

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

**INTERAÇÃO HEPARINA-ANTITROMBINA:  
RECONHECIMENTO MOLECULAR CARACTERIZADO POR  
FERRAMENTAS DE MODELAGEM MOLECULAR**

Hugo Verli

Porto Alegre – Brasil  
Maio de 2005

**INTERAÇÃO HEPARINA-ANTITROMBINA: RECONHECIMENTO MOLECULAR  
CARACTERIZADO POR FERRAMENTAS DE MODELAGEM MOLECULAR**

*Hugo Verli*

Tese de doutorado elaborada no Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor doutor:

Jorge Almeida Guimarães

Porto Alegre – Brasil

Maio de 2005

**INTERAÇÃO HEPARINA-ANTITROMBINA: RECONHECIMENTO MOLECULAR  
CARACTERIZADO POR FERRAMENTAS DE MODELAGEM MOLECULAR**

*Hugo Verli*

Tese 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 Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

---

Jorge A. Guimarães (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Presidente)

---

Luiz Augusto Basso (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

---

Glaucius Oliva (USP)

---

Ivarne Luis dos Santos Tersariol (UMC)

---

Paulo A. Netz (ULBRA) (Suplente)

Esta tese foi realizada sob a orientação 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 Doutor em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

VERLI, Hugo.

**Interação Heparina-Antitrombina: Reconhecimento Molecular Caracterizado  
por Ferramentas de Modelagem Molecular**

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2005.

Tese: Doutor em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

1. Dinâmica Molecular

2. Heparina

3. Antitrombina

4. Coagulação

I. Jorge Almeida Guimarães

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

III. Títulos

## AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão ao Prof. Jorge A. Guimarães, tanto pela maravilhosa oportunidade de trabalhar sob sua orientação, quanto pelo contínuo exemplo de conduta pessoal, profissional e científica que oferece aos seus alunos. Sua absoluta confiança e total suporte ao desenvolvimento deste trabalho, das idéias desenvolvidas e amadurecidas durante sua realização, e o respeito e igualdade com que trata seus discípulos são, sem dúvida alguma, alguns dos ensinamentos mais marcantes que recebi em toda minha formação científica.

Aos professores Luiz Augusto Basso e Paulo A. Netz, membros da comissão de acompanhamento, pela enorme prestatividade e atenção ao desenvolvimento da presente Tese.

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

À Prof.<sup>a</sup> Célia R. Carlini, pela atenção e paciência nas inúmeras conversas durante estes anos.

À Prof.<sup>a</sup> Helena Nader e ao Prof. Dietrich, que me receberam de braços abertos na Unifesp, numa tarde de discussões científicas que tiveram profundas influências no desenrolar da presente Tese. De fato, nesta tarde foi pavimentada a conquista da confiança, tanto da significância dos resultados obtidos, quanto dos caminhos escolhidos para a realização do trabalho.

Aos professores. Ivarne Tersariol, Laurent Dardenne, Paulo A. Netz, Ernesto Caffarena e Carlos Maurício Sant'Anna pelas enormes contribuições científicas a esta Tese e, especialmente, pelo auxílio na redação do primeiro manuscrito publicado na *Carbohydrate Research*.

À Camila Becker, que é meus braços direito e esquerdo no estudo de polissacarídeos. Mais do que isto, você compõe uma enorme parcela das conquistas deste doutoramento.

Ao Hermes e aos demais alunos do Grupo de Bioinformática Estrutural, pelo seu envolvimento no sonho e propósito de contribuir para a ciência e educação brasileiras.

Aos grandes amigos que fiz em Porto Alegre, pelo convívio e companheirismo.

Ao Luciano e Sílvia que, por suas competências e eficiências exemplares, tornaram estes anos muito mais agradáveis e simples.

Desde já a todos os membros da banca, por terem aceitado o convite.

Ao absoluto suporte sempre oferecido pela minha família, sem o qual eu não seria capaz de completar esta *aventura*.

*“A tentativa ... fracassou devido ... à ausência de uma cultura científica solidamente estabelecida que pudesse contrapor-se ao clientelismo ostensivamente assumido por professores e alunos.”*

Elder, F. C.: As reformas do ensino médio e a profissionalização da medicina na corte do Rio de Janeiro, 1854-1884. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1994.



Dedico esta Tese ao esforço de poucos, muito poucos, em acordar a Universidade Brasileira de seu Berço Esplêndido, tentando fazê-la cumprir seu papel em impedir a condenação da sociedade brasileira a Cem Anos de Solidão.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xvii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xxi
1 Introdução.....	1
1.1 A hemostasia e a cascata de coagulação .....	1
1.2 Estrutura de serpinas.....	4
1.3 O uso da heparina e de heparinas de baixo peso molecular na terapêutica ...	7
1.4 Aspectos moleculares da modulação da antitrombina (AT) pela heparina ....	14
1.5 Nomenclatura de conformações de carboidratos .....	18
1.5.1 Importância da conformação do resíduo IdoA na atividade da heparina .	21
1.6 Desenvolvimento de inibidores sintéticos de fator Xa.....	24
1.7 A dinâmica molecular (DM) como ferramenta computacional para o estudo das propriedades de biomoléculas .....	29
2 Objetivos.....	35
3 Metodologia .....	36
3.1 Programas utilizados .....	36
3.2 Cálculos utilizando métodos semi-empíricos.....	36
3.3 Cálculos utilizando métodos ab initio.....	37
3.4 Simulações de DM.....	38
3.4.1 Protocolo de simulação .....	38
3.4.2 Construção de topologias .....	39
3.4.3 Uso de diedros impróprios para fixar as conformações do resíduo IdoA.	40

3.4.4	Validação das simulações de DM.....	42
4	Resultados.....	43
4.1	Preâmbulo .....	43
4.2	Trabalho I .....	45
4.3	Trabalho II .....	51
4.4	Trabalho III .....	62
4.5	Trabalho IV .....	72
5	Discussão Geral .....	83
5.1	Validação de simulações de DM .....	83
5.2	Parametrização de simulações de DM para carboidratos .....	84
5.2.1	Parâmetros gerais para simulação da heparina .....	84
5.2.2	Descrição do perfil conformacional do IdoA .....	87
5.2.3	Comparação de diferentes esquemas de carga na simulação por DM da heparina.....	88
5.3	Estudo por DM do complexo heparina-AT .....	90
5.3.1	Dinâmica da alça Lys28-Glu37 e do RCL.....	91
5.3.2	Interação pentassacarídeo-AT.....	92
5.3.3	Encaixe-induzido no complexo heparina-AT .....	93
5.4	Implicações para o desenvolvimento racional de novos agentes anticoagulantes, baseados no mecanismo de ação da heparina .....	95
6	Conclusões.....	97
7	Perspectivas.....	98
8	Glossário .....	99
9	Referências Bibliográficas .....	103
10	Anexos .....	119

10.1 Trabalho I .....	119
10.2 Trabalho II .....	120
10.3 Trabalho III .....	121
10.4 Trabalho IV .....	123
10.5 Trabalho V .....	124
11 Curriculum Vitae .....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACR – alça central reativa  
AT – antitrombina  
DM – dinâmica molecular  
FDA – Food and Drug Administration  
FL - fosfolipídios  
FT – fator tecidual  
GAGs – glicosaminoglicanos  
Gla –  $\gamma$ -carboxiglutamato  
GlcA – ácido glicurônico  
GlcN - glicosamina  
HBPM – heparina(s) de baixo-peso molecular  
IdoA – ácido idurônico  
MD – molecular dynamics  
MM – mecânica molecular  
PDB – Protein Data Bank  
PF4 – platelet factor 4  
PME – Particle-Mesh Ewald  
RCL – reactive center loop  
RMN – ressonância magnética nuclear  
TEV – tromboembolismo venoso  
TFPI – tissue factor pathway inhibitor

## RESUMO

A heparina foi isolada no início do século XX e permanece, até os dias atuais, como um dos mais importantes e eficientes agentes terapêuticos de ação antitrombótica. Sua atividade anticoagulante deve-se à ativação da antitrombina (AT), uma serpina responsável pela inibição fisiológica de serino-proteinases plasmáticas, tais como fIIa e fXa.

Os esforços no sentido da elucidação dos aspectos estruturais e dinâmicos associados ao reconhecimento molecular da heparina pela AT, em nível atômico, vêm encontrando diversas dificuldades, principalmente associadas aos compostos sacarídicos. Em decorrência de sua elevada polaridade e flexibilidade, glicosaminoglicanos como a heparina são difíceis de estudar e modelar. Soma-se a isto o fato de que os resíduos de iduronato presentes na heparina (IdoA) apresentam um incomum equilíbrio conformacional entre estados de cadeira ( ${}^1C_4$ ) e bote-torcido ( ${}^2S_0$ ), sendo esta última estrutura postulada como a possível conformação bioativa.

Sendo assim, este trabalho apresenta um estudo de modelagem molecular do perfil conformacional da heparina, tanto em solução quanto complexada à AT, utilizando cálculos *ab initio* e simulações de dinâmica molecular (DM).

Em decorrência da ausência de parâmetros capazes de descrever polissacarídeos nos campos de força atualmente disponíveis, cargas atômicas foram geradas, utilizando-se os esquemas de Mulliken, Löwdin e cargas ajustadas ao Potencial Eletrostático, através de cálculos quantum-mecânicos na base 6-31G\*\* e testadas na simulação de DM da heparina. Diversas condições de simulação, tais como modelos de água, concentrações de sais e as conformações  ${}^1C_4$  e  ${}^2S_0$  do IdoA, foram avaliadas de forma a identificar as melhores condições para a descrição conformacional da heparina em solução. O protocolo de DM obtido foi então utilizado no estudo do complexo AT-heparina.

Os resultados obtidos estão de acordo com os dados experimentais atualmente disponíveis acerca da conformação da heparina e da contribuição energética de cada resíduo de aminoácido da AT para a formação do complexo com a heparina. A partir dos cálculos *ab initio* realizados, foi proposto um refinamento na estrutura da heparina determinada por RMN, enquanto que as simulações de DM permitiram re-interpretar aspectos da estrutura tridimensional da AT determinada por cristalografia

de raios-X. Adicionalmente, os dados obtidos sugerem que não há requerimento conformacional para a interação do IdoA com a AT.

Globalmente, os dados indicam que simulações de DM podem ser utilizadas para representar adequadamente a conformação da heparina, assim como para caracterizar e quantificar suas interações com a AT. Assim sendo, propomos o uso de simulações de DM do complexo entre a AT e a heparina, ou entre a AT e compostos derivados da heparina, como uma ferramenta útil no processo de desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos e anticoagulantes.

## ABSTRACT

Heparin was isolated in the beginning of the XX century and until today remains as one of the most important and efficient antithrombotic therapeutic agents. Its anticoagulant activity is due to antithrombin (AT) activation, a serpin responsible for the physiological inhibition of plasma serine proteinases like fIIa and fXa.

Efforts to elucidate the heparin recognition by AT at atomic level have faced difficulties in structure determination and dynamics, mostly due to the carbohydrate moiety. Due to its highly polar functionality and flexibility sulfated glycosaminoglycans like heparin are difficult to study and model. In addition, heparin iduronate residues (IdoA) present an unusual equilibrium between chair ( ${}^1C_4$ ) and skew-boat ( ${}^2S_0$ ) forms, being the last one hypothesized as the bioactive conformation.

In this context we present here a molecular modeling study of heparin conformational profile, both in aqueous solution and in complex with AT, using *ab initio* and molecular dynamics (MD) calculations.

Due to lack in force field parameterization for polysaccharides, different atomic charges schemes (*e.g.* Mulliken, Löwdin, and Electrostatic Potential Derived Charges) were obtained from quantum-mechanical calculations, at the 6-31G\*\* level, and tested in heparin MD simulation. Different simulations conditions, *e.g.* water models, salt concentration, and the  ${}^1C_4$  and  ${}^2S_0$  IdoA conformations were also tested to verify the best conditions to describe heparin conformation in solution. Using the obtained protocol, MD simulations were used to study the AT-heparin interaction.

The obtained results are in agreement with the available experimental data, *i.e.* heparin NMR conformation and specific contributions of AT amino acid residues to the complex formation. Based on *ab initio* calculations, refinements in the heparin NMR structure were proposed, while the MD simulations supported re-interpretations of AT crystal structure. Also, the obtained data suggest that there is no conformational requirement to the IdoA interaction with AT.

Altogether the results show that MD simulations can be used to correctly represent heparin conformation, as well as to characterize and quantify its interaction with AT. Thus, MD simulation of heparin (and heparin-derived)-AT interactions is proposed here as a powerful tool to assist and support drug design of new antithrombotic agents.



## 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 apresentam alças de retro-alimentação positiva da trombina, enquanto as alças pretas, verdes e azuis representam vias de ativação de fatores da coagulação. .... 2
- Figura 2: Visão da frente a das “costas” de uma serpina típica, ilustrando as características estruturais desta classe de proteínas, tais como uma alça reativa (*RCL*), folhas- $\beta$  A, B e C (em vermelho, azul e verde, respectivamente) e  $\alpha$ -hélices, apresentadas de A a H (Gettins, 2002a). .... 5
- Figura 3: Representação esquemática da estruturas envolvidas na formação do complexo serpina-proteinase. A) complexo no momento da clivagem da alça reativa e antes da inserção da ACR (em azul); B-D) translocação da serino-proteinase (verde) de um pólo ao outro da serpina, com a conseqüente inserção da ACR nas folhas- $\beta$  A (vermelho); E) complexo final, no qual a proteinase se encontra distorcida em função da sua compressão contra a base da estrutura da serpina e, desta forma, completamente inativada (Gettins, 2002b). .... 7
- Figura 4: Representação de um hexassacarídeo de heparina (1), composto por resíduos de ácidos urônicos, idurônico e glicurônico, e glicosamina (Nader *et al.*, 2001). .... 8
- Figura 5: Representação esquemática da distribuição de peso molecular da heparina não fracionada e da heparina de baixo peso molecular. Adaptada de Boneu, 2000.. 8

Figura 6: Gráfico apresentando a relação entre as atividades anti-fXa e anti-fIIa de HBPM e seus respectivos pesos moleculares. As linhas azuis demonstram o aspecto linear de tal relação (Dados obtidos de Boneu, 2000).....	12
Figura 7: Representação da estrutura cristalográfica do complexo entre a antitrombina, a trombina e a heparina, código PDB 1TB6 (Li <i>et al.</i> , 2004).....	15
Figura 8: A) estrutura do pentassacarídeo sintético (4); B) estrutura cristalográfica da AT em sua forma livre, não complexada (código PDB 1ANT, Carrel <i>et al.</i> , 1994); C) estrutura cristalográfica da AT em sua forma complexada ao pentassacarídeo sintético (código PDB 1AZX, Jin <i>et al.</i> , 1997). Os círculos coloridos indicam as regiões nas quais se concentram as principais mudanças conformacionais induzidas na AT pelo pentassacarídeo, como a mudança na flexibilidade de alças e folhas- $\beta$ (círculo vermelho) e a formação de $\alpha$ -hélice (círculo verde) (Verli & Barreiro, 2005). .....	16
Figura 9: Representação esquemática da inibição de fIIa e fXa na presença de AT e heparina. Dois tipos distintos de mecanismos estão ilustrados, sendo um mecanismo envolvendo a simples ligação da serpina à protease pela heparina (denominado de ponte), e um mecanismo baseado na indução de mudança conformacional na AT pela heparina. Ambos os mecanismos resultam em potenciação da atividade anticoagulante da AT, embora diferentes proteases apresentem diferentes sensibilidades a cada um destes mecanismos.....	17
Figura 10: Globo conformacional do ciclo hexano (adaptado de Cremer & Szabo, 1995). As duas possíveis formas de cadeira estão marcadas em vermelho, enquanto três formas de bote torcido estão apresentadas em verde.....	21

- Figura 11: Perfil conformacional do resíduo IdoA em solução aquosa, em equilíbrio entre as conformações  ${}^2S_O$  (bote-torcido),  ${}^1C_4$  (cadeira) e  ${}^4C_1$  (cadeira), sendo a conformação  ${}^2S_O$  predominante em solução. .... 22
- Figura 12: Representação de hexassacarídeos de galactana (2) e fucana (3) (Pereira *et al.*, 2002)..... 23
- Figura 13: Esquema apresentando as etapas do planejamento do pentassacarídeo sintético (4). As setas em azul, marrom e vermelho destacam as principais modificações realizadas sobre (5): metilação da hidroxila anomérica, adição de grupo sulfato e substituição da sulfonamida por sulfato. .... 25
- Figura 14: Estrutura dos oligossacarídeos ativadores de AT, (5) e (9), e do composto não sacarídico (10). Os grupos marcados com elipses verdes no composto (9) representam os farmacóforos (*i.e.* grupos mais importantes para a interação fármaco-receptor) utilizados para o planejamento de (10) (Gunnarsson & Desai, 2002). .... 29
- Figura 15: Representação do efeito de diferentes tempos de integração nas simulações de dinâmica molecular. A) pequena descrição das propriedades do sistema em função de tempo de integração muito reduzido; B) instabilidades na simulação como fruto de tempos de integração muito elevados; C) descrição adequada e estável das propriedades moleculares de interesse a partir de valores corretos para o tempo de integração. Adaptado de Leach, 2001. .... 31
- Figura 16: Funções de energia que compõe campos de força. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem o estiramento de ligações químicas, ângulos de ligação e interações intermoleculares (van der Waals e eletrostáticas/Coulômbicas)..... 32

- Figura 17: Estrutura do ácido idurônico, ácido glicurônico e glicosamina, unidades sacarídicas que compõe a heparina..... 38
- Figura 18: Esquema das etapas que compõe as simulações de DM a 298K. 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 298K e se mantém nesta temperatura pelo resto da simulação. .... 39
- Figura 19: Esquema demonstrando a definição dos diedros próprios e impróprios. Embora a ordem dos átomos (numeração) possa ser a mesma, sua localização relativa no espaço não o é, ou seja, nos diedros próprios os 4 átomos estão conectados em série, um após o outro, o que não ocorre no diedro impróprio..... 41
- Figura 20: Esquema representando um processo de desenvolvimento de novos compostos bioativos, envolvendo a participação de métodos de modelagem molecular..... 96

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Heparinas de baixo-peso molecular (HBPM) comerciais, métodos de obtenção, pesos moleculares médios e relação de atividades anti-fXa/anti-fIIa (Fareed <i>et al.</i> , 1998; Boneu, 2000).....	10
Tabela 2: Nomenclatura de conformações adotadas por monossacarídeos (hexoses) utilizando como modelo o ácido idurônico.....	20
Tabela 3: Atividade anticoagulante <sup>a</sup> de derivados sintéticos da heparina (4-8).....	26
Tabela 4: Definição dos diedros impróprios utilizados para definir a conformação do resíduo IdoA. ....	41

# 1 Introdução

## 1.1 A hemostasia e a cascata de coagulação

A iniciação da coagulação ocorre normalmente como uma resposta a perturbações no endotélio vascular, tais como injúrias mecânicas ou estímulos pró-inflamatórios. Particularmente no caso de um dano físico no vaso, tem-se como conseqüência a exposição de elementos teciduais no sub-endotélio, induzindo a ativação e o acúmulo de plaquetas no local do dano, denominado tampão plaquetário (Jenny e Mann, 1998).

A partir da iniciação da coagulação, a propagação deste processo se dará como um resultado de complexos enzimáticos pró-coagulantes estruturados em elementos da matriz sub-endotelial e na membrana de plaquetas (Jenny e Mann, 1998). Estes complexos incluem como elementos 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.

A primeira etapa da coagulação ocorre a partir da interação do fator VIIa plasmático com o fator tecidual (FT, Figura 1), uma proteína integral de membrana exposta como conseqüência de danos vasculares agudos (Nakagaki *et al.*, 1991). O FT não é normalmente expresso na superfície de células vasculares, mas constitutivamente expresso na superfície de células extravasculares e, desta forma, exposta ao fluxo sanguíneo somente como resultado de dano ao endotélio (Drake *et al.*, 1989). O fator VIIa é uma enzima que circula livremente no plasma em pequenas quantidades (Morrissey *et al.*, 1993), suficientes para iniciar a coagulação: sua atividade catalítica na forma livre é muito pequena, tornando-se pronunciada somente em complexo com o FT. Além destas duas proteínas, um cofator não-protéico requerido nesta e em outras etapas da coagulação, constitui-se em superfícies fosfolipídicas (FL, ver adiante), oriundas principalmente das plaquetas do tampão plaquetário. A aceleração da cascata irá requerer quantidades crescentes de fVIIa, geradas a partir de alças de regulação envolvendo outros fatores da coagulação, como fIIa e fXa (Butenas e Mann, 1996).

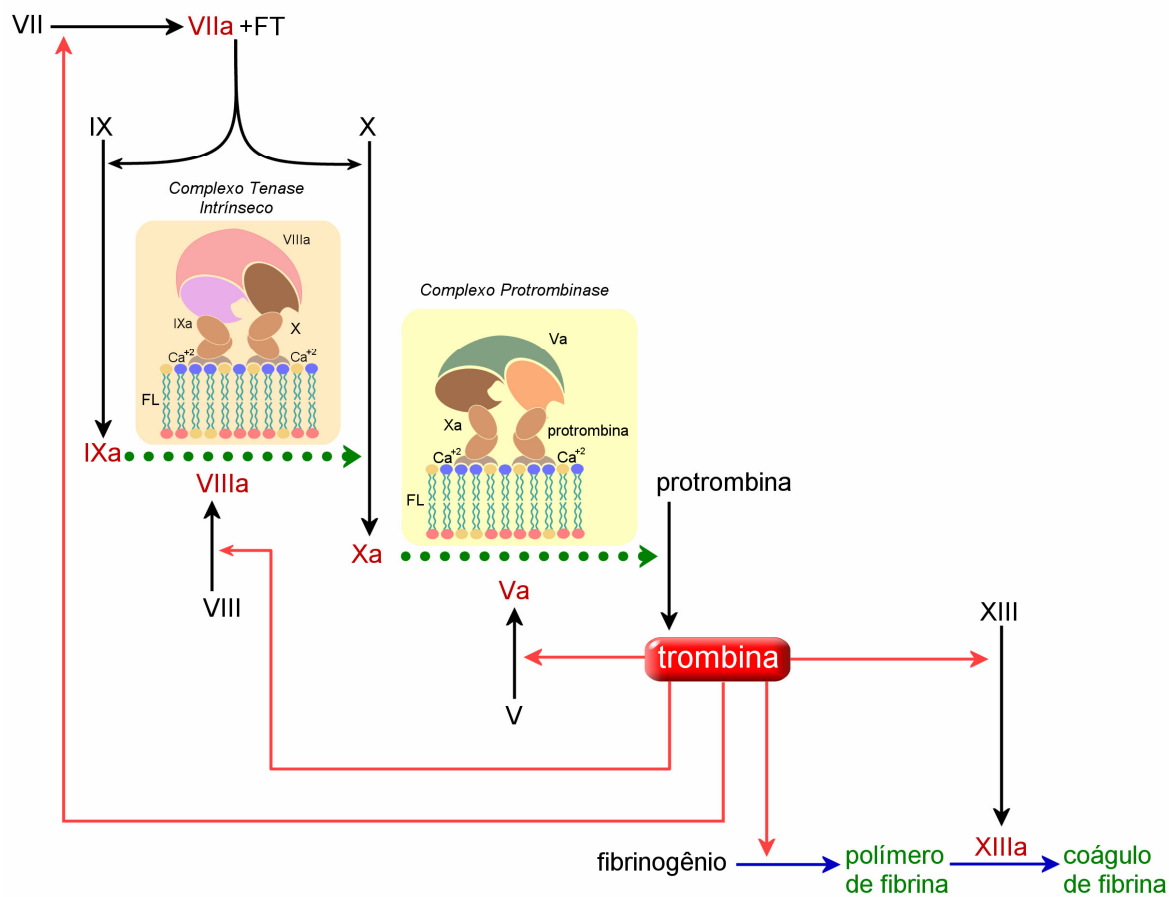


Figura 1: Representação esquemática da cascata de coagulação. Os percussores inativos estão apresentados em letras pretas (protrombina, V, VII, VIII, IX, X e XIII), enquanto as proteínas ativas estão apresentadas em vermelho (trombina, Va, VIIa, VIIIa, IXa, Xa e XIIIa). As setas em vermelho apresentam alças de retro-alimentação positiva da trombina, enquanto as alças pretas, verdes e azuis representam vias de ativação de fatores da coagulação.

A atividade catalítica do complexo fVIIa-FT-FL, denominado *Complexo Tenase Extrínseco*, é observada sobre os fatores IX e X, gerando fIXa e fXa. O fator IXa, por sua vez, também é responsável pela ativação de 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 do tenase extrínseco tem como função a conversão de protrombina em trombina na presença dos co-fatores FL e fVa, sendo denominado *Complexo Protrombinase* (Figura 1, Jenny e Mann, 1998).

A importância da presença de superfície fosfolipídicas na ativação dos fatores da coagulação está diretamente relacionada à estrutura dos mesmos. Os fatores VII, IX, X e a protrombina são zimogênios dependentes de vitamina K, caracterizados pela presença de um domínio *N*-terminal, denominado Gla, contendo de 10 a 12 resíduos  $\gamma$ -carboxiglutamato. Estes resíduos são gerados por modificação pós-translacional utilizando a vitamina K como cofator, e são os responsáveis pelo acoplamento dos fatores da coagulação às superfícies fosfolipídicas (Kalafatis *et al.*, 1994).

O principal resultado da propagação da coagulação através das atividades de complexos envolvendo enzimas, co-fatores protéicos e superfícies fosfolipídicas é a ativação de protrombina gerando trombina (Figura 1). Esta enzima tem diversos papéis na coagulação, dentre os quais podemos citar a conversão de fibrinogênio em uma matriz insolúvel de fibrina e a ativação de diversas alças de retro-alimentação positiva, incluindo a ativação dos fatores VII, VIII e V, além de ativar o fator XIII, responsável pela estabilização do coágulo de fibrina através de uma atividade transglutaminase (Jenny e Mann, 1998).

O controle e a regulação da coagulação em humanos envolve três principais moduladores fisiológicos: proteína C, TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*, inibidor da via do fator tecidual) e antitrombina (AT).

A via da proteína C é responsável pela inativação dos complexos protrombinase e tenase intrínseco através da inativação de seus respectivos co-fatores, os fatores Va e VIIIa (Eaton *et al.*, 1986 e Guinto & Esmon, 1984). A extensão do papel anticoagulante desta via é diretamente e paradoxalmente relacionada à geração de trombina e da atividade protrombinásica, ambas com papel pró-coagulante (Kalafatis *et al.*, 1994). A formação de um complexo entre a trombina e seu cofator anticoagulante, a trombomodulina, modifica a reatividade da trombina de forma que esta enzima não mais apresenta um papel pró-coagulante, mas sim, anticoagulante ao ativar proteína C (Esmon, 1989).

