina foi obtida da estrutura 1Q8G, contendo as quatro cisteínas com o grupamento  $-\text{SH}$  oxidado à ácido sulfênico ( $-\text{SOH}$ ). Ambas estruturas foram simuladas por DM (figura 1).

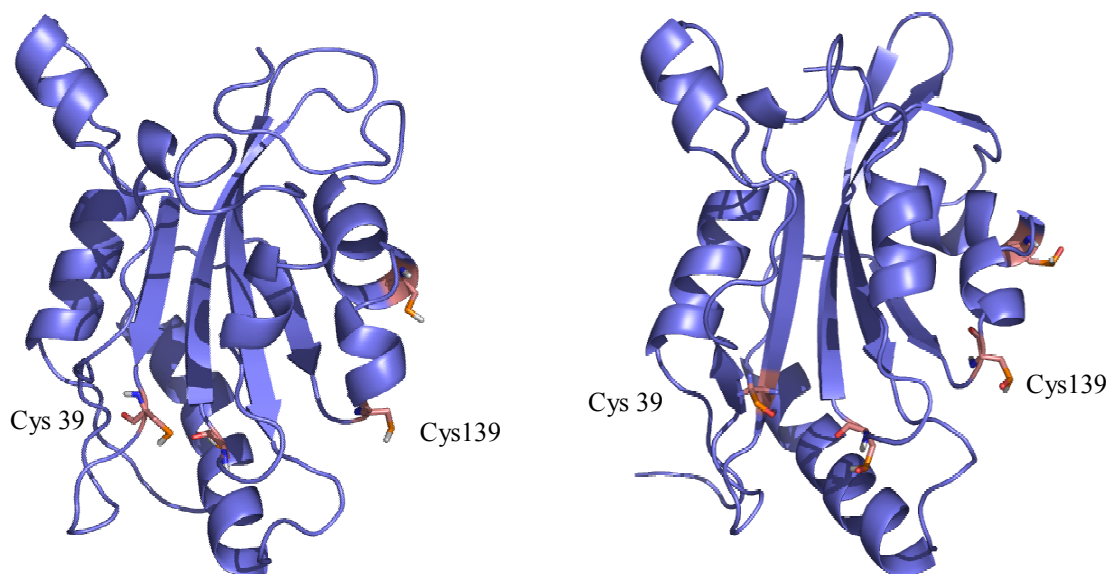


Figura 1. Estrutura da cofilina (1Q8G) e da cofilina oxidada após simulações de DM.

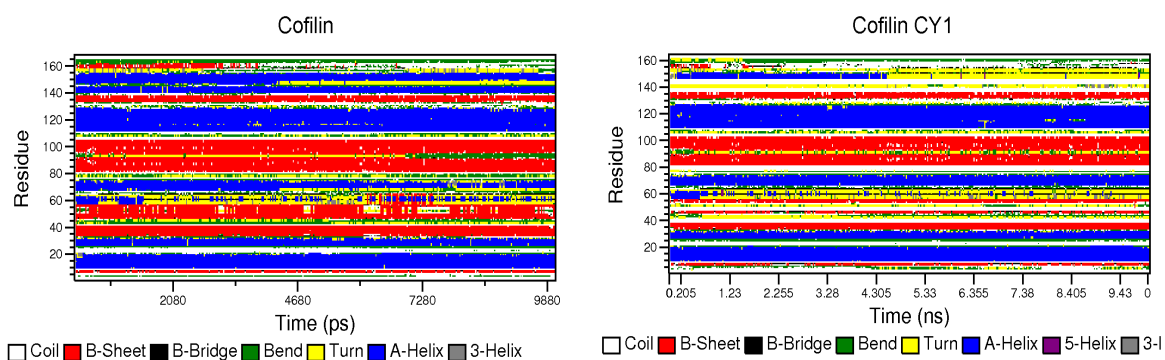


Figura 2. DSSP dos resíduos de aminoácidos como função do tempo, da cofilina e da cofilina oxidada.

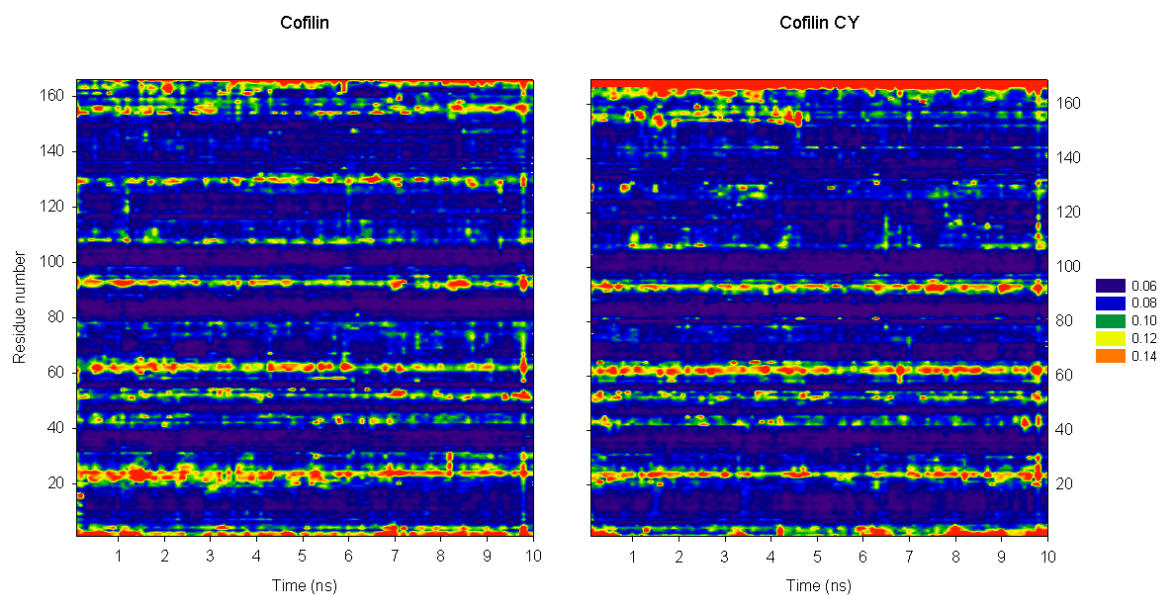


Figura 3. RMSF como função dos números dos resíduos de aminoácidos e do tempo, para a cofilina e para a cofilina oxidada.

De forma a verificar a mobilidade relativa das diferentes regiões da cofilina, foi realizada a análise de RMSF como função do número do resíduo de aminoácido e do tempo (figura 3) para a cofilina e para a cofilina oxidada. Dos resíduos 30 a 60, a folha- $\beta$  desfaz-se (figura 2) da cofilina normal para a oxidada, o que está de acordo com a maior flexibilidade desta região como demonstrado pelo gráfico de RMSF (figura 3). Nos resíduos em torno de 140-160,  $\alpha$ -hélices transformam-se em voltas e alças (figura 2), as quais são mais flexíveis, como demonstrado através do RMSF (figura 3). As regiões mencionadas acima compreendem dois dos resíduos de cisteína oxidados (Cys 39 e Cys139). Assim, os resultados contribuem para demonstrar a desestabilização e o aumento da flexibilidade da estrutura da cofilina quando as cisteínas estão na forma oxidada.

### Referências Bibliográficas

- Pfannstiel, J.; Cyrklaff, M.; Habermann, A.; Stoeva, S.; Griffiths, G.; Shoeman, R.; Faulstich, H. Human Cofilin Forms Oligomers Exhibiting Actin Bundling Activity. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 49476–49484.
- Pope, B. J.; Zierler-Gould, K. M.; Kühne, R.; Weeds, A. G.; Ball, L. J. Solution structure of human cofilin. Actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *J. Biol. Chem.*, 2004, *279*, 4840–4848.

### 9.3 Arquivos de simulações por DM

São arquivos de entrada, que contém os parâmetros de simulações por DM, isto é, são arquivos .mdp que listam os parâmetros que controlarão o sistema molecular. Dentre outros, informam como a integração deve ser realizada, por quantos passos, qual a temperatura e a pressão, o tempo total da simulação ou etapa a ser simulada.