O TFPI é um membro da família Kunitz de inibidores enzimáticos (Wun *et al.*, 1988) capaz de inibir reversivelmente fator Xa livre no plasma, embora não apresente atividade inibitória sobre outras serino-proteinases em concentrações plasmáticas normais (Broze, 1987). 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, inibindo-o (Broze *et al.*, 1988). Este complexo, por sua vez, é



capaz de inibir reversivelmente o complexo FT-fator VIIa através da formação de um complexo envolvendo as quatro proteínas (Jenny e Mann, 1998).

AT é um membro das serpinas (*serpin*, *SERine* *Proteinase* *IN*hibitor), uma família de inibidores enzimáticos (Potempa *et al.*, 1994), capaz de inibir a maior parte das serino-proteinases da coagulação, embora seu papel fisiológico provavelmente envolva somente o fator Xa e a trombina (Olson *et al.*, 1997). AT, receptor-alvo responsável pelo uso clínico da heparina como agente anticoagulante, é um dos alvos a ser abordado na presente tese e, portanto, será descrita em maiores detalhes a seguir.

## 1.2 Estrutura de serpinas

As serpinas constituem-se numa superfamília de proteínas cuja característica principal é a presença de uma região central, comum entre seus membros, consistindo de 8 a 9  $\alpha$ -hélices e 3 grupos de folhas- $\beta$  (Figura 2). No caso específico da AT humana, a estrutura secundária inicia-se com uma alça na porção *N*-terminal, do aminoácido Asp6 ao Thr44. Nesta alça, a região entre as posições 28 e 37 não está resolvida, *i.e.* não é observada, nas estruturas cristalográficas da AT e de diversas outras serpinas (Whisstock *et al.*, 1998). Isto ocorre provavelmente em função de sua elevada flexibilidade. Esta alça *N*-terminal é seguida por uma série de hélices e folhas- $\beta$  (Jin *et al.* 1997 e Whisstock *et al.* 2000), incluindo:

- Hélice A, de Asn45 a Ser69;
- Hélice B, de Ser79 a Ala94;
- Hélice C, de Cys95 a Phe106;
- Hélice D, de Gln118 a Lys136;
- Hélice E, de Asn155 a Tyr166;
- Hélice F, de Asn178 a Thr194;
- Hélice G, de Ser291 a Leu299;
- Hélice H, de Thr300 a Glu310;
- Hélice I, de Leu331 a Met338;
- Folhas- $\beta$  A: Lys139 – Asp149, Gln171 – Leu173, Leu213 – Lys222, Phe323 – Ser330 e Asp366 – Val375;
- Folhas- $\beta$  B: Ile76 – Leu78, Met251 – Arg262, Gln268 – Pro273, Ile279 – Leu285, Phe408 – Glu414 e Ile420 – Val426;

- Folhas- $\beta$  C: Arg235 – Tyr240, Ser246 – Met251, Glu312 – Pro321 e Val400 – Lys403.

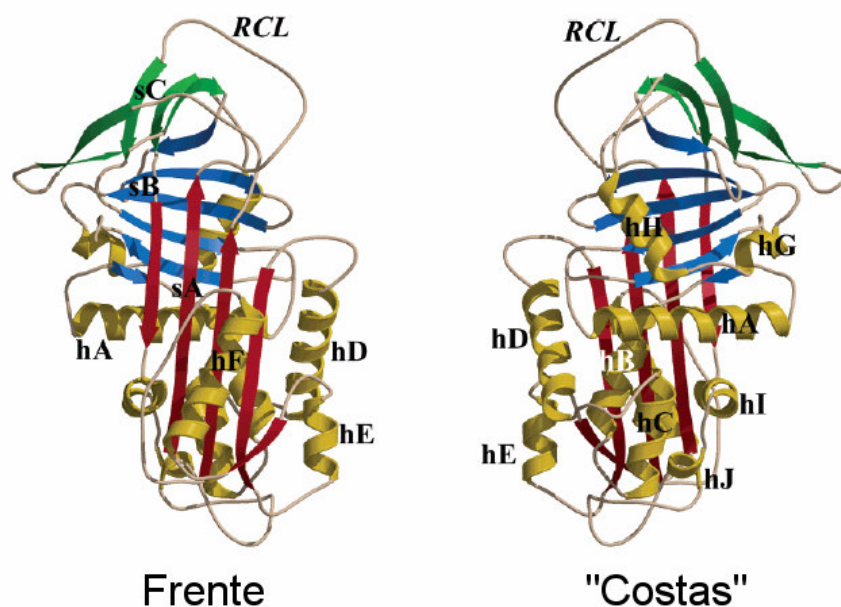


Figura 2: Visão da frente a das “costas” de uma serpina típica, ilustrando as características estruturais desta classe de proteínas, tais como uma alça reativa (*RCL*), folhas- $\beta$  A, B e C (em vermelho, azul e verde, respectivamente) e  $\alpha$ -hélices, apresentadas de A a H (Gettins, 2002a).

Embora as serpinas tenham sido originalmente identificadas como inibidoras de serino-proteínases, diversas proteínas foram caracterizadas como serpinas sem apresentarem atividade inibitória, *e.g.* a ovalbumina, uma proteína abundante no ovo de aves sem atividade inibidora de proteases (Wright, 1984). Dentre os processos biológicos nos quais as serpinas estão envolvidas incluem-se a coagulação sanguínea, fibrinólise, morte celular programada, angiogênese, desenvolvimento e inflamação (Gettins, 2000; Gettins, 2002a; Huntington *et al.*, 2000; Simonovic *et al.*, 2001). Isto ocorre em decorrência da elevada similaridade no padrão de enovelamento destas proteínas (ilustrado na Figura 2), mesmo em proteínas com baixa homologia entre suas seqüências primárias (<30%) (Gettins, 2002a).

Ainda assim, uma das características mais marcantes desta família de proteínas está justamente no seu mecanismo de inibição de proteases, ilustrado na Figura 3. As serpinas inibitórias são substratos suicidas, ligando-se irreversivelmente às suas proteases-alvo. O motivo responsável por esta atividade é denominado alça

central reativa (ACR ou RCL, da expressão em inglês *reactive center loop*), região das serpinas que apresenta uma ligação peptídica entre os resíduos P1 e P1', utilizando a notação de Berger e Schechter (Schechter & Berger, 1967), que será hidrolisada pela protease-alvo. Na AT, a alça reativa corresponde à seqüência delimitada pelos resíduos Asn376 e Arg393, *i.e.* P17 e P1, respectivamente. A base da ACR (P14 e P15), na proximidade da folha- $\beta$  A, é denominada região da dobradiça da ACR (*hinge region*), e tem sido proposta como importante região na modulação das propriedades inibitórias de serpinas (Gettins, 2002b, ver adiante).

Uma vez clivado, a ACR move-se de um pólo ao outro da serpina, inserindo-se na folha- $\beta$  A e prendendo a protease contra a estrutura da serpina (Figura 3) (Huntington *et al.*, 2000 e Gettins, 2002b). Neste processo, a estrutura tridimensional da protease é distorcida, incluindo-se a orientação da tríade catalítica, justificando a incapacidade da enzima de desfazer o intermediário acila, formado com a ACR, e o aumento da susceptibilidade à proteólise por parte da enzima, facilitando sua depuração (Huntington *et al.*, 2000). Um dos fatores estabilizadores que guiam este processo de inibição é justamente a inserção da ACR na folha- $\beta$  A. Esta região de estrutura secundária apresenta, antes da inserção, dois conjuntos de segmentos anti-paralelos e dois conjuntos paralelos (Figura 3). Após a inserção, transforma-se numa única folha- $\beta$  anti-paralela, acarretando num efeito estabilizador do complexo serpina-proteinase (Figura 3) (Gettins, 2002a). No total, o translocamento da protease de um pólo ao outro da serpina envolve mudanças conformacionais de até 65Å (Loebermann *et al.*, 1984).

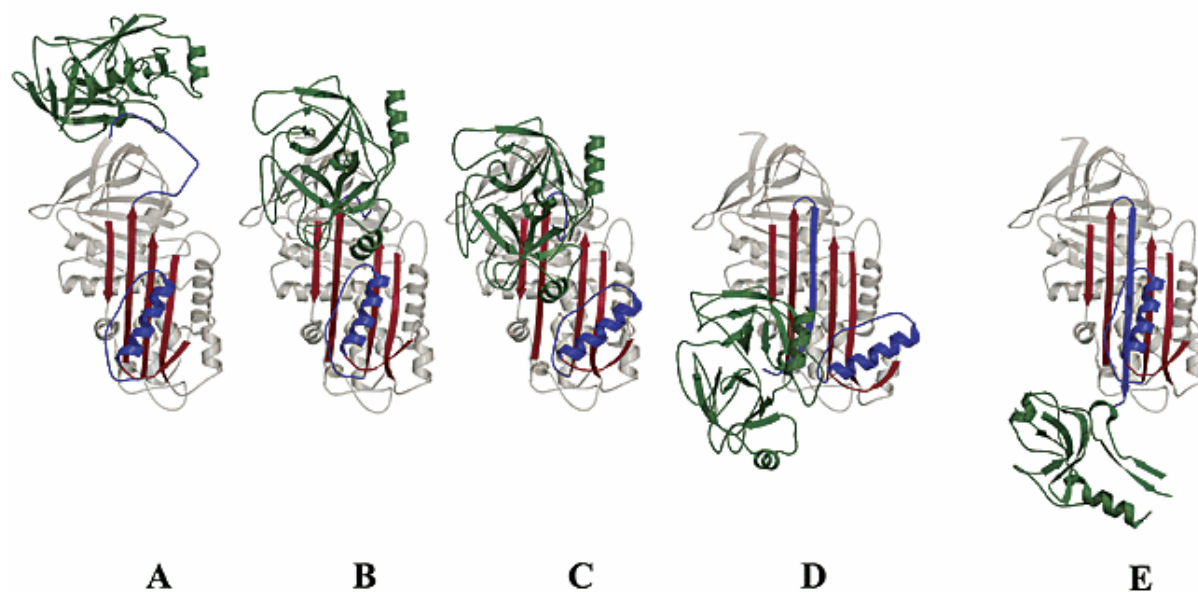


Figura 3: Representação esquemática da estruturas envolvidas na formação do complexo serpina-proteinase. A) complexo no momento da clivagem da alça reativa e antes da inserção da ACR (em azul); B-D) translocação da serino-proteinase (verde) de um pólo ao outro da serpina, com a conseqüente inserção da ACR nas folhas- $\beta$  A (vermelho); E) complexo final, no qual a proteinase se encontra distorcida em função da sua compressão contra a base da estrutura da serpina e, desta forma, completamente inativada (Gettins, 2002b).

### 1.3 O uso da heparina e de heparinas de baixo peso molecular na terapêutica

A heparina foi identificada e isolada em 1916, a partir de uma preparação de fígado de cães (Nader *et al.*, 2001), sendo utilizada clinicamente há mais de 40 anos como agente anticoagulante e antitrombótico (Jaques, 1979). É um polissacarídeo polissulfatado, composto por unidades hexassacarídicas contendo ácido idurônico 2-sulfatado (IdoA), glicosamina 2,6-dissulfatada (GlcN) e ácido glicurônico não sulfatado (GlcA) (Figura 4, Silva & Dietrich, 1975), embora pequenas variações sejam observadas em heparinas obtidas de diferentes fontes animais (Nader *et al.*, 2001). Comercialmente, a heparina é obtida a partir da mucosa intestinal ou pulmonar de bois, caracterizando-a como uma mistura heterogênea de polissacarídeos de diferentes tamanhos e pesos moleculares. O peso molecular de suas cadeias varia de 5 kDa a 30 kDa, com um peso molecular médio de 15 kDa referente a aproximadamente 30 unidades monossacarídicas (Figura 5) (Hirsh *et al.*, 1998).

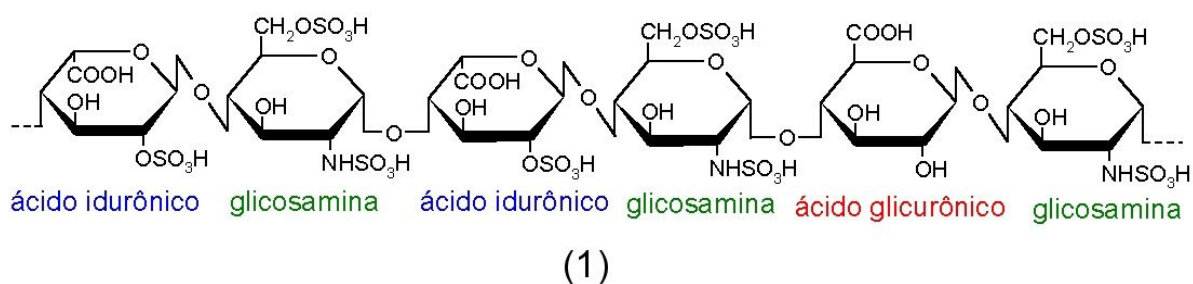


Figura 4: Representação de um hexassacarídeo de heparina (1), composto por resíduos de ácidos urônicos, idurônico e glicurônico, e glicosamina (Nader *et al.*, 2001).

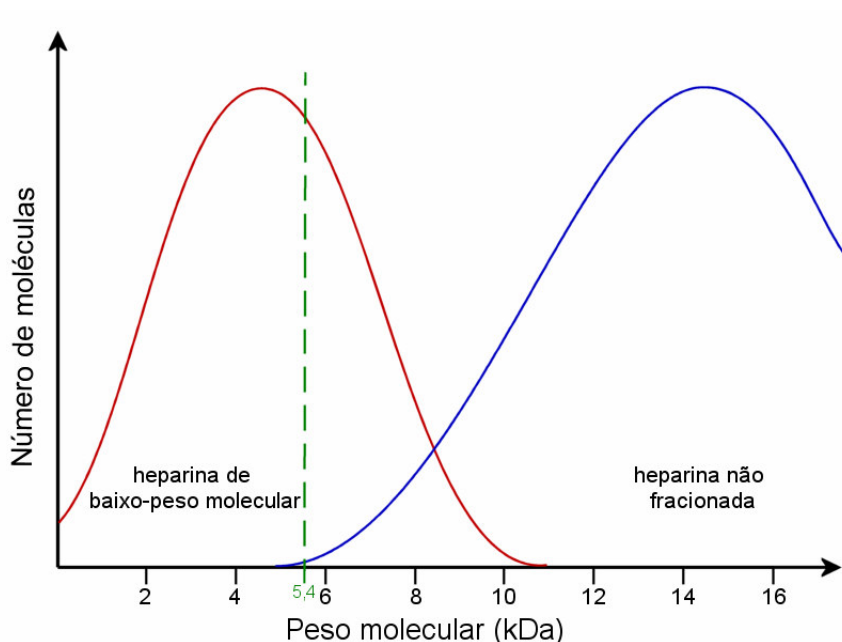


Figura 5: Representação esquemática da distribuição de peso molecular da heparina não fracionada e da heparina de baixo peso molecular. Adaptada de Boneu, 2000.

A atividade anticoagulante da heparina deve-se à sua capacidade em potenciar a ação inibitória da AT sobre as serino-proteinases da cascata de coagulação (*e.g.* trombina e fator Xa), formando com estas proteínas com complexo ternário. Este processo, no caso da trombina, é dependente do tamanho da cadeia polissacarídica da heparina: uma cadeia de 18 unidades monossacarídicas (~5,4 kDa) é a menor estrutura capaz de induzir inibição de trombina (Danielsson *et al.*, 1986). Em contrapartida, a inibição de fator Xa não depende do tamanho da cadeia polissacarídica, de forma que pequenos oligossacarídeos (*e.g.* pentassacarídeos de

~1,7 kDa) possuem capacidade de induzir inativação desta enzima (Choay *et al.*, 1983). Ambos mecanismos serão discutidos mais detalhadamente adiante no texto.

Tendo-se em vista que a heparina é composta em sua quase totalidade de cadeias apresentando peso molecular maior que 5,0 kDa, sua atividade inibitória é observada igualmente sobre trombina e fator Xa, de forma que a relação de atividades anti-fXa/antitrombina (ou anti-fXa/anti-fIIa) torna-se igual a 1 (Boneu, 2000).

Na busca por agentes anticoagulantes mais eficazes e seguros, na década de 1980 iniciou-se o uso terapêutico das denominadas heparinas de baixo-peso molecular (HBPM, Tabela 1), compostos obtidos através da fragmentação fracionada da heparina convencional (Nader *et al.*, 2001). Diversos métodos são utilizados de forma a fragmentar a heparina, gerando estruturas distintas entre si tanto na forma dos resíduos terminais gerados como no tamanho da cadeia: despolimerização por ácido nitroso, degradação enzimática ou benzilação seguida por hidrólise alcalina, dentre outros processos (Boneu, 2000 e Nader *et al.*, 2001). Dependendo do método de preparação, a massa molecular média e a curva de distribuição de massas moleculares (Figura 5) podem ser ligeiramente diferentes para cada HBPM, resultando em uma proporção distinta de cadeias polissacarídicas com massa molecular acima de 5,4 kDa. Este aspecto é um dos principais fatores associados às diferentes relações de atividade anti-fXa/anti-fIIa de cada preparação de HBPM, as quais podem variar de 1,5-2,5, para a tinzaparina, até 3,3-5,3, para a enoxaparina e a reviparina (Tabela 1, Boneu, 2000).

Tabela 1: Heparinas de baixo-peso molecular (HBPM) comerciais, métodos de obtenção, pesos moleculares médios e relação de atividades anti-fXa/anti-fIIa (Fareed *et al.*, 1998; Boneu, 2000).

Método de obtenção	HBPM	Peso molecular médio (kDa)	Anti-fXa / anti-fIIa	Nome comercial
Despolimerização com ácido nitroso	Dalteparina	6,0	1,9-3,2	Fragmin <sup>a</sup>
	Nadroparina	4,3	2,5-4	Fraxiparin <sup>b</sup>
	Reviparina	3,9	3,6-6,1	Clivarin <sup>c</sup>
Heparinase	Tinzaparina	6,5	1,5-2,5	Logiparin <sup>d</sup>
Benzilação / hidrólise alcalina	Enoxaparina	4,5	3,3-5,3	Clexane <sup>e</sup>
	Ardeparina	5,3	2	Normiflo <sup>f</sup>
	Certoparina	3,8	1,5-2,5	Sandoparin <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Pharmacia/Upjohn (Estocolmo, Suécia);

<sup>b</sup> Sanofi (Paris, França);

<sup>c</sup> Knoll AG (Ludwigshafen, Alemanha);

<sup>d</sup> Novo (Copenhague, Dinamarca);

<sup>e</sup> Rhône Poulenc (Paris, França);

<sup>f</sup> Wyeth Ayerst (Filadélfia, EUA);

<sup>g</sup> Novartis (Nuremberg, Alemanha).

Esta heterogeneidade no tamanho das cadeias e, em conseqüência, nas relações de atividades anti-fXa/anti-fIIa implica em conseqüências práticas na atividade anticoagulante das HBPM, de forma que cada formulação comercial de HBPM deve ser considerada como um composto específico, apresentando propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas próprias e específicas (Fareed *et al.*, 1998 e Boneu, 2000). Como destacado acima (item 1.1, Figura 1), a trombina gerada na cascata de coagulação apresenta propriedades funcionais além da hidrólise de fibrinogênio, tais como a ativação dos co-fatores VIII e V e a ativação do zimogênio fator XIII. Desta forma, a inibição dos primeiros traços de trombina gerados pela cascata é capaz de abolir a ativação dos co-fatores e a conseqüente formação de fatores Va e VIIIa (Ofosu *et al.*, 1986 e Ofosu *et al.*, 1989), essenciais para a formação dos complexos tenase intrínseco e protrombinase (Figura 1). Como

as HBPM apresentam baixa atividade inibitória de trombina em decorrência do reduzido tamanho de suas cadeias polissacarídicas (Figura 5), não possuem capacidade de inibir tais alças de retroalimentação (Figura 1), permitindo a formação dos fatores Va e VIIIa por quantidades-traço de trombina. Farmacologicamente esta diferença entre a heparina convencional, não-fracionada, e as HBPM é uma significativa diferença na potência da atividade anticoagulante dos dois agentes, sendo a heparina não-fracionada um agente significativamente mais anticoagulante (Boneu, 2000).

A associação da relação de atividades anti-fXa/anti-fIIa com o tamanho médio de cada HBPM pode ser observada na Figura 6. A observação dos dados referentes a reviparina, enoxaparina, dalteparina e tinzaparina demonstra claramente a presença de uma relação direta entre massa molecular e atividade inibitória da trombina, de forma que quanto maior a massa molecular média maior a atividade inibitória desta enzima (e menor a relação anti-fXa/anti-fIIa). O mesmo é observado para nardoparina e ardeparina. Isto está plenamente de acordo com a dependência de cadeias de elevada massa molecular (longas cadeias polissacarídicas) para a inibição de trombina, como descrito anteriormente. Contudo, a observação cuidadosa do gráfico apresentado na Figura 6 sugere que o tamanho da cadeia polissacarídica não é o único fator responsável pela inibição relativa de trombina e fator Xa. Por exemplo, enquanto reviparina e certoparina apresentam praticamente o mesmo peso molecular (~3,8 kDa), a última é praticamente duas vezes mais eficiente na inibição de trombina (Tabela 1 e Figura 6). A análise destes dados demonstra que diversos aspectos associados às razões moleculares para os efeitos biológicos das HBPM permanecem desconhecidos.



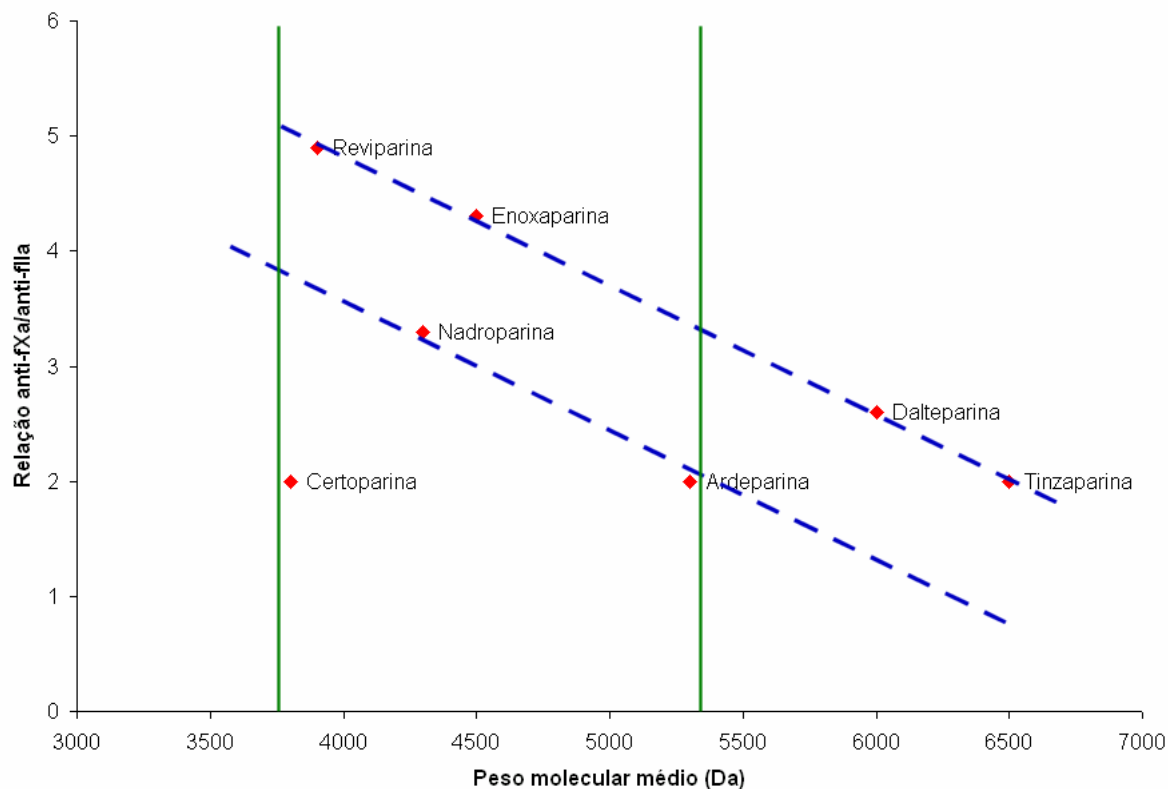


Figura 6: Gráfico apresentando a relação entre as atividades anti-fXa e anti-fIIa de HBPM e seus respectivos pesos moleculares. As linhas azuis demonstram o aspecto linear de tal relação (Dados obtidos de Boneu, 2000).

A heterogeneidade das HBPM se aplica não somente à inibição de trombina e fator Xa na presença de AT. Devido às suas propriedades estruturais, a heparina e outros derivados heparinóides são capazes de se ligar a um enorme número de proteínas, não necessariamente relacionados à coagulação (Mulloy & Linhardt, 2001). Assim sendo, outras ações já foram descritas para estes agentes anticoagulantes (Fareed *et al.*, 1998) e, desta forma, são susceptíveis a diferenças na composição química e peso molecular/tamanho das moléculas envolvidas (Hansen e Sandset, 1998). Dentre estas ações podemos citar:

- Indução da liberação de TFPI;
- Interação com o cofator II da heparina;
- Inibição das ações pró-coagulantes de leucócitos;
- Indução de fibrinólise;
- Ligação a diversas proteínas;
- Modulação do endotélio vascular, mediada ou não por receptor.

Estes aspectos, contudo, fogem ao escopo da presente Tese e não serão discutidos.

Embora menos potentes, as HBPM são mais efetivas e mais seguras que a heparina convencional na profilaxia em pacientes com elevado risco de trombose (Geerts *et al.*, 2001). De fato, o desenvolvimento das HBPM, com suas vantagens sobre a heparina convencional, possibilitou a difusão do tratamento e profilaxia de diversas desordens tromboembólicas, tais como o tromboembolismo venoso (TEV)<sup>1</sup>. Em linhas gerais, as vantagens associadas ao uso terapêutico de HBPM em relação a heparina incluem (Ageno & Turpie, 2003; Jay & Geerts, 2003):

- Eficácia equivalente (dependendo da aplicação clínica pode apresentar maior eficácia que heparina e varfarina, como em cirurgias ortopédicas);
- Maior segurança (menor risco de hemorragia);
- Menor risco de desenvolvimento de trombocitopenia induzida por heparina;
- Maior praticidade (somente uma administração diária, ao invés de duas ou três para a heparina);
- Menor custo do tratamento (sem necessidade de internação hospitalar e monitoração continuada do paciente).

Contudo, a heterogeneidade das condições médicas e a ausência de grandes ensaios clínicos metodologicamente rigorosos limitam as conclusões definitivas acerca da profilaxia a coagulopatias (Ageno & Turpie, 2003). Por exemplo, estudos demonstram que tanto a heparina convencional quanto HBPM apresentam eficácia similar na prevenção de acidentes trombóticos (no caso da TEV, em torno de 50% em relação ao placebo ou à ausência de tratamento), embora as HBPM mantenham

---

<sup>1</sup> O tromboembolismo venoso (TEV) é uma importante causa de morbidade e mortalidade. Dados referentes aos Estados Unidos indicam que aproximadamente 200.000 pacientes morrem anualmente tendo como causa direta ou contribuinte embolismo pulmonar (Alpert & Dalen, 1994). O embolismo pulmonar é responsável por 10% do total de mortes em pacientes hospitalizados (Sandler & Martin, 1989) e, a cada ano, são diagnosticados cerca de 170.000 novos episódios e 90.000 casos recorrentes de TEV (Anderson *et al.*, 1991). Contudo, as reais taxas de incidência, prevalência e mortalidade de TEV estão provavelmente subestimadas, uma vez que a doença freqüentemente não apresenta manifestações clínicas (Anderson *et al.*, 1991). Como fatores de risco para o TEV incluem-se tanto características individuais (*e.g.* idade maior que 40 anos, obesidade, imobilidade por mais de 4 anos, terapia com altas doses de estrogênio e trombofilia) quanto doenças ou procedimentos cirúrgicos (*e.g.* trauma, tumores malignos, falência cardíaca, infarto recente do miocárdio, infecção e síndrome nefrótica) (Thromboembolic Risk Factors Consensus Group, 1992).

redução em torno de 50% no risco de hemorragias (Mismetti *et al.*, 2000) sendo, portanto, fármacos significativamente mais seguros. Assim sendo, podem ser citadas como problemáticas associadas ao uso das HBPM:

- Necessidade de serem testadas individualmente para cada indicação clínica;
- Dificuldades na determinação das doses ótimas;
- Duração ideal do tratamento desconhecida;
- Origem animal.

#### **1.4 Aspectos moleculares da modulação da antitrombina (AT) pela heparina**

A atividade anticoagulante da AT é devida principalmente à sua capacidade de inibir trombina e fator Xa, com constantes de velocidade de  $8,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $2,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente, considerando-se somente o sistema bi-molecular serpina-protease. Com a inclusão de heparina e a formação do complexo ternário AT-protease-heparina (Figura 7) (Li *et al.*, 2004), contudo, pode-se observar uma potencialização de 3 a 4 ordens de grandeza na eficiência deste processo inibitório, alcançando constantes de velocidade de  $3,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  e  $1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para trombina e fator Xa, respectivamente (Craig *et al.*, 1989 e Olson *et al.*, 1991). Esta enorme potencialização na atividade anticoagulante da AT está relacionada ao fato de que este inibidor circula no plasma em uma conformação inativa (Huntington *et al.*, 1996), requerendo a ligação de um glicosaminoglicano polissulfatado como co-fator fisiológico (heparan sulfato) ou terapêutico (heparina) para inibição eficiente de suas proteínas-alvo.

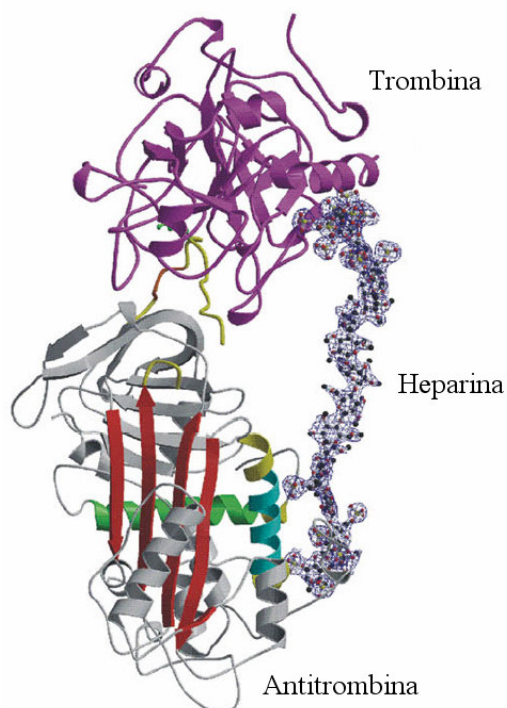
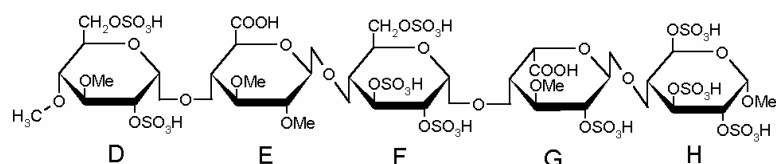


Figura 7: Representação da estrutura cristalográfica do complexo entre a antitrombina, a trombina e a heparina, código PDB 1TB6 (Li *et al.*, 2004).

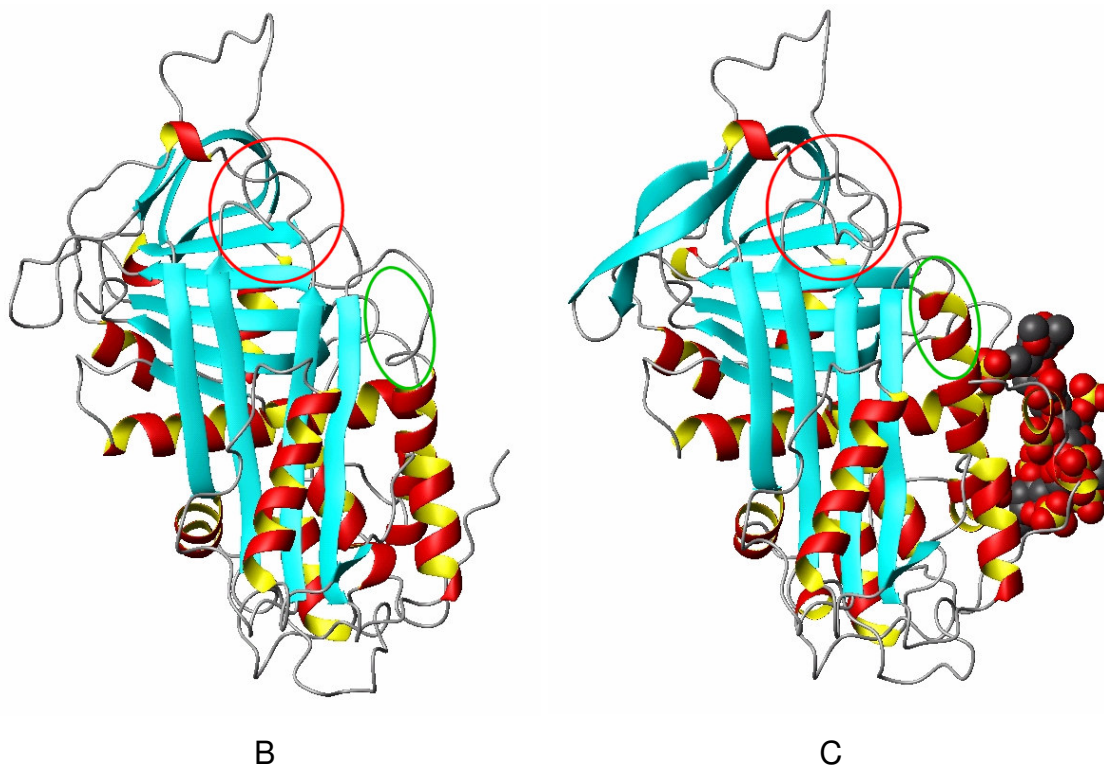
Com relação às razões moleculares para as propriedades anticoagulantes da heparina, a estrutura do complexo ternário AT-trombina-heparina, apresentada na Figura 7, ilustra o denominado *Mecanismo de "Ponte"*. Segundo este mecanismo, a potencialização pelo polissacarídeo da atividade inibitória da AT sobre suas proteases-alvo pelo polissacarídeo é devida a uma conexão física entre as duas proteínas, determinada principalmente por interações iônicas entre grupos sulfato da heparina e resíduos de aminoácidos carregados positivamente na AT e na protease. Contudo, este não é o único mecanismo pelo qual a heparina modula a atividade da AT.

O outro modelo de interação segundo o qual a heparina é capaz de modular a atividade da AT constitui-se num mecanismo baseado na indução de mudanças conformacionais (Figura 8), caracterizando um processo do tipo *encaixe induzido* (Verli & Barreiro, 2005). Este efeito foi observado inicialmente através da comparação da estrutura cristalográfica da AT livre (Carrel *et al.*, 1994) com a estrutura da AT complexada a um composto sintético (Jin *et al.*, 1997), derivado da heparina, denominado *pentassacarídeo sintético* (Figura 8A).



(4)

A



B

C

Figura 8: A) estrutura do pentassacarídeo sintético (4); B) estrutura cristalográfica da AT em sua forma livre, não complexada (código PDB 1ANT, Carrel *et al.*, 1994); C) estrutura cristalográfica da AT em sua forma complexada ao pentassacarídeo sintético (código PDB 1AZX, Jin *et al.*, 1997). Os círculos coloridos indicam as regiões nas quais se concentram as principais mudanças conformacionais induzidas na AT pelo pentassacarídeo, como a mudança na flexibilidade de alças e folhas- $\beta$  (círculo vermelho) e a formação de  $\alpha$ -hélice (círculo verde) (Verli & Barreiro, 2005).

As mudanças conformacionais induzidas na AT pelo pentassacarídeo sintético incluem: 1) formação de duas voltas adicionais na região C-terminal da hélice D (Figura 8C, círculo verde); 2) contração da folha- $\beta$  A; 3) expulsão da região da dobradiça da ACR (P14 e P15); 4) aumento na flexibilidade da ACR; 5) transformação da folha- $\beta$  A de 4 para 5 fitas, anti-paralelas (Jin *et al.*, 1997, Gettins, 2002a), além de formações de voltas adicionais na hélice A (Jin *et al.*, 1997).

Contudo, o mecanismo pelo qual a complexação da heparina à AT é transmitido a ACR ainda não está completamente resolvido (Gettins, 2002b). Ambos mecanismos de potencialização da atividade inibitória da AT, o mecanismo de ponte e o mecanismo baseado em mudanças conformacionais, estão ilustrados esquematicamente na Figura 9.

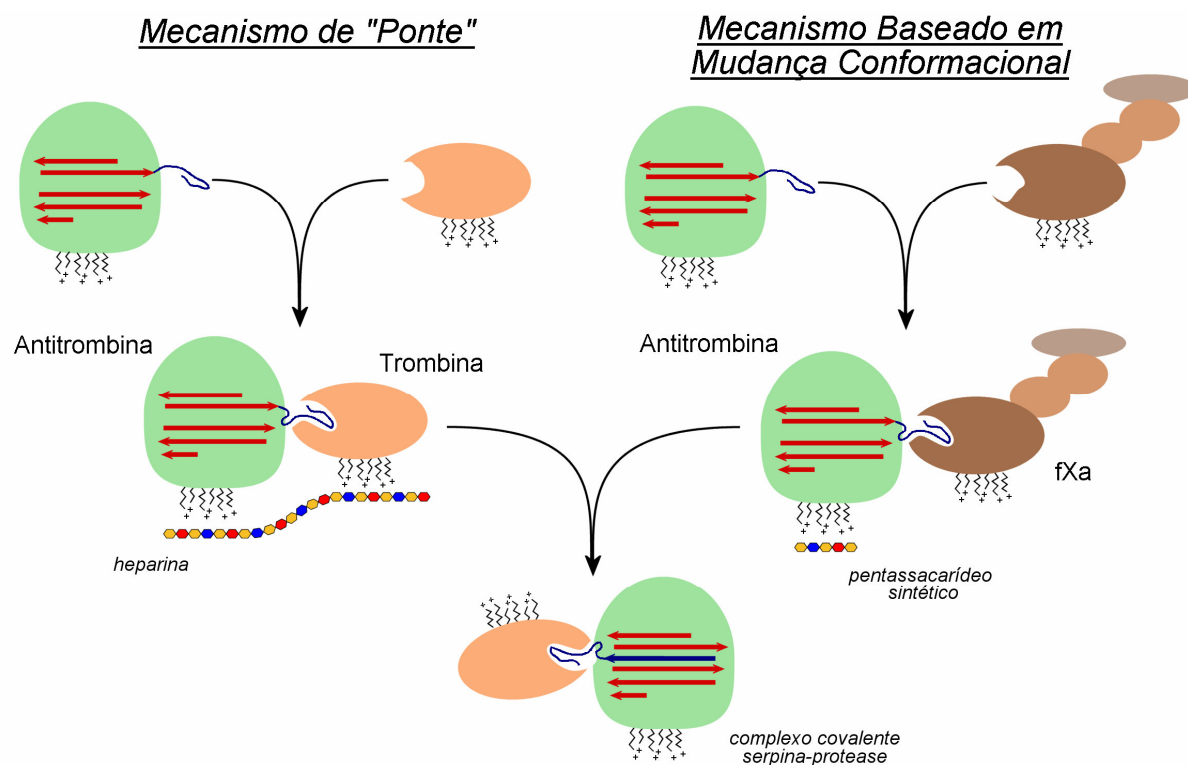


Figura 9: Representação esquemática da inibição de fIIa e fXa na presença de AT e heparina. Dois tipos distintos de mecanismos estão ilustrados, sendo um mecanismo envolvendo a simples ligação da serpina à protease pela heparina (denominado de ponte), e um mecanismo baseado na indução de mudança conformacional na AT pela heparina. Ambos os mecanismos resultam em potenciação da atividade anticoagulante da AT, embora diferentes proteases apresentem diferentes sensibilidades a cada um destes mecanismos.

Com relação ao mecanismo de molde na inibição de serino-proteinases pela AT (Figura 7) a conexão das duas proteínas pela heparina dependerá, principalmente, do tamanho da cadeia polissacarídica. Dados prévios demonstram que um mínimo de 18 unidades monossacarídicas (~5,4 kDa) é necessário para ativar a inibição de trombina pela AT (Figura 5 e Figura 9) (Danielsson *et al.*, 1986), requisito estrutural não compartilhado para a inibição de fator Xa. De fato, o requisito

estrutural mínimo necessário à inibição de fator Xa na presença de AT é uma seqüência pentassacarídica (Choay *et al.*, 1983). Em outras palavras, a trombina não parece ser sensível às mudanças conformacionais induzidas na AT pela heparina, dependendo somente do tamanho deste polissacarídeo para ser inibida. Em contrapartida, o fator Xa é sensível a ambos os mecanismos, destacadamente a mudança conformacional da AT. Deste modo, o uso de pequenas moléculas, capazes de induzir modificações na conformação da AT sem conectar a serpina à proteinase, possibilita uma promissora estratégia terapêutica de planejamento racional de inibidores seletivos de fator Xa, baseados no mecanismo de ação da heparina. Um exemplo de sucesso neste campo é o denominado pentassacarídeo sintético, comercializado pelo nome fondaparinux (Arixtra<sup>TM</sup>) pela Sanofi.

### **1.5 Nomenclatura de conformações de carboidratos**

A conformação de carboidratos é usualmente descrita de acordo com as Recomendações da IUPAC (IUPAC-IUB, 1980). Segundo estas recomendações, a conformação, *i.e.* o arranjo espacial aproximado dos átomos, de um monossacarídeo em sua forma cíclica por uma letra maiúscula, em itálico, designando a forma do anel, e por números, responsáveis pela distinção das possíveis variantes conformacionais para uma mesma forma. As letras utilizadas na descrição das formas de monossacarídeos são:

a) Anéis de 5 membros:

- *E*, utilizada para a conformação envelope;
- *T*, utilizada para a conformação torcida (*twist*).

b) Anéis de 6 membros:

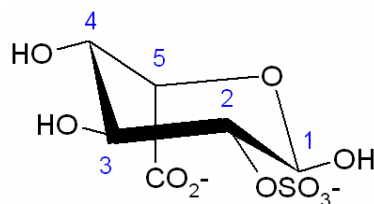
- *C*, utilizada para a conformação de cadeira;
- *B*, utilizada para a conformação de bote;
- *S*, utilizada para a conformação de bote-torcido (*skew-boat*);
- *H*, utilizada para a conformação de meia-cadeira (*half-chair*);
- *E*, utilizada para a conformação de envelope.

A distinção dos possíveis variantes de uma mesma forma de anel é realizada através da identificação dos 4 átomos que formam um plano. O átomo localizado acima deste plano terá seu número sobrescrito antes da letra maiúscula, enquanto que o átomo que estiver localizado abaixo do plano terá seu número subscrito após

a letra maiúscula. Heteroátomos (*e.g.* O, S) são indicados pelos seus símbolos subscrito ou sobrescritos (Tabela 2). Por exemplo, a conformação  ${}^2S_O$  do resíduo IdoA corresponde a uma forma de bote torcido, com o átomo número 2 acima do plano do anel, e o átomo de oxigênio abaixo deste plano. É importante destacar, contudo, que em função da numeração utilizada para o anel os numerais serão também diferentes. Utilizando como exemplo a conformação  ${}^2S_O$ , esta nomenclatura é obtida através da notação IUPAC, onde o átomo número 1 corresponde ao carbono anomérico. Em outros trabalhos, contudo, o número 1 é atribuído ao heteroátomo do sistema, de forma que  ${}^2S_O$  se torna  ${}^3S_1$  ou mesmo  ${}^3T_1$ , se a nomenclatura de anéis de 5 membros for estendida para anéis de 6 membros (Cremer & Szabo, 1995). De fato, segundo as recomendações da IUPAC (IUPAC-IUB, 1980) a nomenclatura conformação torcida (*twist*) é utilizada somente para anéis de 5 átomos, enquanto que a nomenclatura bote-torcido (*skew-boat*) é utilizada para anéis de 6 átomos.



Tabela 2: Nomenclatura de conformações adotadas por monossacarídeos (hexoses) utilizando como modelo o ácido idurônico.



Formas de Monossacarídeos	Nomenclatura IUPAC	"Puckering Coordinates"	
		$\theta$	$\phi$
cadeira	${}^1C_4$	$0^\circ$	$0^\circ$
	${}^4C_1$	$180^\circ$	$0^\circ$
bote	${}^{0,3}B$	$90^\circ$	$0^\circ$
	$B_{1,4}$	$90^\circ$	$60^\circ$
	$B_{2,5}$	$90^\circ$	$120^\circ$
	$B_{3,0}$	$90^\circ$	$180^\circ$
	${}^{1,4}B$	$90^\circ$	$240^\circ$
	${}^{2,5}B$	$90^\circ$	$300^\circ$
bote-torcido ( <i>skew-boat</i> )	${}^3S_1$	$90^\circ$	$30^\circ$
	${}^5S_1$	$90^\circ$	$90^\circ$
	${}^2S_0$	$90^\circ$	$150^\circ$
	${}^1S_3$	$90^\circ$	$210^\circ$
	${}^1S_5$	$90^\circ$	$270^\circ$
	${}^0S_2$	$90^\circ$	$330^\circ$

Os anéis de 6 membros podem apresentar diversas dezenas de possíveis conformações (Cremer & Szabo, 1995), sendo descritas em um globo conformacional tridimensional (Tabela 2 e Figura 10). De forma a facilitar a definição inequívoca destas conformações e suas variações, uma nomenclatura complementar foi proposta em 1975 por Cremer e Pople, denominada de *Ring Puckering Coordinates* (Cremer & Pople, 1975). Esta nomenclatura considera o desvio da planaridade (amplitude,  $\theta$ ) e a distorção dos anéis (ângulo de fase,  $\phi$ ), permitindo a descrição de todos os tipos possíveis de conformações de anéis (Cremer & Szabo, 1995).

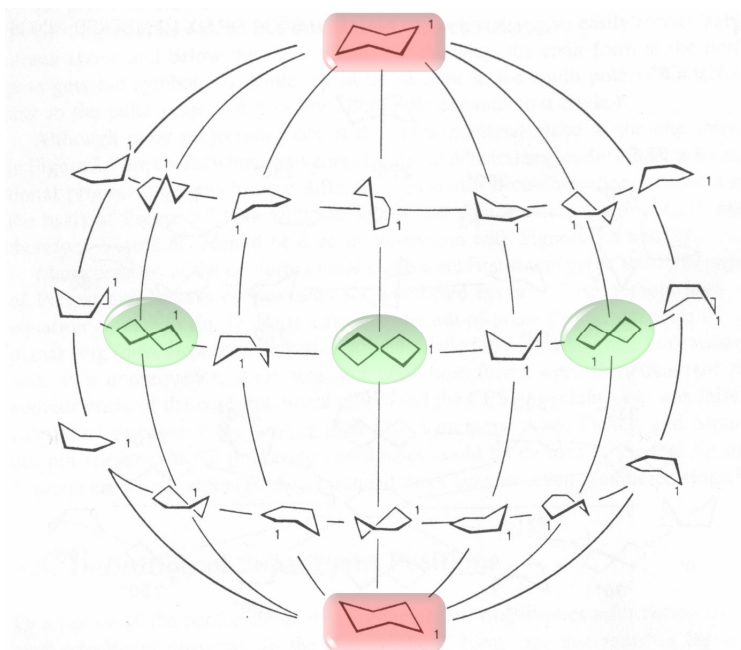


Figura 10: Globo conformacional do ciclo hexano (adaptado de Cremer & Szabo, 1995). As duas possíveis formas de cadeira estão marcadas em vermelho, enquanto três formas de bote torcido estão apresentadas em verde.

### 1.5.1 Importância da conformação do resíduo IdoA na atividade da heparina

A importância de aspectos conformacionais na atividade da heparina e seus derivados não se restringe a seu receptor-alvo, a AT. Os resíduos de IdoA (Figura 4) apresentam uma elevada mobilidade, conferindo à molécula de heparina aspectos conformacionais próprios (Danielsson *et al.*, 1986). Tais resíduos adotam um equilíbrio conformacional entre estados de cadeira ( ${}^1C_4$ ) e bote-torcido ( ${}^2S_0$ , Figura 11) (Ferro *et al.*, 1990) sem, contudo, causar dobras na cadeia polissacarídica (Danielsson *et al.*, 1986). De fato, é relatado que glicosaminoglicanos contendo resíduos mais rígidos de ácidos urônicos apresentam menor atividade antitrombótica (Mikhailov *et al.*, 1996), o que sugere que estas características conformacionais do IdoA contribuem para as propriedades anticoagulantes da heparina.

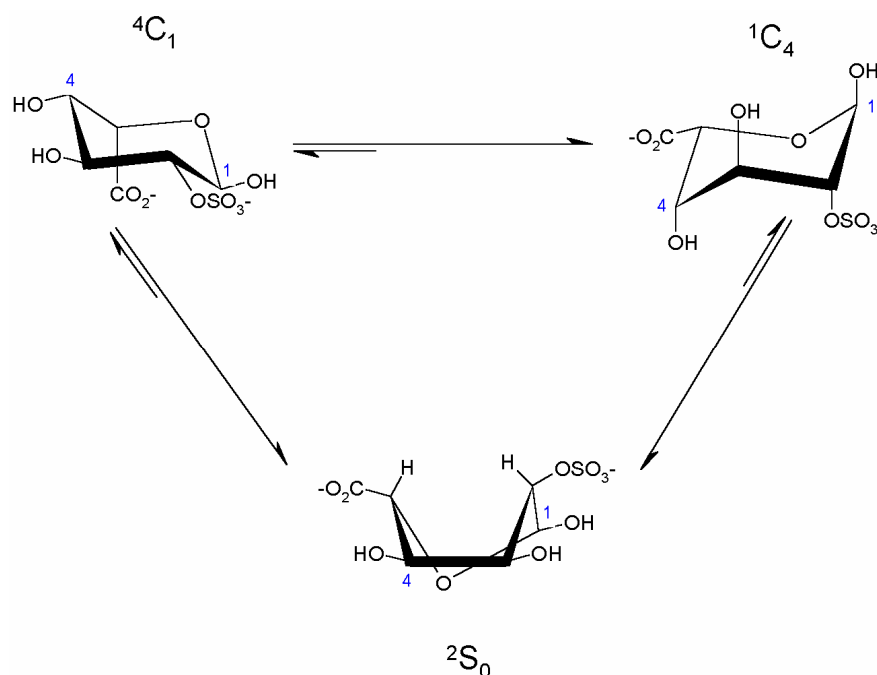


Figura 11: Perfil conformacional do resíduo IdoA em solução aquosa, em equilíbrio entre as conformações  ${}^2S_0$  (bote-torcido),  ${}^1C_4$  (cadeira) e  ${}^4C_1$  (cadeira), sendo a conformação  ${}^2S_0$  predominante em solução.

A preferência do resíduo de IdoA em permanecer numa forma de bote-torcido já foi descrita tanto para moléculas de heparinas livres em solução (Cros *et al.*, 1997) quanto para heparinóides complexados à AT (Jin *et al.*, 1997), demonstrando que a forma  ${}^2S_0$  é reconhecida pela proteína-alvo. Tal singularidade conformacional é, provavelmente, devida à interação com o solvente. De fato, a correta reprodução da distribuição de confôrmeros de diedros exocíclicos de carboidratos apresentando ligações (1→6), utilizando simulações de dinâmica molecular (ver adiante), somente foi conseguida através da inclusão explícita de moléculas de água<sup>2</sup>, as quais parecem romper interações por ligação de hidrogênio intramoleculares (Kirschner & Woods, 2001). Especificamente com relação à conformação do anel, estudos sugerem que a conformação de açúcares em solução aquosa é determinada através da interferência da estrutura do solvente circundante (Uedaira *et al.*, 2001):

<sup>2</sup> A representação do solvente em simulações de DM (ver adiante) pode ser realizada tanto de forma explícita quanto implícita. A primeira se refere à presença física das moléculas de solvente propriamente ditas no sistema em estudo. Contudo, esta abordagem implica em enorme custo computacional, de forma que o solvente chega a representar mais de 70% de todo o tempo de máquina de uma simulação. Desta forma, métodos foram propostos de forma a representar, implicitamente, o efeito do solvente e, em consequência, permitir uma drástica redução do custo computacional (*e.g.* COSMO, ver metodologia). Considerando-se que um dos efeitos ocasionados pelos solventes é a modulação das interações eletrostáticas, a representação implícita de seus efeitos é usualmente alcançada através da modulação da constante dielétrica do meio (Leach, 2001).

conformações nas quais os grupos substituintes se encontram na posição equatorial seriam mais estáveis, uma vez que induziriam menor modificação na estrutura do solvente circundante. De forma oposta, conformações em que os grupos substituintes estejam na posição axial seriam menos estáveis por induzirem uma maior modificação na estrutura do solvente circundante. Neste contexto, a observação dos substituintes do resíduo IdoA (Figura 11) realmente sugere que os grupamentos exocíclicos estão mais próximos da posição equatorial na conformação de bote-torcido do que nas conformações de cadeira, justificando o perfil conformacional identificado em solução para este resíduo.