Minimização de energia:

```

;
;      User spoel (236)
;      Wed Nov  3 17:12:44 1993
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define         = -DFLEX_SPC
constraints    = none
integrator     = steep
emtol         = 0.0001
emstep        = 0.1
nstcgsteep    = 100
nsteps        = 150000
nstcomm       = 1
nstxout       = 100
nstvout       = 100
nstfout       = 0
nstlog        = 100
nstenergy     = 100
nstlist       = 10
ns_type       = grid
coulombtype   = PME
rlist         = 0.9
rcoulomb      = 0.9
rvdw         = 0.9
pme_order     = 4
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        = no
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        = no

```

Termalização A:

```

;
;      User spoel (236)
;      Wed Nov  3 17:12:44 1993
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define         = -DPOSRE
constraints    = all-bonds
integrator     = md
tinit         = 0.0
dt            = 0.002      ; ps !
nsteps        = 500       ; total 1 ps.
nstcomm       = 1
nstxout       = 100
nstvout       = 100
nstfout       = 0
nstlog        = 100

```

```

nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = _2 SOL Na
tau_t          = 0.1 0.1 0.1
ref_t          = 50 50 50
; Energy monitoring
energygrps     = _2 SOL Na
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel        = yes
gen_temp       = 50.0
gen_seed       = 173529

```

Termalização B:

```

;
;      User spoel (236)
;      Wed Nov  3 17:12:44 1993
;      Input file
;
title          = Yo
cpp            = /lib/cpp
define         = -DFLEX_SPC
constraints    = all-bonds
integrator     = md
tinit         = 1.0
dt             = 0.002      ; ps !
nsteps        = 4500      ; total 9 ps.
nstcomm       = 1
nstxout       = 100
nstvout       = 100
nstfout       = 0
nstlog        = 100
nstenergy     = 100
nstlist       = 10
ns_type       = grid
coulombtype   = PME
rlist         = 0.9
rcoulomb      = 0.9
rvdw          = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order     = 4
ewald_rtol    = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        = berendsen
tc-grps       = _2 SOL Na
tau_t         = 0.1 0.1 0.1
ref_t         = 50 50 50
; Energy monitoring
energygrps    = _2 SOL Na

```

```

; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl      = berendsen
Pcoupltype  = isotropic
tau_p       = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p       = 1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel     = yes
gen_temp    = 50.0
gen_seed    = 173529

```

Termalização C:

```

;
;      User spoel (236)
;      Wed Nov  3 17:12:44 1993
;      Input file
;
title      = Yo
cpp        = /lib/cpp
define     = -DFLEX_SPC
constraints = all-bonds
integrator = md
tinit     = 10.0
dt        = 0.002      ; ps !
nsteps    = 2500      ; total 5 ps.
nstcomm   = 1
nstxout   = 100
nstvout   = 100
nstfout   = 0
nstlog    = 100
nstenergy = 100
nstlist   = 10
ns_type   = grid
coulombtype = PME
rlist     = 0.9
rcoulomb  = 0.9
rvdw      = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft = yes
pme_order = 4
ewald_rtol = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl    = berendsen
tc-grps   = _2 SOL Na
tau_t     = 0.1 0.1 0.1
ref_t     = 100 100 100
; Energy monitoring
energygrps = _2 SOL Na
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl    = berendsen
Pcoupltype = isotropic
tau_p     = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p     = 1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel   = yes
gen_temp  = 100.0
gen_seed  = 173529

```

Termalização D:

```

;
;      User spoel (236)
;      Wed Nov  3 17:12:44 1993
;      Input file

```

```

;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 15.0
dt              = 0.002      ; ps !
nsteps         = 2500      ; total 5 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 100
nstvout        = 100
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft   = yes
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = _2 SOL Na
tau_t          = 0.1 0.1 0.1
ref_t          = 150 150 150
; Energy monitoring
energygrps     = _2 SOL Na
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel        = yes
gen_temp       = 150.0
gen_seed       = 173129

```

Termalização E:

```

;
;      User spoel (236)
;      Wed Nov 3 17:12:44 1993
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 20.0
dt              = 0.002      ; ps !
nsteps         = 2500      ; total 5 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 100
nstvout        = 100
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype    = PME

```



```

rlist           = 0.9
rcoulomb        = 0.9
rvdw            = 0.9
fourierspacing  = 0.12
optimize_fft    = yes
pme_order       = 4
ewald_rtol      = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl          = berendsen
tc-grps         = _2 SOL Na
tau_t           = 0.1 0.1 0.1
ref_t           = 200 200 200
; Energy monitoring
energygrps      = _2 SOL Na
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype      = isotropic
tau_p           = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p           = 1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel         = yes
gen_temp        = 150.0
gen_seed        = 173129