É importante destacar que os atributos moleculares necessários para as propriedades anticoagulantes de polissacarídeos, mediadas pela AT, ainda não estão completamente elucidadas. Por exemplo, as galactanas e fucanas, compostos baseados em unidades repetitivas (1→3) ligadas (Figura 12), apresentam unidades sacarídicas não relacionadas à composição da heparina (Figura 4). Contudo, ainda assim apresentam significativas propriedades anticoagulantes envolvendo serpinas plasmáticas (Pereira *et al.*, 2002).

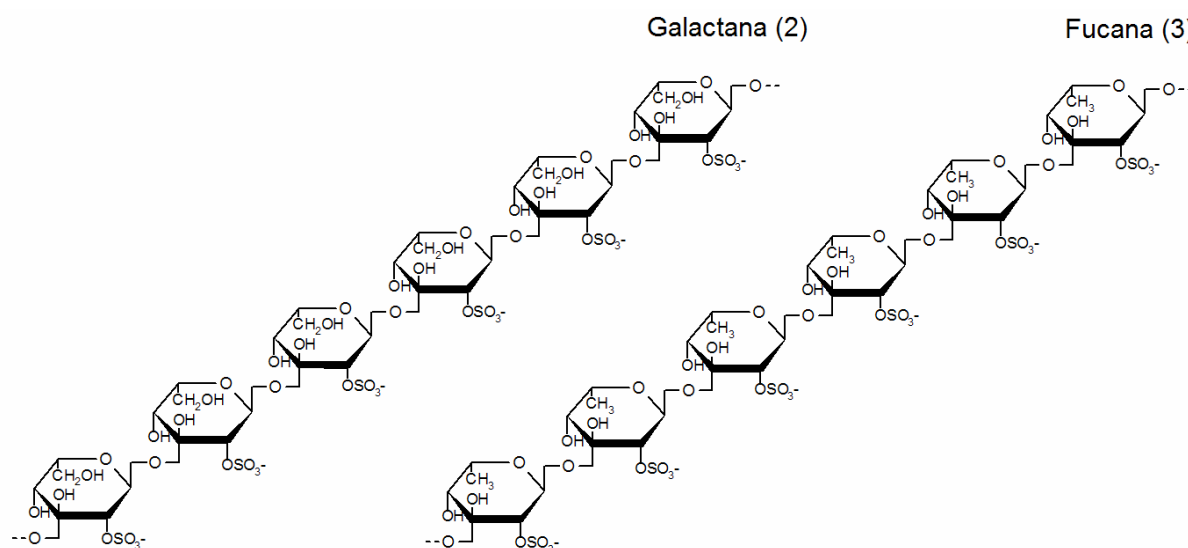


Figura 12: Representação de hexassacarídeos de galactana (2) e fucana (3) (Pereira *et al.*, 2002).

### **1.6 Desenvolvimento de inibidores sintéticos de fator Xa**

Um dos aspectos que mais dificultam o estudo molecular da heparina é justamente o fato de que sua obtenção se dá a partir de tecidos animais, originando uma preparação heterogênea composta por polissacarídeos de 5 a 30 kDa (Hirsh *et al.*, 1998). Desta forma, um dos primeiros passos no sentido de se esclarecer a relação entre a estrutura química da heparina e suas propriedades fisiológicas foi a síntese química de um pentassacarídeo de heparina (5) (Petitou *et al.*, 1986 e Tabela 3), proposto como a seqüência mínima capaz de se ligar à AT e, como conseqüência, apresentar propriedades anticoagulantes, marcadamente a inibição de fator Xa (Choay *et al.*, 1981a). Esta molécula difere da estrutura padrão da heparina (1) somente pela adição de um grupo sulfato na posição 3 do resíduo F de glicosamina (código de letras proposto por Choay *et al.*, 1981b) (Figura 13).

A partir de sua síntese, o composto (5) foi submetido a uma série de modificações sintéticas de forma a explorar o papel de diferentes grupamentos químicos na sua atividade anticoagulante (Figura 13). A primeira destas modificações correspondeu à troca da hidroxila anomérica (posição 1 da glicosamina, resíduo H) por uma metoxila, gerando o composto (6). Esta modificação permitiu a duplicação do rendimento da reação, protegendo a molécula de reações intramoleculares com grupos amino observadas previamente na última etapa da síntese de (5) (Petitou *et al.*, 1987). A avaliação da sua atividade antifator Xa *in vitro*, assim como de sua atividade antitrombótica em modelos animais, permitiu observar que esta modificação não alterou o perfil de atividade deste composto (van Boeckel *et al.*, 1988 e Tabela 3).

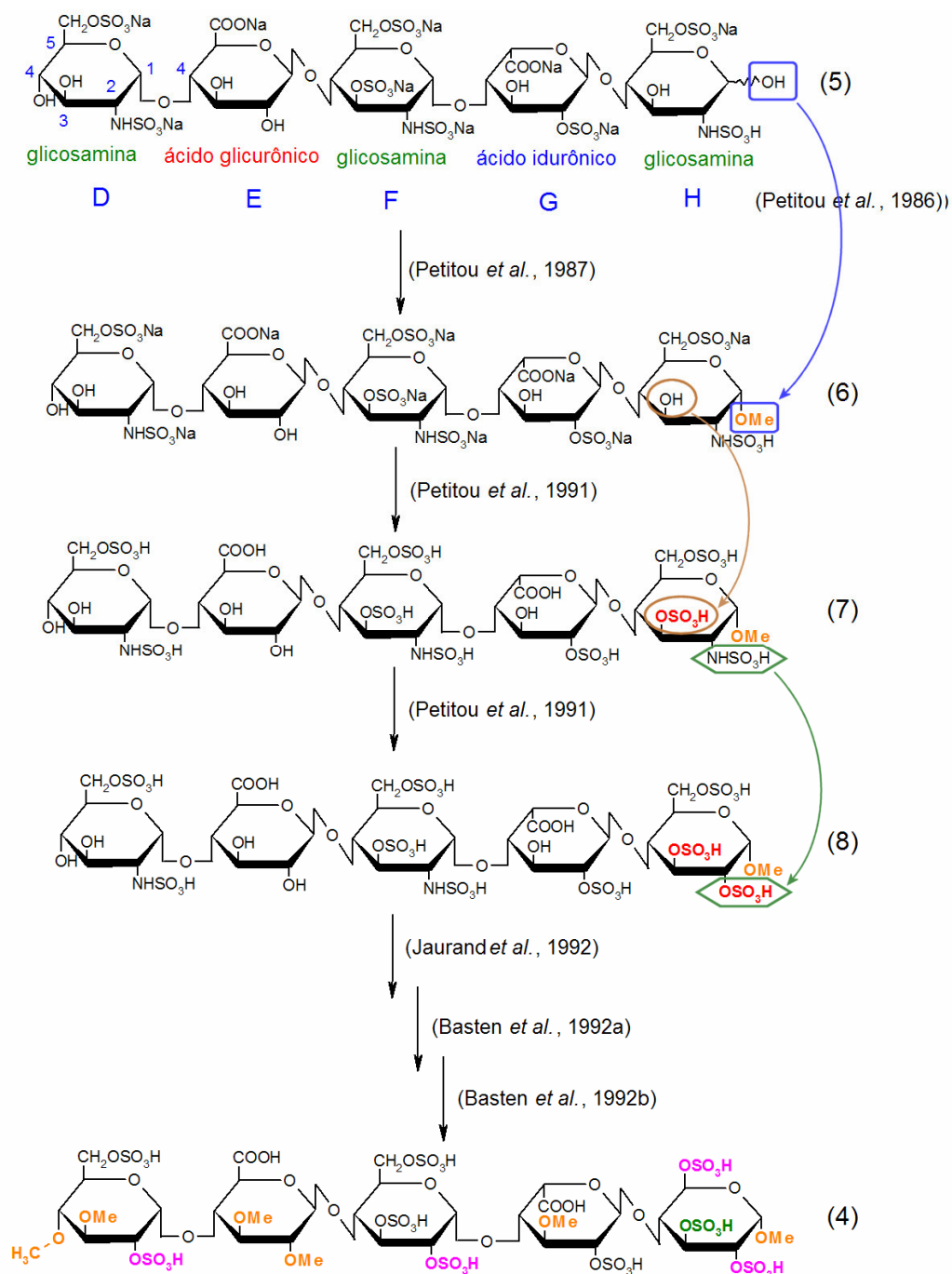


Figura 13: Esquema apresentando as etapas do planejamento do pentassacarídeo sintético (4). As setas em azul, marrom e vermelho destacam as principais modificações realizadas sobre (5): metilação da hidroxila anomérica, adição de grupo sulfato e substituição da sulfonamida por sulfato.

Tabela 3: Atividade anticoagulante<sup>a</sup> de derivados sintéticos da heparina (4-8)

Composto	Atividade (U/mg)
4 <sup>b</sup>	1323
5 <sup>c</sup>	590
6 <sup>c</sup>	740
7 <sup>c</sup>	1270
8 <sup>d</sup>	1300

<sup>a</sup> Atividade amidolítica em plasma utilizando o substrato cromogênico S2222 (Teien *et al.*, 1976);

<sup>b</sup> Dados obtidos de Basten *et al.*, 1992b;

<sup>c</sup> Dados obtidos de van Boeckel *et al.*, 1988;

<sup>d</sup> Dados obtidos de Petitou *et al.*, 1991.

As etapas seguintes de modificações estruturais, baseadas em (6), localizaram-se na glicosamina H. A reação de síntese de (5) descrita (Petitou *et al.*, 1986) utilizava grupos protetores distintos para inserir, nas posições adequadas, grupos sulfato e sulfonamida. Este acréscimo de complexidade não é desejável no contexto do desenvolvimento de um protótipo de fármaco, onde grandes quantidades da molécula em estudo serão necessárias. Sendo assim, os autores decidiram pela substituição do resíduo glicosamina *N*-sulfato-6-*O*-sulfato (posição H) pelo resíduo glicose 2,3,6-tri-*O*-sulfato (Petitou *et al.*, 1991), baseando-se nas seguintes premissas:

- Trabalhos prévios indicaram altas densidades de carga negativa nesta região da molécula serial requeridas para a atividade biológica (Petitou *et al.*, 1988);
- A síntese do resíduo sulfatado na posição 3 seria em princípio mais simples do que a síntese do resíduo não sulfatado nesta posição;
- O composto (7) já havia sido descrito por outro grupo (van Boeckel *et al.*, 1988), demonstrando potente atividade antifator Xa.

Como resultado o composto (7), tri-sulfatado no resíduo H, apresentou um aumento expressivo na sua atividade inibidora de fator Xa (van Boeckel *et al.*, 1988

e Tabela 3), corroborando a hipótese de que o aumento na densidade de carga negativa nesta região da molécula contribuiria para a atividade biológica destes derivados sintéticos (Petitou *et al.*, 1988). Da mesma forma, a substituição do grupo sulfonamida pelo grupo sulfato não acarretou mudanças na atividade (Petitou *et al.*, 1991 e Tabela 3), sugerindo que ambos os grupos podem ser intercambiáveis na estrutura de heparinóides sintéticos sem prejuízo para as propriedades anticoagulantes dos compostos (*i.e.* bioisosterismo). Ao mesmo tempo, as modificações sintéticas realizadas nos compostos (7-8) induziram um deslocamento no equilíbrio conformacional do resíduo IdoA. Trabalhos anteriores demonstraram a preferência conformacional do resíduo IdoA pela conformação  ${}^2S_O$  em mono- e oligossacarídeos de heparina (Ferro *et al.*, 1986), indicando que 94% dos resíduos em solução estariam na forma de bote-torcido ( ${}^2S_O$ ), enquanto a forma de cadeira estaria presente nos 6% restantes. Enquanto 60% do IdoA está na forma  ${}^2S_O$  no composto (6), nos compostos (7-8) esta população é deslocada para perto de 100% (van Boeckel *et al.*, 1988), sugerindo que as mudanças realizadas de (5) a (8) não modificaram as propriedades conformacionais e biológicas dos ligantes (Tabela 3).

Há época destes estudos já se postulava que a conformação de bote-torcido seria importante para as propriedades anticoagulantes da heparina, como um requerimento estrutural necessário à complementaridade com seu receptor-alvo, a AT. Em conseqüência, seria também uma propriedade desejada nos derivados sintéticos da heparina de forma a melhor reproduzir as propriedades farmacológicas deste anticoagulante de origem animal. Contudo, a confirmação cristalográfica de que esta conformação estaria de fato presente no complexo com a AT somente surgiu 10 anos mais tarde (Jin *et al.*, 1997).

Baseando-se nos resultados positivos obtidos com a síntese de (6) e (8), as etapas finais do desenvolvimento do composto (4) envolveram a substituição progressiva dos grupos hidroxila por grupos metoxila e dos grupos sulfonamida por grupos sulfato, descrita em uma série de 3 trabalhos (Jaurand *et al.*, 1992, Basten *et al.*, 1992a; Basten *et al.*, 1992b). A molécula final (4) apresenta potente atividade anticoagulante (Tabela 3)  $K_d = 48 \pm 11 \text{ nM}$  (Herbert *et al.*, 1998), mantém a presença da conformação  ${}^2S_O$  como mais populosa para o IdoA e sugere que os grupos hidroxila da heparina não estão envolvidos em interações importantes com a proteína-alvo. Ao contrário, a forma do esqueleto sacarídico teria o papel de posicionar os grupos sulfato e carboxilato em posições que permitissem interações



otimizadas com a proteína-alvo (Basten *et al.*, 1992b). Curiosamente, em outros polissacarídeos anticoagulantes, *e.g.* galactana e fucana (Figura 12), a presença de grupos hidroxila é fundamental para a atividade anticoagulante mediada pela AT (Pereira *et al.*, 2002).

O desenvolvimento clínico do pentassacarídeo sintético (4), denominado fondaparinux (Arixtra<sup>TM</sup>), foi gerenciado pela empresa Sanofi-Synthélabo, tendo sido aprovado para comercialização nos EUA pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 2002 (Cheng, 2002). Contudo, embora este fármaco represente um significativo avanço em relação a alguns aspectos do tratamento convencional de hipercoagulopatias, algumas lacunas importantes permanecem em aberto no tratamento utilizando o fondaparinux (Walenga *et al.*, 2003), o que reforça a necessidade do desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes, mais eficientes e com menos efeitos colaterais:

a) Vantagens:

- Origem sintética;
- Sem partículas virais ou outros contaminantes animais;
- Estrutura molecular definida, pura e homogênea;
- Meia-vida relativamente elevada;
- Alta biodisponibilidade;
- Relação dose-efeito previsível;
- Não interage com PF4;
- Não apresenta relação-cruzada com o anticorpo anti-heparina;
- Até o momento não demonstrou capacidade de induzir trombocitopenia.

b) Desvantagens:

- Risco de hemorragias maior que o predito em modelos animais;
- Interações farmacológicas;
- Acúmulo do fármaco em pacientes com disfunção renal;
- Meia-vida elevada;
- Ausência de inibição de trombina;
- Preço;
- Sem antídoto contra hemorragia;
- Ausência de indução da liberação de TFPI;

- Ensaios tradicionais para monitoramento da heparina não podem ser utilizados

Neste contexto, o desenvolvimento de compostos não-poliméricos e não-sacarídicos, capazes de potencializar a ação inibitória da AT sobre fator Xa (Figura 14, Gunnarsson & Desai, 2002) ilustra a potencialidade no desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes, não-relacionados estruturalmente a heparina, mas capazes de produzir seus efeitos na hemostasia.

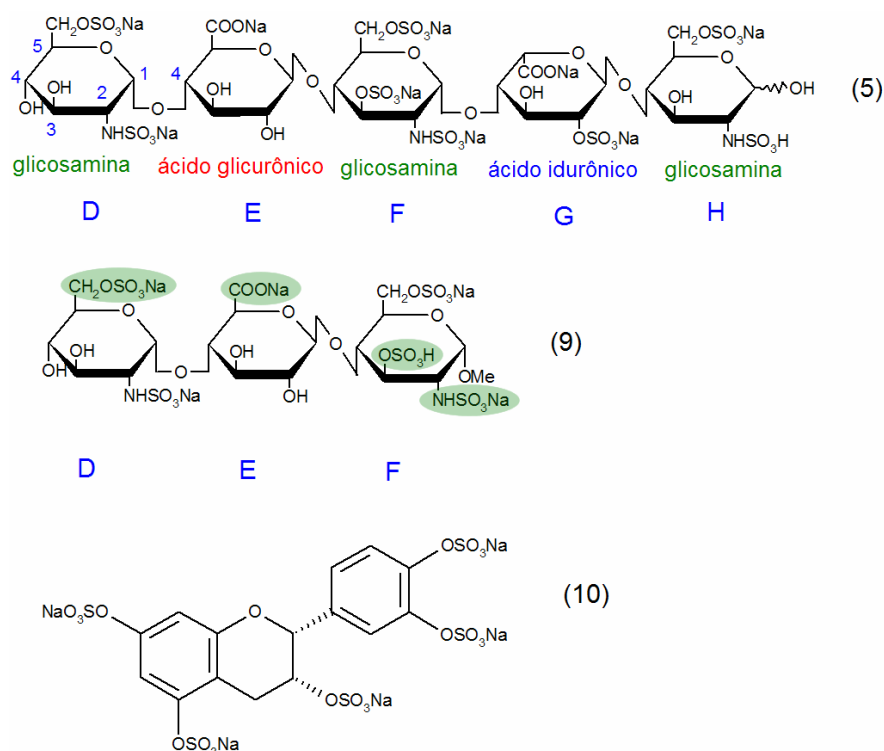


Figura 14: Estrutura dos oligossacarídeos ativadores de AT, (5) e (9), e do composto não sacarídico (10). Os grupos marcados com elipses verdes no composto (9) representam os farmacóforos (*i.e.* grupos mais importantes para a interação fármaco-receptor) utilizados para o planejamento de (10) (Gunnarsson & Desai, 2002).

### 1.7 A dinâmica molecular (DM) como ferramenta computacional para o estudo das propriedades de biomoléculas

O uso de simulações de dinâmica molecular (DM) para descrever sistemas protéicos iniciou-se há aproximadamente 25 anos, estando hoje amplamente difundido como uma ferramenta para investigar a estrutura e dinâmica de biomoléculas (macro ou micromoléculas), desde estudos de ligação de compostos

às suas proteínas-alvo e mecanismos de reação até a desnaturação e o renovelamento (*re-folding*) de proteínas (Ponder & Case, 2003).

A DM caracteriza-se pela integração da equação do movimento de Newton (1), 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 consequência, na mudança de sua posição num intervalo de tempo  $\Delta t$  relativo à aceleração.

$$\frac{d^2r_i(t)}{dt^2} = m_i^{-1} \cdot F_i \quad (1)$$

Desta forma, se uma sucessão de intervalos  $\Delta t$  for avaliada em sucessão, ter-se-á como resultado de um cálculo de dinâmica molecular uma sucessão de coordenadas tridimensionais para um dado conjunto de átomos, as quais podem representar tanto a difusão de gases quanto as mudanças na conformação de biomoléculas em solução aquosa. Estes intervalos de tempo  $\Delta t$  são denominados *tempo de integração*, e geralmente correspondem a pequenos passos que podem variar de 1 a 10 fs (Leach, 2001). O papel do tempo de integração pode ser ilustrado na Figura 15, onde três simulações de um mesmo sistema são representadas, modificando-se somente o tempo de integração ( $\Delta t$ ). Valores de  $\Delta t$  muito pequenos (Figura 15A) produzem uma reduzida descrição conformacional do sistema, enquanto que valores muito grandes para  $\Delta t$  produzem instabilidades na simulação (Figura 15B). Valores intermediários, geralmente de 2fs, permitem uma descrição eficiente do sistema em estudo (Figura 15C).

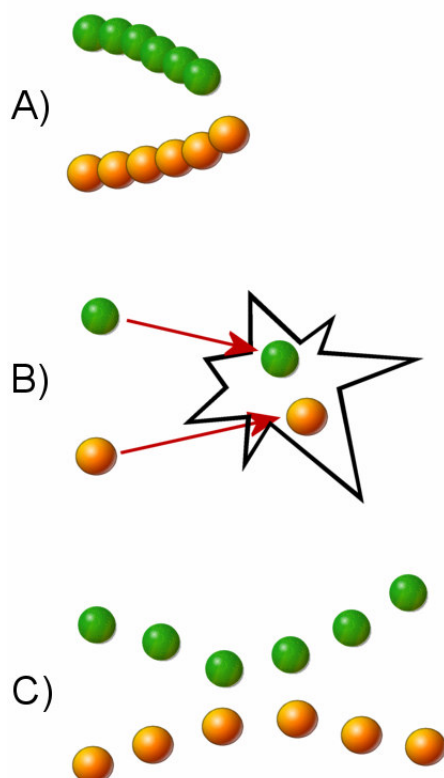


Figura 15: Representação do efeito de diferentes tempos de integração nas simulações de dinâmica molecular. A) pequena descrição das propriedades do sistema em função de tempo de integração muito reduzido; B) instabilidades na simulação como fruto de tempos de integração muito elevados; C) descrição adequada e estável das propriedades moleculares de interesse a partir de valores corretos para o tempo de integração. Adaptado de Leach, 2001.

A partir da equação 1, contudo, não é possível a determinação da intensidade e direção da força  $F_i$  sobre os átomos do sistema e da sua dependência nas características químicas de cada molécula em estudo. Desta forma, a solução da equação 2 faz parte do cálculo de dinâmica molecular, representando a força  $F_i$  como uma função da energia potencial do sistema  $V$  e das coordenadas atômicas  $r_i$  (Leach, 2001). Esta superfície de energia potencial representa a energia de cada molécula, sendo descrita pelo denominado *Campo de Força*.

$$F_i = \frac{-\partial V(r_i, \dots, r_n)}{\partial r_i} \quad (2)$$

O campo de força pode ser definido como um conjunto de funções e parametrizações usadas em cálculos de mecânica molecular (de Sant'Anna, 2002).

Estas funções (Figura 16) 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 (aquela caracterizada pelos valores-padrão de comprimentos e de ângulos de ligação). Alguns campos de força podem conter termos de interação entre átomos não ligados, de efeitos eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de outros efeitos estruturais.

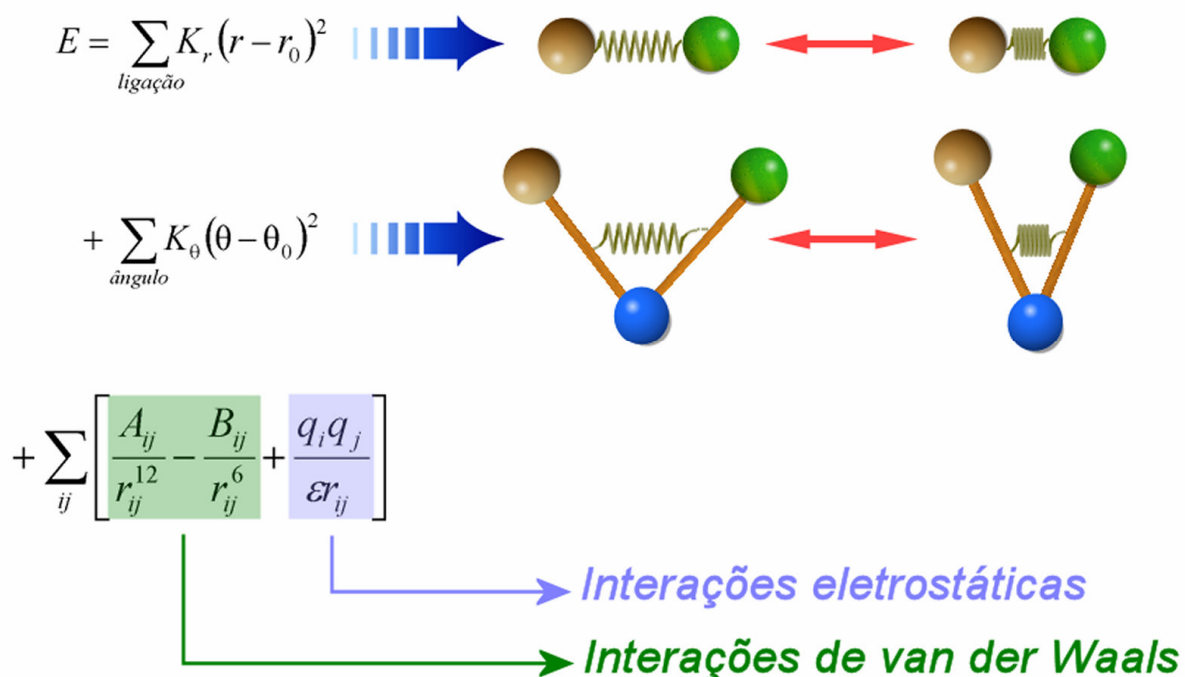


Figura 16: Funções de energia que compõe campos de força. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem o estiramento de ligações químicas, ângulos de ligação e interações intermoleculares (van der Waals e eletrostáticas/Coulômbicas).

Diversos campos de força estão disponíveis, alguns implementados em programas homônimos, para simulações de DM envolvendo, principalmente, proteínas. Dentre estes alguns dos principais incluem: CVFF (Kitson & Hagler, 1988), DISCOVER (Maple *et al.*, 1998), ENCAD (Dagget & Levitt, 1993 e Levitt *et al.*, 1995), GROMOS87 (van Gunsteren & Berendsen, 1987), GROMOS96 (Scott *et al.*, 1999), MM3 (Lii *et al.*, 1991), MM4 (Langley & Allinger, 2002), MMFF (Halgren, 1996a,b,c,d,e), TRIPOS (Clark *et al.*, 1989), OPLS (Jorgensen & Swenson, 1985), CHARMM (Brooks *et al.*, 1983) e Amber ff94 (Cornell *et al.*, 1995). O campo de força

GROMACS, incluído no pacote homônimo, é derivado diretamente do GROMOS87 (van der Spoel *et al.*, 2002). Vários destes campos de força apresentam diversas variações e/ou modificações, tendo sido apresentadas somente as referências principais de cada um. Uma revisão recente abordando em detalhes alguns destes campos de força pode ser encontrada em Ponder e Case, 2003.

Os dados podem ser obtidos de uma simulação de DM usualmente são apresentados através da média da trajetória, que por sua vez precisa ser longa o suficiente para produzir uma amostragem representativa do estado do sistema molecular em estudo (van Gunsteren & Berendsen, 1990). As propriedades deste sistema molecular são definidas, portanto, como médias desta amostragem no espaço conformacional simulado.

A confiabilidade das predições em dinâmica molecular depende, basicamente, de dois fatores: acurácia do campo de força utilizado e busca do espaço conformacional realizada durante a simulação suficientemente ampla para descrever as conformações do sistema (van Gunsteren & Mark, 1998). De modo geral, o teste final do modelo teórico produzido reside na sua comparação com propriedades experimentais traduzindo, por exemplo, a afinidade receptor-ligante (van Gunsteren & Berendsen, 1990). Em outras palavras, a acurácia do método é julgada a partir da observação ou constatação, nas simulações realizadas, de quão precisas são reproduzidas quantidades conhecidas (Karplus & Petsko, 1990).

O uso de campos de força de mecânica molecular para descrever a estrutura tridimensional de carboidratos apresenta uma série de dificuldades em função, principalmente, da ausência de parâmetros para esta classe de substâncias. A presença de diversos grupos altamente polares, flexibilidade e as diferenças nas propriedades eletrônicas que podem ocorrer durante modificações conformacionais e configuracionais, tais como efeitos anomérico, exo-anomérico e gauche dificultam a parametrização de campos de força para estes compostos, tornando-os difíceis de modelar (Pérez *et al.*, 1998).

A partir dos dados apresentados na Tabela 2 e na Figura 10 pode-se identificar parte da multiplicidade de conformações de anéis de 6 membros, além da semelhança estrutural entre as mesmas. Em função desta variabilidade conformacional, a determinação de cada uma das conformações adotadas por carboidratos é tarefa bastante complexa e influenciada pela metodologia de estudo escolhida, *e.g.* constantes de acoplamento ou deslocamentos químicos (Tvaroska *et*

*al.*, 1989) oriundos de experimentos de RMN ou estudos de mecânica molecular (Mikhailov *et al.*, 1997). O uso de dados de RMN normalmente apresenta problemas associados à baixa precisão (Mikhailov *et al.*, 1997), usualmente limitada entre 2 e 3 Å para a determinação de estruturas 3D (Markley *et al.*, 2003), enquanto que diversas das conformações observadas na Figura 10 apresentam diferenças menores que 1 Å (ver adiante). Em contrapartida, o uso de ferramentas de modelagem molecular para a obtenção de geometrias, obtidas através de cálculos de energia por mecânica molecular, deve ser analisado cuidadosamente. Estas energias dependem da parametrização do campo de força, que pode não apresentar funções adequadas para a descrição das conformações em estudo e, em consequência, produzirá conformações incorretas (Mikhailov *et al.*, 1997). Métodos híbridos, como cálculos de minimização de energia utilizando restrições de distâncias intramoleculares/conformacionais obtidas a partir de experimentos de RMN, também não estão livres de problemas, tendo sido reportado que este tipo de abordagem pode resultar em “confôrmeros virtuais” (Cumming & Carver, 1987), conformações moleculares que não estão no mínimo global de energia.

Particularmente no contexto da simulação de heparinas, podem ser exemplificadas as propriedades conformacionais do resíduo de ácido idurônico, o qual apresenta interconversão espontânea da conformação  ${}^1C_4$  (cadeira) do anel de 6 membros para a conformação  ${}^2S_0$  (*skew-boat*, Ferro *et al.*, 1986), de forma que a maior simulação realizada de compostos heparinóides até o momento corresponde a 600ps de um hexassacarídeo em aproximadamente 600 moléculas de água (Mikhailov *et al.*, 1997).

## 2 Objetivos

Desta forma, o presente trabalho se insere no contexto do estudo das razões moleculares para os diferentes comportamentos das HBPMs frente aos complexos AT-fIIa e AT-fXa. Tendo-se em vista a carência de informações estruturais e dinâmicas acerca da interação entre glicosaminoglicanos com proteínas da cascata de coagulação, o objetivo da presente tese é o estudo do reconhecimento molecular da heparina pela AT através de simulações de dinâmica molecular. A partir desta orientação geral, as seguintes metas foram estabelecidas, baseadas principalmente em simulações de DM em solução aquosa:

- Viabilizar a descrição computacional das propriedades conformacionais da heparina;
- Análise do comportamento conformacional da AT;
- Análise do comportamento conformacional do complexo AT-heparina;
- Identificação e quantificação das interações-chave no complexo AT-heparina;
- Análise, em nível atômico, do processo de ativação da AT pela heparina.

A execução das metas estabelecidas reforçará o uso da DM como ferramenta ágil no estudo de polissacarídeos, seja em solução seja complexados à suas proteínas-alvo, e para o detalhamento do mecanismo de ação da heparina e seus derivados em nível molecular. Auxiliará, portanto, na identificação dos requisitos conformacionais e estruturais mínimos, necessários a novos compostos bioativos, candidatos a agentes anticoagulantes e antitrombóticos.



## 3 Metodologia

### 3.1 Programas utilizados

Diversas metodologias de modelagem molecular foram utilizadas no presente trabalho, incluindo MM, DM, modelagem por homologia, métodos semi-empíricos e métodos *ab initio*. Os protocolos referentes a cada um destes métodos estão descritos em detalhes adiante.

Os programas utilizados no presente trabalho incluem:

- Ferramentas de visualização de moléculas: VMD (Humphrey *et al.*, 1996), MolMol (Koradi *et al.*, 1996) e Molden (Schaffenaar, 1997);
- Programas para cálculo semi-empírico: MOPAC 6.00 (Stewart, 1990) e BioMedCACHe 5.0 (Fujitsu, 2001);
- Programa para cálculo *ab initio*: GAMESS (Schmidt *et al.*, 1993);
- Programa para simulações de dinâmica molecular: GROMACS (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2002);
- Programa para geração de topologias: PRODRG (van Aalten *et al.*, 1996);
- Programa para manipulação e mutação das seqüências polipeptídicas: Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997)
- Programa para análise de interações intermoleculares: LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995);
- Programas para análise de estrutura secundária DSSP (Kabsch & Sander, 1983) e PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

### 3.2 Cálculos utilizando métodos semi-empíricos

A estratégia geral de minimização de energia utilizando métodos semi-empíricos foi descrita previamente (Peçanha *et al.*, 2002). Os cálculos utilizaram os métodos semi-empíricos AM1 e PM5 (uma evolução do método PM3), tanto na fase gasosa quanto em modelos implícitos de solvente. Cada geometria foi submetida à minimização de energia até que a norma do gradiente fosse igual ou inferior a 0,001. Em seguida estas conformações foram submetidas à análise da matriz Hessiana de forma a caracterizá-las como mínimos de energia verdadeiros da superfície de energia potencial molecular.

Utilizamos como modelo de solvente implícito o método COSMO (*conductor-like screening model*). Este método representa o solvente através de sua constante dielétrica, definindo um meio dielétrico ao redor da molécula em estudo distinto do vácuo (que, por definição, apresenta constante dielétrica  $\epsilon=1$ ). Assim sendo, a permissividade relativa do metanol foi utilizada, e o modelo incorporou 30 segmentos por átomo, ajustando os parâmetros NPPA e NSPA para, respectivamente, 1082 e 42.

### 3.3 Cálculos utilizando métodos *ab initio*

O uso de métodos semi-empíricos para descrever as propriedades eletrônicas de compostos contendo grupamentos hipervalentes (*e.g.* sulfato e fosfato) é desaconselhável pela participação, em tais grupos, do orbital *d* (hibridização  $sp^3d^2$ ). Isto se justifica pela ausência de parâmetros para descrever as propriedades associadas a tais orbitais por parte dos métodos semi-empíricos convencionais (Clare e Supuran, 1998). Considerando-se que a heparina é um glicosaminoglicano polissulfatado, tornou-se necessário o uso de métodos complementares capazes de descrever as propriedades de tais compostos. Desta forma, os métodos *ab initio* foram escolhidos.

Tendo-se em vista o elevado custo computacional associado aos métodos *ab initio*, houve a necessidade de reduzir a estrutura da heparina a suas unidades formadoras, *i.e.* ácido idurônico (IdoA), ácido glicurônico (GlcA) e glicosamina (GlcN) (Figura 17). Cada um destes resíduos foi então construído utilizando o programa Molden (Schaffenaar, 1997), em suas formas carregadas, e posteriormente submetidos à minimização de energia utilizando a base 3-21G do programa GAMESS (Schmidt *et al.*, 1993). As conformações de mínimo de energia obtidas foram então utilizadas para cálculos *single point* na base 6-31G\*\*, de forma a gerar cargas atômicas pelas abordagens de Mulliken e Löwdin. A ligação glicosídica foi estudada através da simulação de um dissacarídeo não sulfatado, tendo-se em vista que o número de elétrons associado ao grupo sulfato acrescenta considerável custo computacional aos cálculos *ab initio* e, ao mesmo tempo, tem pouca influência nas propriedades eletrônicas da ligação glicosídica.



Figura 17: Estrutura do ácido idurônico, ácido glicurônico e glicosamina, unidades sacarídicas que compõe a heparina.

### 3.4 Simulações de DM

#### 3.4.1 Protocolo de simulação

O protocolo geral de simulação foi previamente descrito (de Groot & Grubmüller, 2001). Todas as simulações foram realizadas à temperatura ambiente (298K), terão duração variável de acordo com o sistema em estudo (de 2,0 a 8,0 ns). Cada molécula (proteína ou polissacarídeo) foi solvatada numa caixa retangular utilizando condições periódicas de contorno e os modelos de água SPC (Berendsen *et al.*, 1981) e SPC/E (Berendsen *et al.*, 1987). Contra-íons (cloreto ou sódio) foram adicionados de forma a neutralizar as cargas dos sistemas.

Cada conjunto de soluto (proteína, polissacarídeo ou ambos, complexados) + água + íons foi então submetido à minimização de energia por aproximadamente 10.000 passos utilizando o algoritmo Steepest Descents. A estrutura minimizada obtida foi então utilizada como ponto de partida para simulações de DM. Os métodos Lincs e Settle (Hess *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 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)<sup>3,4</sup>. A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento da 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). A constante dielétrica do meio foi tratada como  $\epsilon = 1$ .

<sup>3</sup> Métodos alternativos para o cálculo das interações não-ligadas, tais como o *Reaction Field* (Campo de reação), foram também testados. Contudo, foi identificada uma elevada sensibilidade deste método às propriedades eletrostáticas do sistema: a presença de número elevado de cargas induzia o aparecimento de artefatos e instabilidades nas simulações realizadas. Tendo em vista que a heparina é um polissacarídeo polissulfatado, mantivemos o método PME em todas as simulações realizadas.

<sup>4</sup> rlist = rcoulomb = rvdw = 0,9 Å

A primeira etapa de uma simulação de dinâmica molecular envolve o aquecimento gradativo do sistema, sendo por isso denominada *termalização*. Esta etapa tem por objetivo uniformizar as energias contidas na estrutura cristalográfica e, desta forma, evitar deformação na proteína. Cada sistema foi então aquecido lentamente de 50K a 310K, em passos durando 5ps. Cada passo aumenta a temperatura em 50K, totalizando 6 passos em 30ps (Figura 18). Após a termalização do sistema, a simulação prossegue na temperatura de equilíbrio desejada, *i.e.* 310K, pelo tempo estipulado (de 2,0ns a 8,0ns).

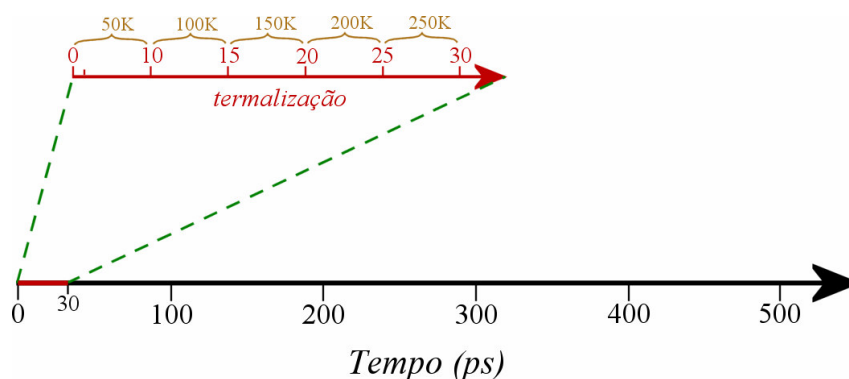


Figura 18: Esquema das etapas que compõe as simulações de DM a 310K. De 0ps a 30ps, uma série de etapas, de 5ps cada, aquece lentamente o sistema em incrementos de 50K. Após 30ps, o sistema está a 310K e se mantém nesta temperatura pelo resto da simulação.

### 3.4.2 Construção de topologias

O campo de força GROMACS apresenta um conjunto de parâmetros aplicáveis a um pequeno número de moléculas e estruturas químicas, principalmente aminoácidos, íons, água e alguns lipídeos. Com relação a açúcares, estão incluídos parâmetros somente para poucos monossacarídeos simples, tais como glicose e galactose. De fato, a parametrização de campos de força de mecânica molecular para simulações carboidrato e, principalmente, de polissacarídeos é um desafio em grande parte ainda não superado (Pérez *et al.*, 1998). Desta forma, no sentido de viabilizar a simulação da heparina e compostos similares foi utilizada uma ferramenta de construção de topologias denominada PRODRG (van Aalten *et al.*, 1996). A topologia é um arquivo contendo todos os parâmetros que descrevem as propriedades atômicas de uma determinada estrutura química, complementando os parâmetros já inclusos no programa em uso, *i.e.*

descrição da força e tipo de cada ligação química, ângulo e diedro, assim como os parâmetros de van der Waals e cargas atômicas.

O PRODRG é um servidor que funciona na World Wide Web<sup>5</sup>, exigindo somente o arquivo PDB com a estrutura da molécula de interesse. Gera como saída, dentre outros arquivos, um arquivo com a estrutura do composto no formato GROMACS, assim como o arquivo denominado de topologia, incluindo os parâmetros moleculares não-inclusos no campo de força supracitados.

Infelizmente, esta ferramenta *on-line* gera somente um conjunto de parâmetros iniciais, que necessitam de alguns refinamentos. Um dos refinamentos realizados refere-se à correção do comprimento da ligação S-N presente no resíduo GlcN para o valor descrito previamente por RMN (Mulloy *et al.*, 1993). Outros refinamentos utilizados incluem o cálculo das cargas atômicas (descrito no item 3.3) e o controle da conformação apresentada pelo resíduo IdoA (descrito no item 3.4.3).

### 3.4.3 Uso de diedros impróprios para fixar as conformações do resíduo IdoA

Como descrito anteriormente (Figura 11), o resíduo IdoA apresenta um incomum comportamento conformacional em solução, alternando entre as conformações <sup>2</sup>S<sub>0</sub> (bote torcido), <sup>1</sup>C<sub>4</sub> (cadeira) e <sup>4</sup>C<sub>1</sub> (cadeira). Considerando-se que a descrição e tal equilíbrio através de campos de força de mecânica molecular é extremamente difícil, além de uma escala de tempo muitas vezes superior às possibilitadas pelos computadores disponíveis atualmente, ao invés de tentar descrever o equilíbrio de tais conformações em solução decidimos por uma abordagem alternativa, na qual cada conformação poderia ser descrita independentemente, de forma rígida. Assim, cada estágio deste equilíbrio seria observado individualmente.

Para tal foi utilizado o artifício denominado *diedro impróprio*. Ao contrário do diedro próprio, no qual 4 átomos estão conectados em uma seqüência linear permitindo a rotação ao redor de um eixo, no diedro impróprio os átomos estão conectados de forma a impedir que átomos modifiquem sua orientação no espaço, *i.e.* grupos planares se mantenham planares e centros quirais não invertam sua quiralidade (Figura 19) (van der Spoel *et al.*, 2001).

---

<sup>5</sup> <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.htm>

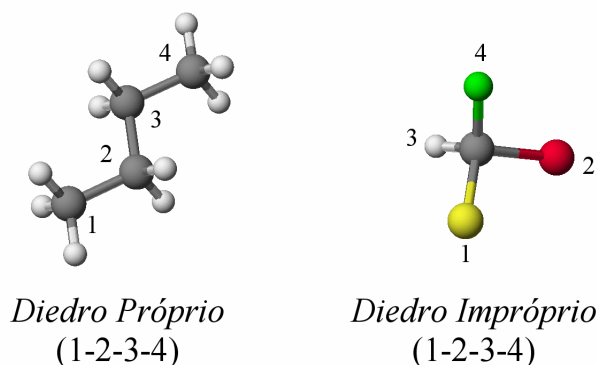
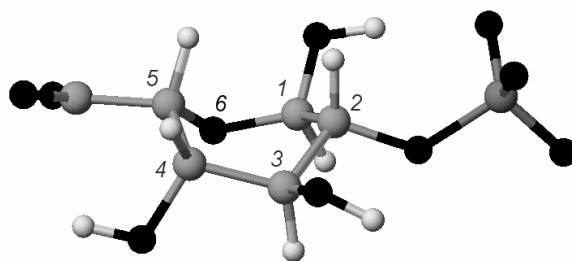


Figura 19: Esquema demonstrando a definição dos diedros próprios e impróprios. Embora a ordem dos átomos (numeração) possa ser a mesma, sua localização relativa no espaço não o é, ou seja, nos diedros próprios os 4 átomos estão conectados em série, um após o outro, o que não ocorre no diedro impróprio.

Desta forma, os estados conformacionais do resíduo IdoA ( ${}^2S_0$  e  ${}^1C_4$ ) foram definidos pela adição de diedros impróprios nos respectivos arquivos de topologia de cada confômero. Isto foi feito de forma que através da mudança do ângulo de diedro no arquivo de topologia fosse possível alterar a conformação do ácido idurônico (Tabela 4), permitindo um controle bastante ágil das características deste sacarídeo.

Tabela 4: Definição dos diedros impróprios utilizados para definir a conformação do resíduo IdoA.



Seqüência de átomos definindo o diedro	Ângulos (em graus)	
	${}^2S_0$	${}^1C_4$
5 – 2 – 4 – 1	30,5	2,0
5 – 2 – 3 – 1	45,0	-23,0
5 – 2 – 3 – 6	30,5	2,0

#### 3.4.4 Validação das simulações de DM

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

## 4 Resultados

### 4.1 *Preâmbulo*

Os resultados obtidos serão apresentados a seguir na forma dos trabalhos publicados durante a realização da presente Tese. Estes trabalhos estão citados abaixo, assim como uma breve descrição sobre cada um.

- Carmen L. Cardoso, Dulce Helena S. Silva, Daniela M. Tomazela, **Hugo Verli**, Maria Claudia M. Young, Maysa Furlan, Marcos N. Eberlin, Vanderlan da Silva Bolzani: Turbinatine, a Potential Key Intermediate in the Biosynthesis of Corynanthean-Type Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*; 1017-1021.

Este trabalho apresenta a aplicação de ferramentas de modelagem molecular no estudo conformacional da turbinatina, um alcalóide indólico isolado a partir de folhas da *Chimarris turbinata*.

- **Hugo Verli**, Jorge A. Guimarães: Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339*; 281-290.

Este trabalho apresenta a descrição do perfil conformacional de um decassacarídeo de heparina utilizando simulações de DM, aplicando-se um campo de força não-parametrizado para carboidratos (GROMACS).

- Camila F. Becker, Jorge A. Guimarães, **Hugo Verli**: Molecular dynamics and atomic charges calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2005**, *in press*.

Como uma continuação do trabalho anterior, este artigo apresenta a comparação do uso de diferentes esquemas de carga na simulação por DM da heparina, assim como refinamentos da conformação de RMN do resíduo IdoA.

- **Hugo Verli**, Jorge A. Guimarães: Insights into the induced fit mechanism in Antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Mod.*, **2005**, submetido.



Por fim, este trabalho apresenta o estudo por DM do complexo formado pela AT e pelo pentassacarídeo sintético, utilizado como modelo para estudo da heparina.

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

## 4.2 Trabalho I

Este trabalho descreve o isolamento e caracterização de um novo glicoalcalóide indólico monoterpênico, a turbinatina, a partir de folhas da *Chimarris turbinata*, árvore encontrada na América Central, ilhas do Caribe e floresta Amazônica. Através de análises de RMN 1D e 2D, a estrutura da turbinatina pôde ser inequivocamente identificada. Contudo, foram observadas constantes de acoplamento anômalas entre os átomos de hidrogênio nas posições 20 e 21, sugerindo que regiões da molécula estavam submetidas a condições de impedimento estérico e torção conformacional. Neste contexto, foram realizados estudos de modelagem molecular da turbinatina de forma a elucidar as razões moleculares para tal comportamento.

Os resultados obtidos com os métodos semi-empíricos AM1 e PM5 permitiram a identificação de uma conformação de mínimo de energia, aproximadamente 5 kcal/mol mais estável que as demais conformações identificadas para a turbinatina. Esta conformação apresenta uma torção em sua estrutura, a qual está de acordo com as elevadas constantes de acoplamento entre H-20 e H21. Tais resultados demonstram a capacidade da modelagem molecular em reproduzir, explicar e prever propriedades moleculares determinadas por métodos experimentais clássicos, tais como a ressonância magnética nuclear.

### **Turbinatine, a Potential Key Intermediate in the Biosynthesis of Corynanthean-Type Indole Alkaloids**

Carmen L. Cardoso, Dulce Helena S. Silva, Daniela M. Tomazela, **Hugo Verli**,  
Maria Claudia M. Young, Maysa Furlan, Marcos N. Eberlin, Vanderlan da Silva  
Bolzani

*Journal of Natural Products*, **2003**, 66; 1017-1021

## Turbinatine, a Potential Key Intermediate in the Biosynthesis of Corynanthean-Type Indole Alkaloids

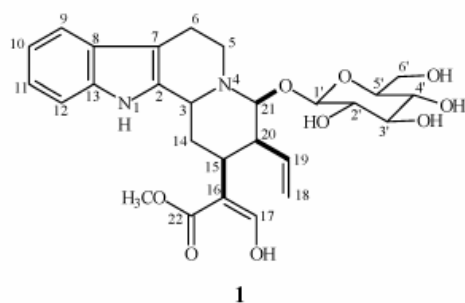
Carmen Lucia Cardoso,<sup>†</sup> Dulce Helena Siqueira Silva,<sup>†</sup> Daniela Maria Tomazela,<sup>‡</sup> Hugo Verli,<sup>§</sup> Maria Claudia Marx Young,<sup>‡</sup> Maysa Furlan,<sup>†</sup> Marcos Nogueira Eberlin,<sup>‡</sup> and Vanderlan da Silva Bolzani<sup>\*†</sup>

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, CP 355, CEP 14-801-970, Araraquara, São Paulo, Brazil, Thompson Mass Spectroscopy Laboratory, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, CEP 10051, São Paulo-SP, Brazil, and Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, CP 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Received November 25, 2002

Extraction of the leaves of *Chimarrhis turbinata* has led to the isolation of turbinatine (**1**), a new corynanthean-type indole alkaloid, besides four known indole alkaloids, strictosidine, 5 $\alpha$ -carboxystrictosidine, vallesiachotamine, and isovallesiachotamine. The structural determination of **1** was based on 1D and 2D spectroscopic data. An evaluation of the DNA-damaging activities of the isolates was performed by means of a bioassay using mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, which indicated these compounds were weakly active.

*Chimarrhis turbinata* (DC.) Prodr. (Rubiaceae) belongs to the subfamily Cinchonoideae and the tribe Condamineae.<sup>1,2</sup> This tree is distributed from Central America and the Caribbean Islands through tropical South America, especially in the Amazon region. Its light and resistant wood is used for making tools, including pawls, which is the reason for its popular name "pau-de-remo" in the Amazon.<sup>3</sup> The present work describes the first study on a plant in the genus *Chimarrhis*, which has resulted in the isolation and characterization of a new indole monoterpene glucoalkaloid, turbinatine (**1**), along with the known compounds strictosidine, 5 $\alpha$ -carboxystrictosidine, vallesiachotamine, and isovallesiachotamine. In addition, the potential chemotaxonomic significance of these alkaloids and evidence for turbinatine (**1**) as a key intermediate in the biosynthesis of corynanthean-type alkaloids are briefly discussed.



**1**

Five indole alkaloids were isolated from extracts of *Chimarrhis turbinata* leaves by liquid–liquid partition followed by Sephadex LH-20 and reversed-phase HPLC. The identification of the known alkaloids was based on their spectroscopic data, mainly 1D NMR, and comparison with literature data,<sup>4</sup> with the known compounds identified as strictosidine,<sup>5,6</sup> 5-carboxystrictosidine,<sup>7</sup> vallesiachota-

mine,<sup>8</sup> and isovallesiachotamine,<sup>8</sup> respectively. Turbinatine (**1**) was obtained as a stable yellow powder. The molecular formula C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> for **1** was assigned from the molecular ion at *m/z* [M + 2]<sup>+</sup> 532.3070 in the HREISMS, in combination with its <sup>13</sup>C NMR data. The <sup>13</sup>C NMR spectral data of compound **1** (Table 1) showed signals at  $\delta$  108.5, 111.7, 118.6, 120.0, 122.8, 127.2, 138.0, and 138.6, typical of a 2,3-disubstituted-indole system, which were assigned to C-7, C-12, C-9, C-10, C-11, C-8, C-2, and C-13, respectively. The signals at  $\delta$  52.6, 48.5, and 23.8 were attributed to C-3, C-5, and C-6, respectively, of a strictosidine-type compound. These assignments were based on comparison with literature data<sup>4–6</sup> as well as with the standard compound strictosidine, also isolated during this work. Signals at  $\delta$  34.4, 32.4, 45.0, and 97.0 were assigned to C-14, C-15, C-20, and C-21, respectively, of the D ring. The <sup>13</sup>C NMR spectrum also showed signals for a glucosyl moiety, which appeared at  $\delta$  71.3, 74.2, 77.5, and 78.0. Signals were also observed for the hydroxymethine carbons C-4', C-2', C-3', and C-5', respectively, and at  $\delta$  62.6 for the hydroxymethylene C-6' and at  $\delta$  100.0 for the anomeric C-1'. The remaining signals of the <sup>13</sup>C NMR spectrum were assigned to the *seco*-iridoid moiety of the alkaloid which comprised a terminal olefinic system attached to C-20 with signals at  $\delta$  119.2 (C-18) and 134.8 (C-19) and a  $\beta$ -hydroxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated carbomethoxy system attached to C-15 of the D ring. The signals in the latter unit appeared at  $\delta$  52.3, 108.1, 156.5, and 171.1 and were assigned to CH<sub>3</sub>O, C- $\alpha$ , C- $\beta$ , and the carbonyl, respectively. The <sup>1</sup>H NMR spectrum showed two doublets at  $\delta$  7.47 and  $\delta$  7.29 and two doublets of doublets at  $\delta$  7.03 and 7.11, attributed to the aromatic hydrogens H-9, H-12, H-10, and H-11, respectively. Correlations observed in the HOMOCOSY, NOESY, and TOCSY NMR spectra (Table 1) confirmed the structure of the indole moiety of compound **1**. The HOMOCOSY and TOCSY spectra also showed correlations of signals at  $\delta$  5.25, 5.37, and 5.85, which were then assigned to H-18<sub>cis</sub>, H-18<sub>trans</sub>, and H-19, respectively, on the basis of their chemical shifts and coupling constants (Table 1). Further analysis of the HOMOCOSY spectrum showed correlations of H-19 to the signal at  $\delta$  2.77 (H-20) and correlations of the latter to the signal at  $\delta$  3.10 (H-15) and to the doublet at  $\delta$  5.90, which was assigned to the

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: 55(16)2016660. Fax: 55(16)2227932. E-mail: bolzani@iq.unesp.br.