```

Termalização F:

```

;
;      User spoel (236)
;      Wed Nov 3 17:12:44 1993
;      Input file
;
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define          = -DFLEX_SPC
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 25.0
dt              = 0.002      ; ps !
nsteps         = 2500      ; total 5 ps.
nstcomm        = 1
nstxout        = 100
nstvout        = 100
nstfout        = 0
nstlog         = 100
nstenergy      = 100
nstlist        = 10
ns_type        = grid
coulombtype     = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft    = yes
pme_order       = 4
ewald_rtol      = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl          = berendsen
tc-grps         = _2 SOL Na
tau_t           = 0.1 0.1 0.1
ref_t           = 200 200 200
; Energy monitoring
energygrps      = _2 SOL Na
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype      = isotropic
tau_p           = 0.5

```

```
compressibility = 4.5e-5
ref_p           = 1.0
; Generate velocites is off at 100 K.
gen_vel        = yes
gen_temp       = 150.0
gen_seed       = 173129
```

DM - 1000 ps:

```
;
;      User spoel (236)
;      Wed Nov  3 17:12:44 1993
;      Input file
;
title          = Yo
cpp            = /lib/cpp
define         = -DFLEX_SPC
constraints    = all-bonds
integrator     = md
tinit         = 30.0
dt             = 0.002    ; ps !
nsteps        = 485000   ; total 30-1000 ps.
nstcomm       = 1
nstxout       = 250
nstvout       = 1000
nstfout       = 0
nstlog        = 100
nstenergy     = 100
nstlist       = 10
ns_type       = grid
coulombtype   = PME
rlist         = 0.9
rcoulomb      = 0.9
rvdw          = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft  = yes
pme_order     = 4
ewald_rtol    = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        = berendsen
tc-grps       = _2 SOL Na
tau_t         = 0.1 0.1 0.1
ref_t         = 310 310 310
; Energy monitoring
energygrps    = _2 SOL Na
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p         = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p         = 1.0
; Generate velocites is off at 100 K.
gen_vel       = no
gen_temp      = 310.0
gen_seed      = 173529
```

## 10 Curriculum Vitae

### I. Trabalhos científicos apresentados em congressos:

#### a. Nacionais:

- Verli, H., **Becker, C. F.** & Guimarães, J. A. **2004** Molecular dynamics investigation of heparin recognition by antithrombin. *Programas e Resumos da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, M-30. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 15 a 18 de maio de 2004, Caxambu, MG, Brasil.
- Becker, C. F.**, Mourão, P. A. S, Verli, H. & Guimarães, J. A. **2005** Conformational study and molecular dynamics simulations of galactans and fucans in aqueous solution. *Programas e Resumos da XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, M-44. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2 a 5 de julho de 2005, Águas de Lindóia, SP, Brasil.
- Becker, C. F.**, Guimarães, J. A. & Verli, H. **2005** Molecular dynamics and atomic charges calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Programas e Resumos da XXXIV Reunião Anual Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, M-18. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2 a 5 de julho de 2005, Águas de Lindóia, SP, Brasil.
- Becker, C. F.**, Verli, H.; Rodrigues, A. P. C.; Romeiro, L. A. S.; Guimarães, J. A. **2005** Estudo conformacional de inibidores da enzima Acetil-Colinesterase utilizando métodos de dinâmica molecular. *Programas e Resumos da XXVIII Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química*, MD-019. XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30 de maio a 2 de junho de **2005**, Poços de Caldas, MG, Brasil.
- Becker, C. F.**, Fachin, P. L., Guimarães, J. A. e Verli, H. **2006** Conformational study and molecular dynamics simulations in aqueous solution of the glycan structure of antithrombin. *Programas e Resumos da XXXV Reunião Anual Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, M-7. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1 a 4 de julho de 2006, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

## II. Publicações em periódicos especializados:

### a. Internacionais:

**Becker, C. F.**, Guimarães, J. A., Verli, H. **2005** Molecular dynamics and atomic charges calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, 340, 1499-1507.

**Becker, C. F.**, Mourão, P.A.S., Guimarães, J. A., Verli, H. **2007** Study of galactan and fucan conformations in aqueous solution: structural implications to biological activities. *J. Mol. Graph. Model.*, in press.

**Becker, C. F.**, Guimarães, J. A., Verli, H. **2007** Conformational study and molecular dynamics simulations in aqueous solution of the glycan structure of antithrombin. *Carbohydr. Res.*, em preparação.

## III. Bolsa recebida:

Bolsista CNPq – BIC de janeiro de 2004 a fevereiro de 2006.

Bolsista CAPES do programa de mestrado em biologia celular e molecular pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS a partir de março de 2006 a abril de 2007.