<sup>†</sup> Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

<sup>‡</sup> Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

<sup>§</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

<sup>‡</sup> Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica.

**Table 1.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Spectral Data for Turbinatine (**1**)<sup>a-c</sup>

position	$\delta_H$ (mult., $J$ (Hz))	$\delta_C$ (mult.)	HMBC	NOESY
2		138.0 s		
3	4.60 br d (13.0)	52.6 d		H-14 $\alpha$
5	3.42 m	48.5 t		H-6
	3.90 m			H-6; H-5
6	3.00 br t (12.2)	23.8 t		H-5a, H-5b
	3.26 m			
7		108.5 s		
8		127.2 s	H-10	
9	7.47 d (8.0)	118.6 d		H-10
10	7.03 dd (8.0, 8.0)	120.0 d	H-12	H-9; H-11
11	7.11 dd (8.0, 8.0)	122.8 d		H-12; H-10
12	7.29 d (8.0)	111.7 d		H-11
13		138.6 s	H-9	
14 $_{ax}$	2.40 br ddd (13.0, 11.5)	34.4 t		H-15; H-14 $_{eq}$
14 $_{eq}$	2.20 br dd (4.0, 11.5)			H-3; H-14 $_{ax}$
15	3.10 br ddd (4.0, 4.0, 13.0)	32.4 d	H-17	H-14 $_{ax}$ ; H-20
16		108.1 s	H-17	
17	7.80 s	156.5 d		
18 $_{cis}$	5.25 d (10.5)	119.2 t		H-18 $_{trans}$
18 $_{trans}$	5.37 d (18.0)			H-18 $_{cis}$
19	5.85 ddd (7.5; 10.5; 18.0)	134.8 d		H-18 $_{cis}$ ; H-18 $_{trans}$
20	2.77 br ddd (4.0, 7.5, 9.5)	45.0 d		H-15; H-21
21	5.90 d (9.5)	97.0 d		H-20
22		171.1 s	H-17; MeO-22	
OCH <sub>3</sub>	3.79 s	52.3 q		
1'	4.80 br d (8.0)	100.0 d		
2'	3.25 dd (9.0, 14.5)	74.2 d		
3'	3.40 m	77.5 d		H-6'a
4'	3.65 m	71.3 d		
5'	3.30 m	78.0 d		
6'	3.67 dd (7.0, 11.8)	62.6 t		H-3'; H-6'b
	4.01 dd (2.0, 11.8)			H-6'a

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H NMR assignments are based on 2D <sup>1</sup>H NMR and HMQC correlations. <sup>b</sup> Internal standard: TMS. <sup>c</sup> Measured in CD<sub>3</sub>OD at 500 MHz for <sup>1</sup>H and 125 MHz for <sup>13</sup>C, respectively.

aminohydroxymethine H-21 signal. Subsequent correlations of H-15 to signals at  $\delta$  2.20 and 2.40 (H-14 $_{eq}$  and H-14 $_{ax}$ ) and of H-14 to the broad doublet at  $\delta$  4.60 (H-3), as well as the correlations between signals at  $\delta$  3.26 (H-6) and 3.00 (H-6), led to the complete assignment of the aglycon aliphatic hydrogens of turbinatine (**1**). The TOCSY spectrum gave additional support to these assignments by showing correlations of signals of H-3, H-14, H-15, H-20, H-21, H-19, and H-18, and TOCSY-1D experiments allowed the assignments of the sugar moiety hydrogens (Table 1). The HMBC spectrum of **1** showed correlations from C-22 ( $\delta$  171.1) to the methoxyl group ( $\delta$  3.79) and to H-17 ( $\delta$  7.80). Additionally, correlations of C-15 ( $\delta$  32.4) and C-16 ( $\delta$  108.1) to H-17 confirmed the presence of the  $\beta$ -hydroxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated caboxymethoxy system, as well as its attachment to C-15. The relative configurations of the asymmetric centers C-3, C-15, C-20, and C-21 were established by coupling constant measurements and NOESY experiments as well as through comparison with <sup>13</sup>C NMR data of model compounds.<sup>9,10</sup>

Corynanthean-type indole alkaloids may be classified into the *normal*, *pseudo*, *allo*, or *epiallo* series depending on their C-3, C-15, and C-20 stereochemistry. The detailed analysis of coupling constants of H-3 with H-14 $_{ax}$ ; H-14 $_{ax}$  with H-15; H-15 with H-20; and H-20 with H-21 signals ( $J_{3,14ax} = 13.0$  Hz;  $J_{14ax,15} = 13.0$  Hz;  $J_{15,20} = 4.0$  Hz;  $J_{20,21} = 9.5$  Hz) for compound **1** suggested a stereochemical arrangement in which H-20 is *cis* to both H-15 and H-21,

and H-3 is *trans* to H-14 $_{ax}$  and *cis* to H-15. These observations defined the *allo* configuration of the stereocenters C-3, C-15, and C-20. Additional information on the relative stereochemistry at the asymmetric centers of **1** was obtained through analysis of the NOESY spectrum. In this spectrum, interactions observed between H-3 and H-14 $_{eq}$  as well as of H-15 with H-14 $_{eq}$  and H-20 confirmed that the orientations of these hydrogens are all in the same plane. These findings corroborated the positions of H-3, H-15, and H-20 as  $\alpha$ ,  $\alpha$ , and  $\alpha$ , indicative of an *allo* configuration for compound **1**. The 9.5 Hz value measured for the coupling constant ( $J$ ) between H-21 and H-20 is anomalous for this configuration, and the only explanation to support this constant value is a twist-boat conformation adopted by the D ring. Further analysis from a Karplus curve by H-20 and H-21 revealed a near 0° angle for these hydrogens (28° calcd by molecular modeling, Table 2), predicting a large value for the coupling constant. This is a plausible hypothesis due to the stereoelectronic effects from the nitrogen and the glucose at C-21 and the minimization of steric hindrance effects assumed by this conformation. This observation was confirmed by NOESY interactions. From these experiments a correlation between H<sub>2</sub>-18 ( $\delta$  5.25 and 5.37) and H-1' ( $\delta$  4.76) established a  $\beta$ -stereochemistry for the substituents at C-19 and C-21. In addition, a strong interaction of H-21 with H-20 confirmed the orientation of these hydrogens in the same face and corroborated the  $\beta$ -glycosidic linkage at C-21. An extensive analysis of the <sup>13</sup>C NMR data of the corynanthean-type alkaloids, especially for C-3, C-5, and C-6, has also been used for definition of their stereochemistry and inclusion in the *normal*, *pseudo*, *allo*, or *epiallo* series.<sup>9</sup> Analysis of the <sup>13</sup>C NMR data for C-3, C-5, and C-6 ( $\delta$  52.6, 48.5, and 23.8, respectively) and comparison with model compounds<sup>16</sup> strongly supported the *allo* configuration for turbinatine (**1**), if we consider the  $\gamma$ -effect of the glucosyl moiety at C-21 on C-3 and C-5, whose signals were shifted upfield ( $\Delta\delta \sim 5$  ppm).

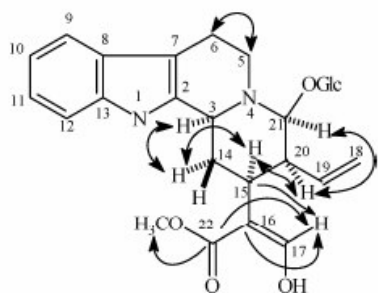
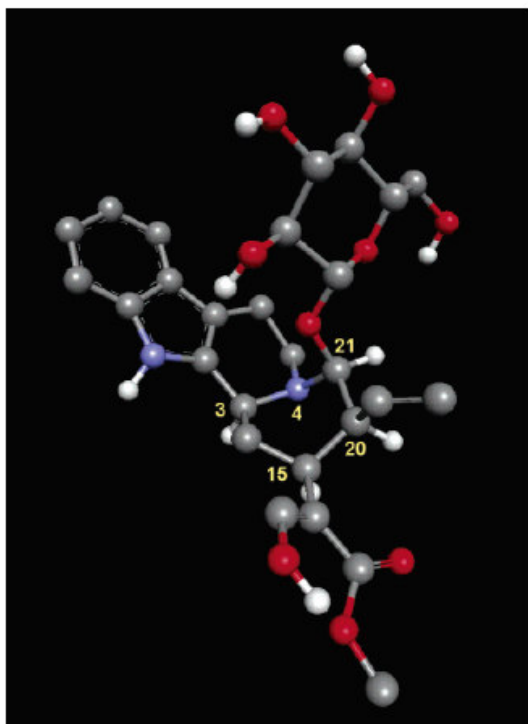
To elucidate the anomalous values of the  $J$ -coupling and the strong NOE effects between H-20 and H-21, compound **1** was subjected to theoretical study using semiempirical PM5 and AM1 methods at the SCF-MO level in the gas and solvent phases, with full geometry optimization,<sup>17</sup> as described previously.<sup>18</sup> A conformational analysis of **1** was performed with the BioMedCache 5.0 program.<sup>19</sup> From this analysis, three minimal energy conformations were obtained,<sup>20</sup> namely, **1a**, **1b**, and **1c**, and the heats of formation for each conformation are summarized in Table 2. Differences in conformational energy (Table 2) are due mainly to the conformations adopted by ring D, e.g., chair (**1b**) or twist-boat (**1a** and **1c**), and by N-4, i.e., the lone pair above or below the ring D plane due to pyramidal inversion. Variations in conformations of groups attached at C-15, C-20, and C-21 are limited because of steric hindrance. With the exception of calculations made with the AM1 Hamiltonian in vacuum, all the methods used showed correlated values reinforcing both the reliability of the results and the importance of simulating solvent effects in solute conformation and stability. The conformation **1a** is the most stable by  $\sim 5$  kcal/mol, with the closure of the dihedral angle H-21–C-21–C-20–H-20 being about 28° (Figure 2). This approximation of H-21 and H-20 to a plane and the torsion of ring D (consequences of compound **1** stabilization) are in agreement with the high  $J$ -coupling constant actually observed.

Strictosidine can be enzymatically transformed to give a variety of indole alkaloids. Such reactions usually involve

**Table 2.** Heats of Formation (kcal/mol) for the Conformations Obtained from Conformational Analysis Using the AM1 and PM5 Semiempirical Methods

conformation	heats of formation <sup>a</sup>			
	AM1		PM5	
	vacuum	methanol <sup>b</sup>	vacuum	methanol <sup>b</sup>
<b>1a</b>	-321.0 (42.5°)	-343.6 (38.8°)	-336.6 (28.3°)	-364.7 (28.7°)
<b>1b</b>	-319.5 (51.5°)	-341.5 (47.3°)	-330.2 (49.0°)	-359.4 (48.0°)
<b>1c</b>	-321.1 (59.7°)	-339.4 (55.1°)	-329.3 (63.1°)	-358.6 (63.4°)

<sup>a</sup> In parentheses are the values for the dihedral angle formed by H-21-C-21-C-20-H-20. <sup>b</sup> The COSMO solvation model was used as described previously.<sup>18</sup>

**Figure 1.** Selected HMBC (C → H) and NOESY (H ↔ H) correlations for turbinatine (1).**Figure 2.** Structure of conformation 1a. With the exception of hydrogen atoms attached to carbon atoms C-3, C-15, C-20, and C-21 the nonpolar hydrogen atoms were omitted in order to clarify the image.

the initial deglycosylation by the specific strictosidine  $\beta$ -glucosidase to give a highly unstable hemiketal aglycon (2), which has its secologanin ring then opened to afford the reactive dialdehyde 3<sup>11,12</sup> (Scheme 1). The proposed biogenetic pathway for corynanthean-type alkaloids requires the subsequent rotation of the C-15-C-20 bond followed by the nucleophilic attack of N-4 on the aldehydic C-21, leading to intermediate 4. This carbinolamine has been proposed as a putative intermediate in the biosynthesis of several corynanthean-type indole alkaloids, among these being 4,21-dehydrogeissoschizine and cathenamine.<sup>15,16</sup> Despite the large number of known indole alkaloids, the detection or isolation of carbinolamine 4 has not yet been

reported probably due to its high instability and rapid dehydration to the iminium aldehyde 4,21-dehydrocorynantheine (5). Subsequent reduction steps could lead to cathenamine (6) and further to corynantheine, through dehydration followed by reduction steps, as well as to other corynanthean-type alkaloids.<sup>13-16</sup> Alternatively, stabilization of carbinolamine 4 could be achieved through HO-21 glucosylation, leading to turbinatine (1). Therefore, the isolation of turbinatine (1) from the leaves of *Chimarrhis turbinata* may represent additional support for a biogenetic proposal for corynanthean-type alkaloids in which carbinolamine 4 could be involved.

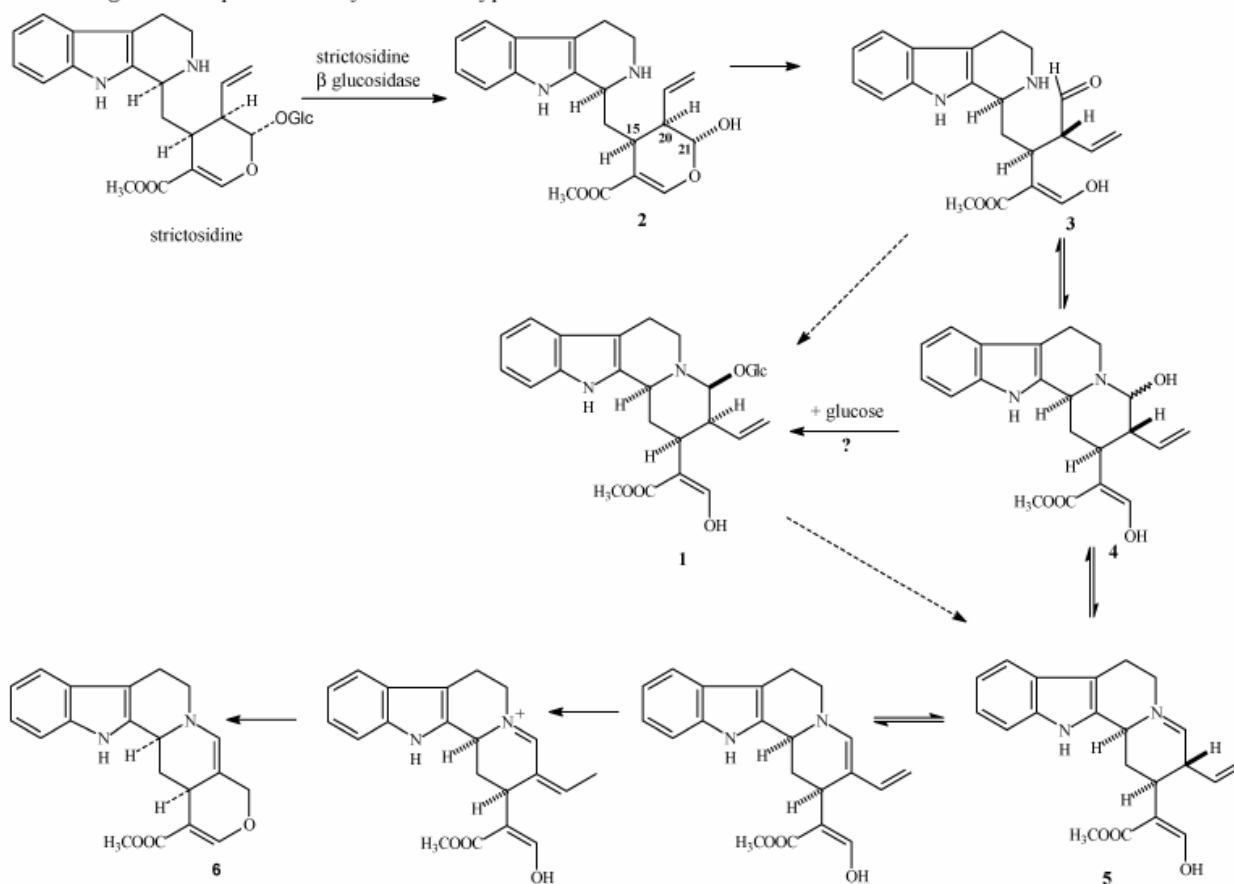
Recent taxonomic studies on Rubiaceae<sup>21</sup> have included a series of other distinctive characters such as placentation, fruit and seed morphology, anatomy, and their combinations and tendencies, leading to its organization into four subfamilies: Ixoroideae, Cinchonoideae, Antirheroideae, and Rubioideae. The definitions of these subfamilies and the limits of some tribes remain problematic, mostly due to the lack of morphoanatomical characters of many taxa and detailed chemical studies. The presence of indole alkaloids in *Chimarrhis* emphasizes the importance of chemotaxonomic data to help better understand the morphoanatomical classification of this complex plant family.

Although the initial crude extract from *C. turbinata* showed weak DNA-damaging activity,<sup>22</sup> to the best of our knowledge none of the known indole alkaloids isolated have been reported to show any effect on DNA. Compound 1 and the five known compounds isolated exhibited weak but selective activity with IC<sub>12</sub> values around >250 and 100  $\mu$ g/mL or higher, in the mutant yeast strains RS 188N (RAD<sup>+</sup>) and RS 322YK (rad 52Y), respectively.

## Experimental Section

**General Experimental Procedures.** Optical rotation measurements were conducted on a Perkin-Elmer 241 polarimeter using a quartz cuvette (length 1 cm). IR spectra were measured on a Perkin-Elmer 1600 or Nicolet EMACT-40 FTIR spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Bruker AC 200, a Varian INOVA 300, or a Varian INOVA 500 NMR spectrometer operating at 200, 300, and 500 MHz for <sup>1</sup>H, respectively, and at 50, 75, and 125 MHz for <sup>13</sup>C, respectively. TMS was used as internal standard. Mass spectra were recorded at high resolution on a Micromass Q-TOF spectrometer. For chromatographic procedures, silica gel PF254, silica gel (230-400 mesh or 60-230 mesh) (Merck), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech), and Amberlite resin XAD-16 (Sigma) were used. HPLC separations were performed on a Waters Prep LC 4000 System, and C<sub>18</sub> Luna (Phenomenex) columns and precolumns were used. All solvents (Merck or Mallinckrodt) were of analytical or HPLC grade. The theoretical study was done using the semiempirical PM5 and AM1 methods on SCF-MO-MOPAC-2000 and BioMedCACH software.

**Plant Material.** *Chimarrhis turbinata* was collected in Reserva do Viro, Belém, PA, Brazil, in October 1996 and identified by Dr. Marina Thereza V. do A. Campos. A voucher specimen is deposited in the Herbarium of the Botanic Garden, São Paulo, and catalogued as Lopes-51.

Scheme 1. Biogenetic Proposal for Corynanthean-Type Indole Alkaloids<sup>15,16</sup>

**Extraction and Isolation.** Dried and powdered leaves of *C. turbinata* (1.0 kg) were extracted with  $\text{CHCl}_3$ -MeOH and EtOH, successively, and afforded extracts A and B, respectively, after solvent evaporation under reduced pressure. Extract B was dissolved in MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2) and partitioned with hexane. The hydro alcoholic fraction was partially evaporated to MeOH-H<sub>2</sub>O (6:4) and then partitioned successively with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, and *n*-BuOH. The *n*-BuOH fraction (0.5 g, after solvent evaporation) was dissolved into MeOH (5 mL) and submitted to gel filtration over Sephadex LH-20 eluted with MeOH. The subfractions obtained were compared by TLC analysis and pooled into fractions A-H. Fractions B (27 mg), C (34 mg), and D (39 mg) were purified by HPLC (Phenomenex C<sub>18</sub>, 25.0 × 21.2 cm, 10 μm; eluent: MeCN-H<sub>2</sub>O (1:4); 12 mL/min; UV detection at 237 nm) and afforded compound 1 (7 mg) (retention time 28.7 min). Extract A was submitted to the same partition procedures, and the resulting *n*-BuOH fraction (1.53 g) was chromatographed by column chromatography over silica gel [ $\text{CHCl}_3$ -MeOH-H<sub>2</sub>O (70:28:2) and  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-H<sub>2</sub>O (65:30:5)], affording 29 subfractions, which were pooled into five fractions (A'-E') after comparison by TLC analysis. Gel filtration over Sephadex LH-20 of fraction B' (209 mg) led to the purification of strictosidine (79 mg) and a mixture of vallesiachotamine (6 mg) and isovallesiachotamine (60 mg). The separation of this mixture was subsequently undertaken by passage over Sephadex LH-20 and afforded pure vallesiachotamine (6 mg) and a further mixture of vallesiachotamine and isovallesiachotamine (24 mg). Gel filtration over Sephadex LH-20 of fraction D (160 mg) led to the purification of 5α-carboxystrictosidine (39 mg).

**Bioassay.** Identical to those reported in ref 22.

**Turbinatine (1):** amorphous yellow powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -8.5^\circ$  (*c* 0.04, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  235 nm ( $\epsilon$  5875); IR (KBr) 3496 (OH), 3370 (NH), 1710 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (see Table 1); HRESIMS *m/z* 532.3070 [M + 2]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, 532.2409).

**Strictosidine:** colorless crystals; mp 161–165 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -7.27^\circ$  (*c* 0.04, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  241 nm ( $\epsilon$  6025) and

474 nm ( $\epsilon$  11 800); IR (KBr) 3450 (OH), 1720 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ ; the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and EIMS were comparable with literature values.<sup>5,6</sup>

**5α-Carboxystrictosidine:** amorphous yellow powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -9.8^\circ$  (*c* 0.053, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  240 nm ( $\epsilon$  4528) and 450 nm ( $\epsilon$  8490); IR (KBr) 3400 (OH), 1734 (C=O), 1650 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ ; the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and EIMS were comparable with literature values.<sup>7</sup>

**Vallesiachotamine:** colorless crystals; mp 249–251 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +204^\circ$  (*c* 0.01,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  222 nm ( $\epsilon$  22 200), 285 sh ( $\epsilon$  28 500), 291 nm ( $\epsilon$  29 100); IR (KBr) 3260 (N-H), 1680 (C=O), 1660 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ ; the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and EIMS were comparable with literature values.<sup>8</sup>

**Isovallesiachotamine:** amorphous yellow powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -54^\circ$  (*c* 0.06,  $\text{CHCl}_3$ ); UV, IR, and EIMS were the same as observed for vallesiachotamine; the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data were comparable with literature values.<sup>8</sup>

**Acknowledgment.** This work was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) within the BIOTA/FAPESP (Biodiversity Virtual Institute Program) ([www.biota.org.br](http://www.biota.org.br)), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil). C.L.C. thanks FAPESP for a scholarship, and M.C.M.Y., M.F., and V.S.B. thank CNPq for research fellowships. We thank Prof. Dr. Jorge Guimarães (Centro de Biotecnologia-UFRGS) for the use of BioMedCache software.

## References and Notes

- (1) Robbrecht, E. *Op. Bot. Belg.* **1988**, *1*, 1–271.
- (2) Delprete, G. P. *Brittonia* **1996**, *48*, 35–44.
- (3) Boom, B. M.; Campos, M. T. V. A. *Bol. Mus. Paraense Emílio Goeldi* **1991**, *7*, 223–247.
- (4) Shamma, M.; Hindenlang, D. M. In *Carbon 13-NMR Shift Assignments of Amines and Alkaloids*; Shamma, M., Hindenlang, D. M., Eds.; Plenum Press: New York, 1979; pp 499–616.
- (5) De Silva, K. T. D.; Smith, G. N.; Warren, K. E. H. *Chem. Commun.* **1971**, 905–907.
- (6) Patthy-Lukáts, A.; Károlyházy, L.; Szabó, L. F.; Podányi, B. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 69–75.

## Notes

- (7) De Silva, K. T. D.; King, D.; Smith, G. N. *Chem. Commun.* **1971**, 908–909.
- (8) Waterman, P. G.; Zhong, S. *Planta Med.* **1982**, *45*, 28–30.
- (9) Wenkert, E.; Chang, C.-J.; Chawla, H. P. S.; Cochran, D. W.; Hagaman, E. W.; King, J. C.; Orito K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3645–3655.
- (10) Trager, W. F.; Lee, C. M.; Phillipson J. D.; Beckett, A. H. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 1043–1047.
- (11) Kutchan, T. M. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: London, 1998; pp 259–267.
- (12) Verpoorte, R.; van der Heijden, R.; Moreno, P. R. H. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Cordell, G. A., Ed.; Academic: London, 1997; pp 221–299.
- (13) Leonard, J. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 319–338.
- (14) Stevens, L. H. Formation and Conversion of Strictosidine in the Biosynthesis of Monoterpenoid Indole and Quinoline Alkaloids. Ph.D. Thesis, Leiden University, 1994, p 121.
- (15) Ruffer, M.; Kan-Fan, C.; Husson, H. P.; Stöckigt, J.; Zenk, M. H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 1016–1018.
- (16) Hemscheidt, T.; Zenk, M. H. *Plant Cell Rep.* **1985**, *24*, 216–219.
- (17) Stewart, J. J. P. *MOPAC 2000*; Fujitsu Limited: Tokyo, Japan, 1999.
- (18) (a) Peçanha, E. P.; Verli, H.; Rodrigues, C. R.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1607–1611. (b) Due to solvent characteristics we take the relative permittivity value of methanol as  $\epsilon = 32.6$  and the effective VDW radius of the solvent molecule as 2.52 Å.
- (19) (a) *BioMedCache 5.0*; Fujitsu Ltd. and Oxford Molecular Ltd., 2001. (b) The dihedral angles C-14–C-15–C-16–C-17, C-15–C-20–C-19–C-18, C-20–C-21–O–C1', and C-21–O–C-1'–C-2' were independently searched between 0° and 360° in 30° steps. (c) The conformations of ring D were evaluated as chair or twist-boat conformations, and the N-4 atom lone pair was evaluated to be above or below the plane of ring D.
- (20) Hessian matrix analyses were employed to unequivocally characterize them as true potential energy surface minima.
- (21) Robbrecht, E.; Puff, C.; Smets E. *Op. Bot. Belg.* **1996**, *7*, 1–10.
- (22) Gunatilaka, A. A. L.; Samaranyake, G.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1648–1654.

NP020547M

### 4.3 Trabalho II

O uso de métodos de modelagem molecular para o estudo de glicosaminoglicanos sulfatados, tais como a heparina, apresenta um elevado nível de complexidade e dificuldade, tendo-se em vista propriedades como a elevada polaridade, flexibilidade e mudanças conformacionais/configuracionais, intrínsecas a esta classe de biomoléculas. Como conseqüência direta de tais características, não existem até o presente momento campos de força de mecânica molecular parametrizados especificamente para polissacarídeos, assim como são raras as simulações de DM para tais compostos face aos trabalhos com proteínas.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta a primeira simulação de dinâmica molecular da heparina na escala de nanosegundo. Para tal, foi necessária a parametrização do campo de força GROMACS com cargas atômicas de *ab initio* (HF 6-31G<sup>\*\*</sup>). Este campo de força, baseado no GROMOS87, apresenta parâmetros somente para monossacarídeos simples, como glicose e galactose. Mesmo assim, o protocolo proposto permitiu descrição adequada da conformação da heparina em solução, tomando como referência uma estrutura deste composto previamente determinada por RMN. Ao mesmo tempo, o procedimento apresentado permite o controle da conformação do resíduo IdoA, possibilitando a observação dos efeitos associados à sua torção, tais como a mudança na geometria das ligações glicosídicas da heparina. Estas simulações, de reduzido custo computacional e de simples execução, baseado em ferramentas disponíveis gratuitamente, demonstram que a DM pode ser utilizada na determinação tanto da conformação de glicosaminoglicanos complexos, quanto dos aspectos moleculares da interação entre polissacarídeos e suas proteínas-alvo.

## **Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution**

**Hugo Verli**, Jorge A. Guimarães

*Carbohydrate Research*, **2004**, 339; 281-290





# Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution

Hugo Verli and Jorge A. Guimarães\*

*Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil*

Received 22 July 2003; accepted 16 September 2003

**Abstract**—Molecular dynamics (MD) simulations on heparin–water–sodium systems were carried out in order to establish a simulation protocol able to represent heparin solution conformation under physiological conditions. Atomic charges suitable for heparin oligosaccharides were obtained from ab initio quantum-mechanical computations, at the 6-31G\*\* level. The **GROMACS** forcefield, the SPC, and SPC/E water models were employed. Also heparin was simulated with IdoA residues in  ${}^1C_4$  or  ${}^2S_0$  conformational states. The results of the performed MD simulations are in agreement with the available experimental data, suggesting that this approach can be applied for the study of heparin interactions with its target proteins and thus play a role in the development of new antithrombotic agents.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Heparin; Molecular dynamics; Polysaccharide; Structure; **GROMACS**

## 1. Introduction

Heparin was identified and then isolated in 1916 from a preparation of dog liver, being the first compound used clinically as anticoagulant and antithrombotic agent.<sup>1</sup> It is mainly composed of hexasaccharide units containing iduronic acid (IdoA) 2-sulfate, glucosamine (GlcN) 2,6-disulfate, and non-sulfated glucuronic acid (GlcA),<sup>2</sup> although small variations occur among heparins from different sources.<sup>1</sup> This polysaccharide is capable of forming a ternary complex with antithrombin III and different serine proteases of the blood clotting cascade.<sup>3</sup> Once complexed, heparin potentiates antithrombin inhibitory activity over serine proteases of the coagulation cascade.

The heparin conformational profile presents an unusual mobility due to the presence of IdoA residues.<sup>4</sup> The internal iduronate residues can adopt an equilib-

rium between a chair  ${}^1C_4$  and skew-boat  ${}^2S_0$  forms<sup>5</sup> without causing the whole polysaccharide chain to bend.<sup>4</sup> This flexibility within IdoA residues is proposed to contribute to the unique heparin binding properties as compared to the lower antithrombotic activity of glycosaminoglycans presenting more rigid uronate residues.<sup>6</sup>

Efforts to elucidate the three-dimensional structure and the dynamic properties of oligosaccharides is a prerequisite for a better understanding of the molecular basis of their recognition by protein targets, which represents the main challenges for structural glycobiology.<sup>7</sup> Experimental methods such as NMR spectroscopy and X-ray crystallography have a long history of application to carbohydrates. However, these methods generally result in a single three-dimensional model for the oligosaccharide, which may fail to adequately describe its dynamic properties. So these time-honored methods can be complemented with molecular modeling techniques such as molecular dynamics (MD) simulations. This methodology allows the simulation of carbohydrates in their natural environment, solvated with counterions or complexed with target proteins.

\* Corresponding author. Tel.: +55-51-3316-6062; fax: +55-51-3316-7309; e-mail: [guimar@dna.cbiot.ufrgs.br](mailto:guimar@dna.cbiot.ufrgs.br)

Unfortunately, sulfated glycosaminoglycans like heparin and similar carbohydrates are thought to be difficult to model because of their highly polar functionality, their flexibility, and conformational/configurational changes, for example, anomeric, exo-anomeric, and gauche effects.<sup>7</sup> Several contributions have been made to set up some relevant parameterizations that would account for these specific features of carbohydrate moieties. However, the only agreement concerning these contributions appears to be restricted to the disaccharide level, and contributed only with individual answers to the problem.<sup>8</sup>

In this work we have studied the conformational profile of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution using molecular modeling techniques. An MD simulation protocol was established, as well as some simulation conditions that characterize the physiological medium where heparin acts (e.g., salt concentration and explicit water representation). Our results indicate that heparin can be simulated using MD techniques with reasonable confidence and under inexpensive conditions. Indeed the polysaccharide can be simulated with IdoA residues in either the <sup>1</sup>C<sub>4</sub> or <sup>2</sup>S<sub>0</sub> conformation. Thus it is possible to represent the conformational profile of heparin in aqueous solution, which opens the perspective of studying the interactions of heparins with their biological targets.

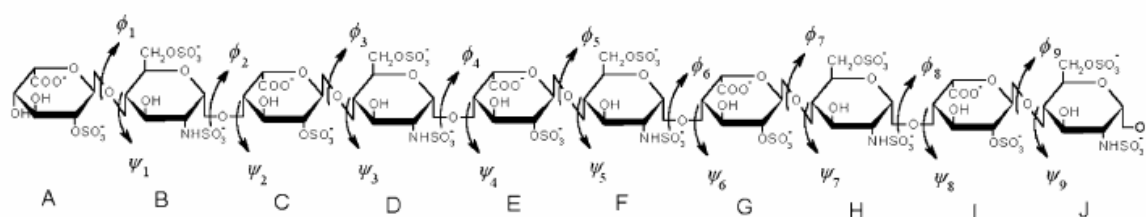
## 2. Experimental

### 2.1. Computational methods

**2.1.1. Nomenclature and software.** The recommendations and symbols of nomenclature as proposed by IUPAC<sup>9</sup> are used. The relative orientation of a pair of contiguous sugar residues (e.g., iduronic acid, glucosamine, and/or glucuronic acid) is described by two torsional angles at the glycosidic linkage, denoted  $\phi$  and  $\psi$ . For a (1→4) linkage the definitions become those shown in Eqs. 1 and 2:

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

$$\psi = \text{C-1-O-1-C-4'-C-5}'. \quad (2)$$



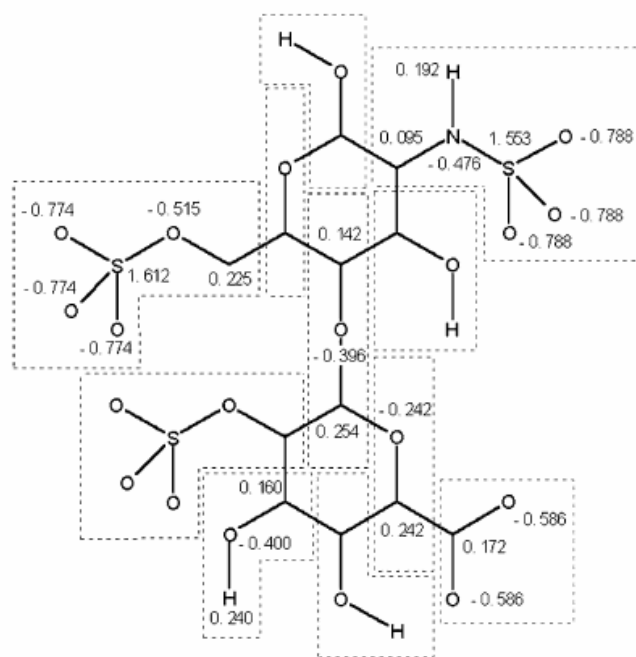
**Figure 1.** The decasaccharide A–J fragment of heparin. This structure comprehends five disaccharide repeating units of the GlcN and IdoA residues. The dihedral angles  $\phi$  and  $\psi$  are indicated.

The decasaccharide topologies were generated with the **PRODRG** program,<sup>10</sup> the ab initio calculations were performed using **GAMESS**,<sup>11</sup> manipulation of structures was performed with **MOLDEN** program,<sup>12</sup> and all the MD calculations and analysis were performed using the **GROMACS** simulation suite and forcefield.<sup>13,14</sup>

**2.1.2. Topology construction.** The heparin fragment under the 1HPN PDB code includes two NMR models of a heparin fragment consisting of six IdoA–GlcN disaccharides.<sup>15</sup> In one model all IdoA residues are in the <sup>2</sup>S<sub>0</sub> conformation, and in the other model all IdoA residues lie in the <sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformation. These structures were submitted to the **PRODRG** site,<sup>10</sup> and the initial geometries and crude topologies were retrieved. We reduced the dodecasaccharide to a decasaccharide fragment of heparin composed by five disaccharide units of IdoA–GlcN (Fig. 1). The **PRODRG** topology was modified to include some refinements such as the reference value for the S–N bond in the sulfonamide groups in residues B, D, F, H, J (Fig. 1), and the atomic charges.

The two conformational states (<sup>2</sup>S<sub>0</sub> and <sup>1</sup>C<sub>4</sub>) were defined by addition of improper dihedral angles (i.e., a torsion angle in which the four atoms are not bonded in sequence) in the respective topology files. This torsion angle is meant to keep planar groups in a plane or to prevent molecules from flipping over to their mirror images.<sup>14</sup> In our case the improper dihedral angles were intended to constrain the two conformational states of IdoA because of difficulties of the performed simulations in reproducing the transitions between the <sup>2</sup>S<sub>0</sub> and <sup>1</sup>C<sub>4</sub> structures. Two topology files were used, one for the <sup>2</sup>S<sub>0</sub> conformational state of the IdoA residues and one for the <sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformational state of the IdoA residue. The reference angle for the added improper dihedral angles was the only difference between them.

**2.1.3. Atomic charge calculation.** The atomic charges were generated using the sulfated sugars GlcA, IdoA, and GlcN as molecular probes. The sulfate and carboxylate groups were kept in the negatively charged forms. In addition, we used a disaccharide structure without sulfate groups to obtain atomic charges for the glycosidic linkage. These four structures were submitted



**Figure 2.** Schematic representation of the atomic charges calculated for heparin uronic acids and glucosamine residues. The charges are presented within each charge group of a disaccharide unit.

to full-geometry optimization using ab initio quantum-mechanical computations at the 3-21G level with **GAMMESS**.<sup>11</sup> Hessian matrix analyses were employed to unequivocally characterize the optimized structures as true minima on the potential energy surface. These minimal energy conformations were submitted to single-point ab initio calculations at the 6-31G\*\* level to calculate the Löwdin atomic charges.

In order to make the calculated atomic charges easily applicable to different sugar residues and forcefields, the uronic acids and glucosamine residues were divided in charge groups (Fig. 2). Another advantage of this approach is that each charge group in each sugar residue

along the polysaccharide chain is identical, and so are their interactions with the same molecule. The charges of these groups were averaged over both the uronic acid and glucosamine structures. The disaccharide structure was used only to calculate the charges of the glycosidic linkage.

**2.1.4. Molecular dynamics calculations.** The deca-saccharide structure obtained from NMR data<sup>15</sup> (PDB entry 1HPN) was the starting point for all simulations performed. This structure was solvated in a rectangular box using periodic boundary conditions and SPC<sup>16</sup> or SPC/E<sup>17</sup> water models. The solvation procedure was done by varying the box size in a manner such that we could control the sodium concentration ( $\sim 0$ ,  $\sim 145$ , and  $\sim 404$  mM). The sodium ions were added as counterions following two approaches, one by the *Genion* Program of the **GROMACS** simulation suite, and other by changing manually the water molecule closest to each negatively charged group. The total system size comprised 18,561 atoms for runs 1, 2, 4, 5, 6, and 7, and 6963 atoms for run 3, respectively (the parameters of runs 1–6 are depicted in Table 1). The MD protocol used has already been described.<sup>18</sup> Briefly, the Lincs and Settle methods<sup>19–21</sup> were applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration time step of 2 fs after an initial energy minimization using the Steepest Descents algorithm. Electrostatic interactions were calculated with Particle–Mesh Ewald method.<sup>22</sup> Temperature and pressure were kept constant separately by coupling the carbohydrate, ions, and solvent to external temperature and pressure baths with coupling constants of  $\tau = 0.1$  ps and  $\tau = 0.5$  ps,<sup>19</sup> respectively. The dielectric constant was treated as  $\epsilon = 1$ , and the reference temperature was adjusted to 310 K. The simulation lengths were 3 ns for each of the conditions studied. 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

**Table 1.** Average dihedral angles and NMR reference values for <sup>2</sup>S<sub>0</sub> MD simulations varying the water model (SPC and SPC/E) and the Na<sup>+</sup> insertion methodology

Dihedral angle <sup>a</sup>	Average <sup>a</sup> dihedral (°)		Run #					
	<sup>2</sup> S <sub>0</sub> NMR <sup>b</sup>	Steepest Descents	SPC			SPC/E		
			1 <sup>c,e</sup>			4 <sup>c,e</sup>		
			2 <sup>d,e</sup>	3 <sup>d,f</sup>	5 <sup>d,e</sup>	6 <sup>g</sup>		
IdoA → GlcN $\phi$	-55.4	-60.0	-77.9 ± 10.8	-77.4 ± 11.2	-77.9 ± 10.6	-77.5 ± 10.6	-75.0 ± 10.7	-82.2 ± 13.1
IdoA → GlcN $\psi$	-107.4	-102.8	-119.3 ± 11.3	-118.8 ± 11.5	-119.2 ± 10.4	-118.8 ± 10.4	-116.6 ± 10.6	-121.7 ± 12.2
GlcN → IdoA $\phi$	108.6	100.3	92.8 ± 15.3	94.1 ± 12.7	95.8 ± 15.7	96.6 ± 13.9	96.6 ± 14.1	88.4 ± 13.4
GlcN → IdoA $\psi$	-157.5	-153.2	-130.4 ± 16.3	-127.6 ± 13.8	-125.9 ± 16.7	-125.4 ± 15.6	-125.0 ± 15.1	-133.8 ± 15.0

<sup>a</sup>See Experimental section for details.

<sup>b</sup>Data obtained from PDB code 1HPN, Ref. 15.

<sup>c</sup>Na<sup>+</sup> inserted using *Genion* module of **GROMACS**.

<sup>d</sup>Na<sup>+</sup> inserted manually at each negative charged group of heparin (see Experimental section for details).

<sup>e</sup>Box size adjusted to give [Na<sup>+</sup>] =  $\sim 145$  mM (see Experimental section for details).

<sup>f</sup>Box size adjusted to give [Na<sup>+</sup>] =  $\sim 404$  mM (see Experimental section for details).

<sup>g</sup>No Na<sup>+</sup> inserted.

**Table 2.** Average MD dihedral angles and NMR reference values for  ${}^1C_4$  and  ${}^2S_0$  conformations

Dihedral angle <sup>a</sup>	Average <sup>a</sup> dihedral (°)					
	${}^2S_0$ Steepest Descents	${}^2S_0$ NMR <sup>b</sup>	Run 5 ( ${}^2S_0$ )	${}^1C_4$ Steepest Descents	${}^1C_4$ NMR <sup>b</sup>	Run 7 ( ${}^1C_4$ )
IdoA → GlcN $\phi$	-60.0	-55.4	-75.0 ± 10.7	-78.8	-77.1	-124.0 ± 18.3
IdoA → GlcN $\psi$	-102.8	-107.4	-116.6 ± 10.6	-116.1	-110.1	-144.5 ± 11.4
GlcN → IdoA $\phi$	100.3	108.6	96.6 ± 14.1	75.8	78.7	89.5 ± 11.9
GlcN → IdoA $\psi$	-153.2	-157.5	-125.0 ± 15.1	-141.8	-149.9	-141.3 ± 11.0

<sup>a</sup>See Experimental section for details.

<sup>b</sup>Data obtained from PDB code 1HPN, Ref. 15.

thermalization, together with the first nanosecond, was considered as equilibration, and all analyses were performed over the remaining part of the trajectory. The final structure obtained in run 5 was further minimized with Steepest Descents using the  ${}^1C_4$  improper dihedral angles for the IdoA residues in the topology file, giving the  ${}^1C_4$ -minimized structure presented in Table 2. This structure was used as input for run 7. Data concerning the decasaccharide structure, for example, glycosidic linkage and intramolecular hydrogen bonds, were obtained by averaging over four or five values for the same linkage located in five 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.<sup>23</sup> It should be noted that when a hydrogen bond occurs between a donor and multiple acceptors, for example, carboxylate and sulfate groups, only the lowest distance of two or three possibilities was retrieved at each frame of MD. As a result we have an average distance representative of multiple interactions. A reference value of 3.5 Å between heavy atoms was considered for a hydrogen bond<sup>24</sup> and a cutoff angle of 60° between donor–hydrogen–acceptor.<sup>14</sup>

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Atomic charges

Despite the lack of carbohydrate parameterization for polysulfated sugars as heparin, we decided to generate charges applicable to heparin uronic acids (glucuronic and iduronic acids) and glucosamine residues. Previous workers have attempted to develop parameters for sulfated monosaccharide salts.<sup>25</sup> Considering that it was based on Allinger's MM2 forcefield and that no parameter for the glycosidic linkage was presented, we conclude that there is a need to develop atomic charges suitable to be used in heparin MD simulation with the GROMACS forcefield. The atomic charges at the Hartree–Fock HF/6-31G\*\* level were chosen for this purpose.

Instead of the usual Mulliken population analysis, we adopted the Löwdin atomic charges due to the tendency

of Mulliken analysis to put all of the charge on the oxygen atom.<sup>26</sup> Electrostatic potential (ESP) based charges were reported as more accurate than Mulliken charges even for high-level ab initio theory.<sup>27</sup> However, due to differences in electrostatic properties along the heparin structure, the use of ESP-based charges would give different atomic charges for the atoms located in the middle from those located at the extremes of the structure. Figure 2 shows the charges obtained for the disaccharide units of the heparin decasaccharide fragment.

#### 3.2. Simulation conditions

Some simulation conditions capable of modifying the heparin dynamics and conformation in the MD trajectory, that is, the sodium insertion methodology, the sodium concentration, and the chosen water model were initially evaluated. These simulations were carried out using only the  ${}^2S_0$  conformer of iduronic acid in heparin (runs 1–6), and the best conditions identified were further applied to the  ${}^1C_4$  conformer (run 7, see Experimental section for details and Table 1 for definitions of runs).

To neutralize the simulated system (water plus the decasaccharide), 20 Na<sup>+</sup> ions were added. We use two procedures to add sodium ions to the decasaccharide solution: the *Genion* Program of the GROMACS simulation suite (runs 1 and 4) and the manual insertion of sodium at each negatively charged group (runs 2, 3, 5, and 7—e.g., carboxylate and sulfate groups). The *Genion* Program replaces solvent molecules by monoatomic ions based on the most favorable electrostatic site. However, we noticed that for the simulated system the sodium ions were mainly placed at the corners of the box, therefore distant from the decasaccharide molecule. Considering that this distribution of sodium ions could create some instability in the simulation, we decided to locate the ions close to each charged group, as already reported.<sup>23</sup> The decasaccharide was also simulated under different sodium concentrations (~0, ~145, and ~404 mM) and two water models (SPC and SPC/E).

The analysis of the MD simulation of the decasaccharide was based on the glycosidic linkage conformational profile over the MD trajectory. The  $\phi_n$  and  $\psi_n$

angles were averaged during the last 2 ns of MD simulation and over the decasaccharide chain. We also used the values of the  $\phi$  and  $\psi$  angles obtained by the Steepest Descents minimization of the system comprising water, ions, and the decasaccharide itself in order to discern the quality of the generated topology. The average dihedral angles from the MD simulations of runs 1–6, from NMR data and from the Steepest Descents minimization are presented in Table 1. It should be noted that no end effects were observed in the polysaccharide chain, i.e., greater conformational flexibility of the terminal glycosidic linkages is indicated. Only small variations were noted, which were always smaller than the standard deviation of the angles. So there is no loss of information about the chain position on the linkage fluctuations as the data are presented here.

Comparing the average angles shown in Table 1, we observe that most angle variations are smaller than the standard deviation ( $\sim 13^\circ$ ). Moreover run 5 conditions present the closest values to the NMR experimental data. These conditions (a manually replacement of water by sodium ions and the SPC/E water model, with IdoA residues in the  ${}^2S_0$  conformation) were thus used in a decasaccharide structure with all IdoA residues in a  ${}^1C_4$  conformation (Table 2, run 7).

A problem frequently found in molecular modeling studies is the choice of the atomic charges for the system. The reliability of the atomic charges becomes more difficult to achieve when the molecules presents hyper-valent groups, for example, sulfonamide and sulfate. The atomic charges for these groups are predicted by semi-empirical methods to be very high as a consequence of the non-association of d orbitals with the sulfur atom.<sup>27</sup> This problem can be increased in polysulfated compounds such as heparin, creating an abnormally strong electrostatic field around the carbohydrate molecule. Actually initial simulation conditions were tested using semi-empirical atomic charges, but as great distortions of the decasaccharide structure were observed (data not shown), we avoided this methodology.

In order to test the reliability of the calculated heparin residue charges (Fig. 2), we compared them to the atomic charges described previously by Ferro and co-workers.<sup>25</sup> From this comparison a correlation between the two sets of charges can be made, albeit with some important differences. A two-fold variation was observed in carbon, hydrogen, and nitrogen atoms of sulfonamide group. This discrepancy seems to be due to the 6-31G\*\* Löwdin atomic charges used in the present work (compared to the 6-31+G\*\* level with the post-SCF Møller–Plesset electronic correlation treatment at the second order) and the use of molecular probes to calculate the charges. The work of Ferro used a methyl-*O*-sulfate, while we used the entire sulfated monosaccharide (except for calculation of the atomic charges of the glycosidic linkage, when a di-

saccharide probe was used—see Experimental section for details). Another relevant difference observed in comparison with the work of Ferro and co-workers is related to the oxygen charges of the sulfate group. Distinctly from those authors, we made the atomic charges of these oxygen atoms uniform. We choose this based on the difficulty in differentiate the hydrogen bond formed by each sulfate oxygen atom in solution as well as the effect of the entire polysaccharide chain on these charges. So we attempted not to create abnormal interactions using different charges on each oxygen atom of the sulfate groups that could modify the 3D structure of heparin as well as modify the interaction profile of heparin with target proteins.

The charges thus obtained were also compared to those described in the GROMACS forcefield for galactose and glucose. An important difference was noted in the hydroxyl group where the oxygen atoms have a charge of  $-0.548e$  and the hydrogen atoms have a charge of  $0.398e$  (contrasting with the charges of  $-0.400e$  and  $0.240e$ , respectively, described in the present work). We thus also tested these charges in MD simulations. However, the reproduction of the heparin NMR structure was not so good (data not shown) as that obtained with the charges presented as in Figure 2, which reinforces the fitness of the approach presented here.

Together with the atomic charges from heparin, the amount and initial positions of sodium ions are important properties to the heparin tri-dimensional structure and dynamics due to their interaction with the charged groups of heparin. The lack as well as the location of sodium in unfavorable regions could give rise to strong electrostatic interactions not found under the natural heparin solution conditions. In fact it has been reported that the interactions between the polysaccharide chain and water molecules determine carbohydrate structure and functionality,<sup>28</sup> being furthermore influenced by the water model used. In this context the simulation of the decasaccharide at different sodium concentrations may give insights into the influence of this ion in heparin conformation.

Concerning the sodium placement approach, differences were not observed between the MDs of decasaccharides in runs 1 and 2 (Table 1). These two simulation conditions used the SPC water model, but the picture is very similar considering runs 4 and 5 that used the SPC/E water model. Also the comparison between runs 2 and 5 show that the system simulated with the SPC/E water model tends to better represent the heparin conformational profile when compared with the system simulated with the SPC water model, with the exception of the GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$  angle (see further). Globally, run 5 presented the best conditions found for MD simulation of heparin.

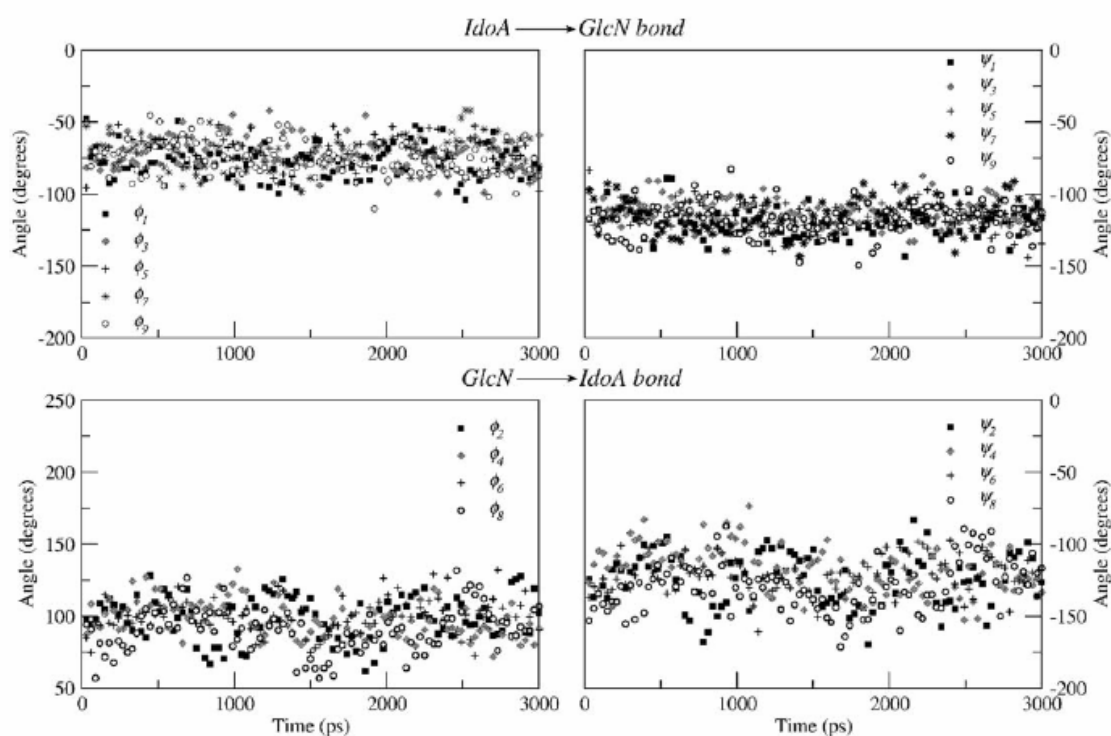
Together with the localization of ions prior to MD, the performed simulations also give insights about the

influence of sodium concentration on the theoretical studies of heparin. The comparison between runs 2 and 3, with a four-fold variation in sodium concentration (Table 1) shows no significant modification in the dynamics profile of the glycosidic linkage, suggesting that is possible to simulate heparin with a lower amount of water and a greatly reduced computational cost. In the case of runs 2 and 3, there was a three-fold reduction in water amount and an increase in speed of calculation by almost a factor of four. Considering the great amount of water necessary to solvate the sodium salt of heparin under physiological conditions ( $\sim 145$  mM), the use of hypertonic solutions can be a good alternative to reduce the computational cost of heparin simulation without great loss in precision of the results. However, the above results could give the impression that the presence of sodium ions do not make any difference in the conformational profile of the heparin fragment simulated. As can be seen (Table 1, run 6), when the simulation was made in absence of sodium ions but with the same amount of water used for the runs at physiological concentration of the ion (runs 1, 2, 4, and 5), a considerable distortion of the glycosidic bond geometry was observed. These data thus indicate the relevance of positive ions in the MD description of the heparin conformational profile.

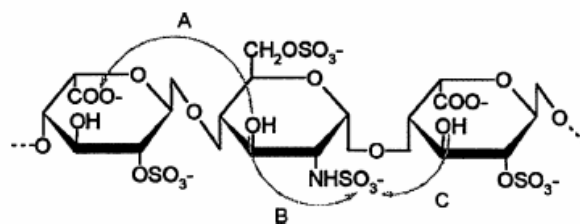
Considering that the overall conformation of oligosaccharides can be essentially determined by the torsion angles of the glycosidic linkage, we also analyzed the time-dependent fluctuations of such angles. The values

of dihedral angles  $\phi_n$  and  $\psi_n$  are presented in Figure 3 over the 3-ns trajectory of run 5. All the angles show a stable conformational behavior around the average angles presented in Table 1, indicating that the system is quite equilibrated. These data can also suggest a good conformational sampling of the performed simulations. However, a considerable difference in the representation of heparin dynamics in solution was observed over the different types of heparin glycosidic linkages (Fig. 3). The IdoA  $\rightarrow$  GlcN angles are closer to the NMR reference values and also present less fluctuation over the MD when compared to the GlcN  $\rightarrow$  IdoA angles. This profile appears to be due to intramolecular hydrogen bonds between the sulfonamide group of the GlcN residue and the hydroxyl group of the IdoA residue. The hydrogen bond between these two groups (interaction C of Table 3) presents a deviation of about 1 Å from the NMR data, giving a weaker intramolecular interaction and thus increasing the flexibility of the dihedral angle.

It is also possible that the GlcN  $\rightarrow$  IdoA angle be more flexible than the IdoA  $\rightarrow$  GlcN angle as an intrinsic property of heparin. In agreement with this observation and reinforcing the MD representation of heparin conformation in solution is the fact that the experimental value of the IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\psi$  angle is also represented during the MD trajectory. This dynamic look in the conformational behavior of heparin observed here has been lost in the one-structure NMR heparin under PDB-ID 1HPN and in forcefield adjustments of the polysaccharide structure to fit the NOESY data, thus indicating



**Figure 3.** Time dependence of the glycosidic linkage torsion angles  $\phi_n$  and  $\psi_n$  in the decasaccharide over the 3 ns of run 5. The curves were smoothed in 100 ps windows for the sake of clarity.

**Table 3.** Average MD intramolecular hydrogen bond distance and NMR reference values for  ${}^1C_4$  and  ${}^2S_0$  conformations

Hydrogen bond <sup>a</sup>	Average <sup>a</sup> distance (Å)			
	${}^2S_0$ NMR <sup>b</sup>	Run 5 ( ${}^2S_0$ )	${}^1C_4$ NMR <sup>b</sup>	Run 7 ( ${}^1C_4$ )
A	3.4	3.8	3.4	5.0
B	3.7	3.5	3.0	3.6
C	2.8	3.7	6.1	5.0

<sup>a</sup>See Experimental section for details.

<sup>b</sup>Data obtained from PDB code 1HPN, Ref. 15.

MD as an adequate and complementary procedure for one-structure NMR studies.

The application of the MD conditions of run 5 (IdoA residues in the  ${}^2S_0$  conformation) to simulate a decasaccharide with IdoA residues in a  ${}^1C_4$  form gives rise to intriguing aspects of the representation of heparin conformation by MD. While in the  ${}^2S_0$  form of IdoA residues the error in glycosidic linkage compared to NMR values ranged from  $\sim 10^\circ$  (IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\psi$  and GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\phi$ ) to  $\sim 20^\circ$  (IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\phi$ ) and  $\sim 30^\circ$  (GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$ ) in the  ${}^1C_4$  form of IdoA residues the error ranged from  $\sim 5^\circ$  (GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$ ) to  $\sim 10^\circ$  (GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\phi$ ),  $\sim 30^\circ$  (IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\psi$ ), and  $\sim 50^\circ$  (IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\phi$ ), indicating that the skew-boat conformation is better described by MD techniques than the chair conformation in the heparin IdoA residues. Also the dihedral angle that is better described in the  ${}^1C_4$  conformation of the IdoA residues is the worst in the  ${}^2S_0$  conformation (GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$ ).

The analysis of the intramolecular hydrogen bonds of the decasaccharide suggest that an interaction between a hydroxyl group of the IdoA residue and the sulfonamide group of the GlcN (interaction C, Table 3) residue can be essential for the geometry of GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$  angle. In run 5 (IdoA residues in a  ${}^2S_0$  form) a deviation of 0.9 Å in this interaction from the NMR structure implies the existence of a weaker interaction between the two residues, thus producing the distortion of the angle. In run 7, however, this interaction is not important for the heparin conformation since the distance C is already too far from a hydrogen bond reference value in the NMR structure with the IdoA residues in a  ${}^1C_4$  form. This explains why the GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$  angle is better described when the IdoA residues lie in a chair conformation compared to the skew-boat conformation. Also these results indicate that the change in IdoA conformation alters significantly the hydrogen-bond network

within heparin and can have important implications in the interaction of the polysaccharide with its target proteins.

As shown in Table 2, there is a greater deviation of angle IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\psi$  (and maybe of angle IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\phi$ ) in run 7 as compared to run 5. This find is probably due to a hydrogen bond between the hydroxyl group of the GlcN residue and the carboxylate group of the IdoA residue (interaction A, Table 3) observed in the NMR structure but not reproduced in the MD simulations for a decasaccharide with IdoA residues in a  ${}^1C_4$  conformation. In fact the MD was capable of representing this hydrogen bond only with IdoA residues in the  ${}^2S_0$  form (3.8 Å in the  ${}^2S_0$  form vs 5.0 Å in the  ${}^1C_4$  form), justifying the deviations from the NMR data. Also these changes in heparin structures are not a consequence of simple polysaccharide denaturation since the length of the decasaccharide is almost the same in both runs 5 and 7 (39.9 and 38.8 Å, respectively, compared to the experimental value of 38.4 Å). These results indicate clearly that the MD simulations performed better with IdoA residues in the  ${}^2S_0$  conformation than in the  ${}^1C_4$  conformation. Even with these limitations and with the differences obtained between the simulated heparin systems and the NMR reference value, the overall geometry of the molecule was maintained in MD simulations as shown in Figure 4.

The preference of IdoA residues to stay in a skew-boat form to the detriment of a chair form has been described in solution<sup>29</sup> and when interacting with antithrombin.<sup>30</sup> This is in agreement with the preference of sugars to keep their hydroxyl groups in equatorial orientation due to the interference with the surrounding solvent: equatorial groups would be more stable (less interference) than axial groups (more interference).<sup>31</sup> So the mutual conformational influence between sugars and solvent reinforce the relevance of the solvent model to

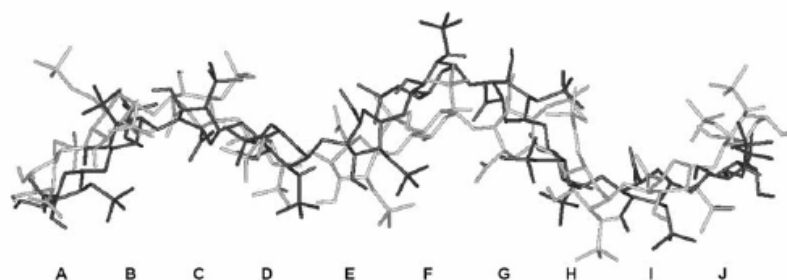


Figure 4. All atom superimposition of minimized deca-saccharide (light gray), and run 5 (dark gray).

the overall dynamics of the polysaccharide, ring conformation, and glycosidic linkage. In agreement with this assumption is the low value of the stretching constant associated with a glycosidic linkage in available forcefields ( $\sim 3.8$  kJ), in a way that the interactions with solvent will give enough energy to modify the glycosidic linkage geometries over the polysaccharide chain. Also our simulations indicate that the interaction energy between deca-saccharide and solvent is about 550 kJ more intense when IdoA residues lie in the  ${}^2S_0$  conformation ( $-6601.7$  kJ/mol) than in the  ${}^1C_4$  conformation ( $-6056.9$  kJ/mol).

In order to verify the reliability of the performed MD simulation we have compared the data obtained with other works reported by MD, NMR, and crystallographic studies of heparin.<sup>6,15,23,32</sup> These comparisons are represented in Table 4.

As we can see in Table 4, there is a great variability in geometry through the previously determined heparin structures. For example, heparin tetrasaccharide in solution<sup>6</sup> has a variation in its glycosidic linkages relative to crystal structure<sup>32</sup> of  $\sim 20^\circ$  (GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\phi$ ) to  $\sim 50^\circ$  (GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$ ). This variation could be due to both the packing effects in the crystal or to conformational modification of heparin induced by FGFb. However the heparin hexasaccharide has a variation of  $\sim 20^\circ$  (IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\psi$  and GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\phi$ ) to  $35^\circ$  (IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\phi$ ) from MD data relative to the NMR structure.<sup>23</sup> In this case we have no interaction with

other proteins capable of conformational induction. One possibility is the limitation of the forcefield used in the MD simulations. However, the comparison between MD results of the hexasaccharide and the deca-saccharide (run 5) shows a remarkable similarity around the IdoA  $\rightarrow$  GlcN dihedral angle (Table 4). Considering that the hexasaccharide simulation used the **AMBER** forcefield with Homans' additions for saccharides,<sup>33</sup> and in the deca-saccharide simulation we used the **GROMACS** forcefield,<sup>14</sup> a **GROMOS87**-based forcefield, which are two basis sets with great differences,<sup>8</sup> we can reduce the relevance of the forcefield in the differences between the NMR and MD data.<sup>23</sup> Another possibility, also applicable to the differences between the  ${}^2S_0$  NMR structure and run 5, lies in the refinement of the heparin structure. In this process there is a loss of dynamic information about the glycosidic linkage (e.g., the Mulloy heparin structure shows only two conformations, one with IdoA in the  ${}^2S_0$  conformation and the other in the  ${}^1C_4$  conformation) that appears with more detail in molecular dynamics calculations.<sup>34</sup>

The differences in dihedral angle average values for the glycosidic linkages presented in Table 4 for both theoretical and experimental data can also be analyzed in the polysaccharide hydration context. The carbohydrate's polar functionality creates a hydrogen-bond network that affects the surrounding water and, in return, the water affects the structure of the sugar. For oligosaccharides containing glycosidic linkages at the

Table 4. Average MD dihedral angles and NMR, crystallographic, and solution reference values for  ${}^2S_0$  conformations

Dihedral angle	Average dihedral ( $^\circ$ )					
	${}^2S_0$ NMR <sup>a</sup>	Run 5 <sup>b</sup>	Tetrasaccharide		Hexasaccharide <sup>c</sup>	
			Solution <sup>e</sup>	Crystal <sup>d</sup>	NMR	MD
IdoA $\rightarrow$ GlcN $\phi$	-55.4	-75.0	-72	-78.8	-40	-75
IdoA $\rightarrow$ GlcN $\psi$	-107.4	-116.5	-102	-107.1	-99	-121
GlcN $\rightarrow$ IdoA $\phi$	108.6	96.6	74	94.5	73	51
GlcN $\rightarrow$ IdoA $\psi$	-157.5	-125.0	-75	-129.8	-82	-83

<sup>a</sup>PDB code 1HPN, Ref. 15.

<sup>b</sup>The present work (see Table 2).

<sup>c</sup>Ref. 6.

<sup>d</sup>PDB code 1BFB, Ref. 32.

<sup>e</sup>Ref. 23.



6-position, the correct experimental rotamer distribution about the  $\omega$ -angle is obtained only with the inclusion of explicit water molecules in the MD simulation.<sup>34</sup> Once heparin has highly charged characteristics, its interaction with the surrounding water should be stronger than the interactions of other non-sulfated carbohydrates. Considering the effectiveness of this strong interaction, it is reasonable to hypothesize that the mutual influence between the heparin and solvent will also be strengthened. It remains however to be determined in which degree the water models that are so-far available for MD are able and appropriate to better describe this process. It should be noted that while the IdoA residues were fixed in the  ${}^1C_4$  and  ${}^2S_0$  forms, we have not used any kind of positional restraints in the rest of the heparin structure, neither in minimization nor in the MD simulation. This is an advantage compared to previous studies in which the use of restraints was necessary to avoid distortion of polysaccharide structure during equilibration.<sup>23</sup> Also the absence of consensus in the heparin structure and dynamics highlights the MD simulations presented in the present work. The variations between run 5 and the NMR structure of heparin containing the  ${}^2S_0$  conformation of IdoA residue<sup>15</sup> are equivalent to the variations between the hexasaccharide structure obtained by NMR and MD simulations<sup>23</sup> (i.e.,  $35^\circ$  in the IdoA  $\rightarrow$  GlcN  $\phi$  angle) and even a half value of the variations between tetrasaccharide crystal<sup>30</sup> and its solution structure<sup>6</sup> (i.e.,  $\sim 60^\circ$  in the GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$  angle). So we believe that the approach presented can be a useful tool in heparin study with a accuracy relative to experimental data and at least comparable with previously related proceedings with a lower computational cost. Moreover, it uses a distinct forcefield parameterization that can contribute with new answers to carbohydrate simulation and study.

#### 4. Conclusions

The lack of structural information concerning the intrinsic conformational flexibility of heparin as well as about the interaction of heparin with its target proteins is partially due to experimental difficulties with this complex polysaccharide. These difficulties were also found with theoretical approaches like MD simulations. Many efforts have been made in order to overcome these obstacles, and the major MD simulation of heparin before the present study was made with a hexasaccharide during 2 ns.<sup>35</sup>

Here we present a conformational study of a heparin decasaccharide using MD simulation. This simulation was stable during the performed 3 ns with  $\sim 6000$  water molecules, characterizing a system with a physiological sodium concentration. Atomic charges suitable for MD calculations of sulfated sugars were parameterized using

Löwdin population analysis and compared with previously related atomic charge schemes for sulfated and non-sulfated carbohydrates. The performed simulations were carried out with heparin presenting IdoA in either the  ${}^2S_0$  or  ${}^1C_4$  conformations. The conformational behavior of the glycosidic linkage is in agreement with the available NMR experimental data, as well as previous crystallographic and MD data. We believe that this protocol can be useful in future studies, overcoming the difficulties in determining the interaction sites of heparin and other glycosaminoglycans of different sizes and sugar compositions with their target proteins. The rationalization and molecular modeling of heparin interactions with its binding proteins can be an important tool for the development of new antithrombotic agents and also for monitoring the distinct activity profiles of heparins of different origins, including their low-molecular-weight components and other derivatives.

#### Acknowledgements

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), MCT, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brazil, and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), RS, Brazil for their financial support. We are indebted to Prof. Paulo A. Netz (ULBRA), Prof. Ernesto Caffarena (Fiocruz), Prof. Laurent Dardenne (LNCC), Carlos Maurício Sant'Anna (UFRRJ), and Prof. Ivarne Tersariol (UMC) for scientific discussion and contributions to this paper.

#### References

1. 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. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2001**, *34*, 699–709.
2. Silva, M. E.; Dietrich, C. P. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 6841–6846.
3. Danielsson, A.; Raub, E.; Lindahl, U.; Björk, I. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15467–15473.
4. Mulloy, B.; Forster, M. J. *Glycobiology* **2000**, *10*, 1147–1156.
5. Ferro, D. R.; Provasoli, A.; Ragazzi, M.; Casu, B.; Torri, G.; Bossennec, V.; Perly, B.; Sinay, P.; Petitou, M.; Choay, J. *Carbohydr. Res.* **1990**, *195*, 157–167.
6. Mikhailov, D.; Mayo, K. H.; Vlahov, I. R.; Toida, T.; Pervin, A.; Linhardt, R. J. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 93–102.
7. Imberty, A.; Pérez, S. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4567–4588.
8. 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. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 141–155.

9. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *J. Mol. Biol.* **1970**, *52*, 1–17.
10. (a) van Aalten, D. M. F.; Bywater, B.; Findlay, J. B. C.; Hendlich, M.; Hooft, R. W. W.; Vriend, G. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 255–262; (b) <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>.
11. 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. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363.
12. **MOLDEN**. Schaftenaar, G. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands, 1997.
13. Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43–56.
14. van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. **GROMACS** User Manual Version 3.0, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 2001.
15. Mulloy, B.; Forster, M. J.; Jones, C.; Davies, D. B. *Biochem. J.* **1993**, *293*, 849–858.
16. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. In *Intermolecular Forces*; Pullman, B., Ed.; Reidel: Dordrecht, The Netherlands, 1981; pp 331–342.
17. Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269–6271.
18. de Groot, B. L.; Grubmüller, H. *Science* **2001**, *294*, 2353–2357.
19. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
20. Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472.
21. Miyamoto, S.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 952–962.
22. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
23. Mikhailov, D.; Linhardt, R. J.; Mayo, K. H. *Biochem. J.* **1997**, *328*, 51–61.
24. Luzar, A.; Chandler, D. *Nature* **1996**, *379*, 55–57.
25. Ferro, D. R.; Pumilia, P.; Ragazzi, M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 351–367.
26. Leach, A. R. *Molecular Modeling Principles and Applications*; Longman: Singapore, 1996. pp 115–116.
27. Clare, B. W.; Supuran, C. T. *J. Mol. Struct.* **1998**, *428*, 109–121.
28. Engelsens, S. B.; Monteiro, C.; de Penhoat, C. H.; Pérez, S. *Biophys. Chem.* **2001**, *93*, 103–127.
29. Cros, S.; Petitou, M.; Sizun, P.; Pérez, S.; Imberty, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *5*, 1301–1309.
30. Jin, L.; Abrahams, J. P.; Skinner, R.; Petitou, M.; Pike, R. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 14683–14688.
31. Uedaira, H.; Okouchi, S.; Tsuda, S.; Uedaira, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 1857–1861.
32. Fahem, S.; Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Linhardt, R. J.; Rees, D. C. *Science* **1996**, *276*, 1116–1120.
33. Homans, S. W. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9110–9118.
34. Kirschner, K. N.; Woods, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 10541–10545.
35. Angulo, J.; Nieto, P. M.; Martin-Lomas, M. *Chem. Commun. (Cambridge)* **2003**, *13*, 1512–1513.

#### 4.4 Trabalho III

O trabalho anterior baseou-se em cargas atômicas de *ab initio* utilizando o esquema da Löwdin para a parametrização de campos de força, abordagem esta ainda não descrita na literatura. Em contraposição, os esquemas de carga usualmente utilizados para este fim incluem Mulliken e cargas ajustadas ao potencial eletrostático (ESP).

Assim sendo, cargas de Mulliken, Löwdin e cargas ESP foram obtidas por métodos *ab initio* (HF 6-31G\*\*), e utilizadas na simulação da heparina. Os resultados obtidos demonstram que as cargas de Löwdin e de ESP produzem resultados similares e melhores que Mulliken na reprodução da estrutura e conformação da heparina. Löwdin, contudo, apresenta vantagens tais como o reduzido custo computacional e a pequena dependência da conformação molecular.

Concomitantemente, o estudo de *ab initio* (HF 3-21G) do resíduo IdoA demonstrou que a conformação deste resíduo,  ${}^2S_0$ , pode na verdade ser a conformação  ${}^5S_1$ . Esta mudança conformacional, menor que 1 Å e portanto de difícil determinação experimental, implicou na correção em 30° da estrutura da heparina descrita por DM, além da modificação em ~200kJ/mol na interação da heparina com o meio circundante. Tal energia é significativa no contexto da interação ligante-receptor (*e.g.* equivale aproximadamente a uma ponte salina), demonstrando a importância dos resultados obtidos para o desenho de novos agentes antitrombóticos e a importância da modelagem molecular no refinamento de dados experimentais.

### **Molecular dynamics and atomic charges calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution**

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

*Carbohydrate Research*, **2005**, 340; 1499-1507



# Molecular dynamics and atomic charge calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution

Camila F. Becker, Jorge A. Guimarães and Hugo Verli\*

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

Received 30 January 2005; accepted 27 March 2005

**Abstract**—HF/6-31G\*\* and molecular dynamics (MD) simulations were used to evaluate the performance of different atomic charge basis sets (i.e., Mulliken, Löwdin, and Electrostatic Potential Derived Charges—ESP) in heparin simulations. HF/3-21G calculations were also used to study the NMR conformation of the IdoA residue. The results thus obtained indicated that ESP and Löwdin charges gave the better results in heparin simulations, followed by Mulliken charges, and that the minimum-energy conformation of IdoA can be different from that observed by NMR spectroscopy by less than 1 Å. However, it was found that this small conformational modification is capable of inducing a change of almost 200 kJ/mol in the interactions of heparin with the surrounding environment, which is a meaningful amount of energy in the context of ligand–receptor interactions. This information can be potentially of great relevance in the design of heparin-derived antithrombotic compounds.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Heparin; Molecular dynamics; Polysaccharide structure; GROMACS; Löwdin charges; NMR refinement

## 1. Introduction

Heparin was first identified and isolated from a preparation of dog liver in 1916, and it constitutes the first compound that was clinically used as an anticoagulant and antithrombotic agent. It is still today recognized as a powerful therapeutic drug and is currently in clinical use.<sup>1</sup> Heparin is a sulfated copolymer composed of disaccharide units containing (1→4)-linked residues of uronic acids (2-sulfated  $\alpha$ -L-iduronic acid, IdoA, or non-sulfated  $\beta$ -D-glucuronic acid, GlcA) and glucosamine (GlcN) 2,6-disulfate.<sup>1,2</sup> The combination of disaccharide units form a hexasaccharide repeating unit, which is the most common chemical structure usually reported:<sup>3</sup>  $\Delta$ UA2S(1→4)- $\alpha$ -D-GlcNp-S6S(1→4)- $\alpha$ -L-IdoAp-2S(1→4)- $\alpha$ -D-GlcNp-S6S- $\alpha$ -L-IdoAp-2S(1→4)- $\alpha$ -D-GlcNp-S6S. When bound to antithrombin III (AT), this

polysaccharide accelerates the inhibition of thrombin, as well as of other serine proteases of the blood clotting cascade. This occurs when these molecules are bound in a ternary complex where heparin induces conformational changes in AT, thus inducing its best fit to the target protease, which increases several folds the affinity constants for the binding of the two proteins.<sup>4</sup>

The first conformational studies on heparin oligosaccharides highlighted several difficulties that are specific to heparin fragments: (a) compared to other pyranose sugars the iduronate ring displays great flexibility and can adopt a variety of conformations viz.,  ${}^4C_1$ ,  ${}^1C_4$ , and  ${}^2S_0$ , (b) parameterization for the *O*- and *N*-sulfo groups is not readily available in most force fields, and (c) the polyanionic character of the decasaccharide requires special consideration for solvent or counter-ion effects.<sup>5</sup> Considering that these polysaccharides have important biological activities due to their ability for complexation with target biomolecules, studies of the interaction of glycosaminoglycans (GAGs) with proteins is a challenging task because of the poor surface

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316 7770; fax: +55 51 3316 7309; e-mail: [hverli@cbiot.ufrgs.br](mailto:hverli@cbiot.ufrgs.br)

complementarity, the high charge density of the binding areas, and the highly flexible nature of the polysaccharide.<sup>6</sup>

Experimental data for the heparin structure present a great variance in the glycosidic linkage geometries (i.e.,  $\phi$  and  $\psi$  angles), because there is no homogeneity between different sources of data. Our previous work<sup>7</sup> compared different sources of heparin structures obtained by NMR spectroscopy, molecular dynamics (MD), and X-ray crystal methods.<sup>8–11</sup> The variations among these data can exceed 50° for the GlcN→IdoA  $\psi$  angle. However, using MD simulations we were able to represent the heparin structure in aqueous solution with a maximum deviation of 30° from the reference data that was used.<sup>8</sup>

The deviations observed in our previous work of heparin simulation<sup>7</sup> as compared to NMR solution conformation, appear to be derived from intramolecular interactions. It seems that the atomic charges of the interacting groups may have implications in the improvement of the description of the heparin structure. Thus there is a lack of comparative studies between different atomic charge basis sets to MD calculations. While ESP charges have performed well in simulations of carbohydrate structures in solution,<sup>12</sup> these present a conformationally dependent behavior.<sup>13</sup> At the same time Mulliken population analyses are known to be generally poor for reproducing intermolecular interaction energies.<sup>13</sup> On the other hand, very little information regarding the use of Löwdin atomic charges is available.

In this work we evaluated and compared different methodologies to calculate atomic charges (i.e., Löwdin, Mulliken, and electrostatic potential derived charges—ESP charges) for the reproduction of heparin conformation in aqueous solution. A refinement for representing the solution conformation of heparin<sup>8</sup> based on ab initio and MD calculations is proposed. These improvements based on computational methods can be useful in supporting the design of new anti-thrombotic agents based on heparin structure-derived compounds.

## 2. Experimental

### 2.1. Computational methods

**2.1.1. Nomenclature and software.** Recommendations and nomenclature symbols proposed by IUPAC<sup>14</sup> were used. The relative orientation of a pair of contiguous sugar residues (e.g., iduronic acid, glucosamine, and/or glucuronic acid) is described by two torsional angles at the glycosidic linkage, denoted  $\phi$  and  $\psi$ . For a (1→4)-linkage the definitions are those shown in Eqs. 1 and 2,

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

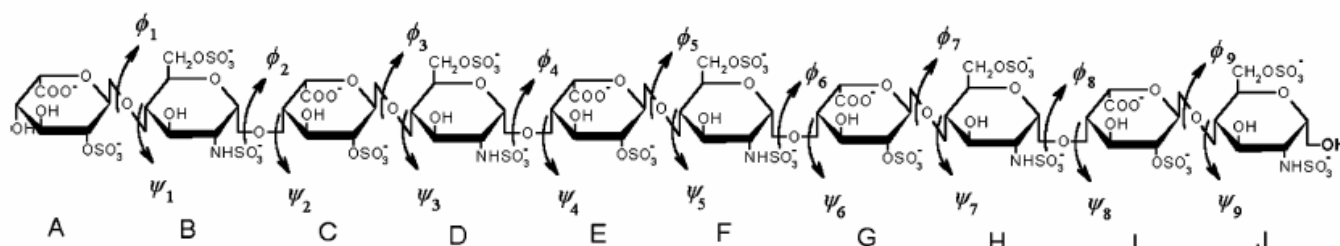
$$\psi = \text{C}-1-\text{O}-1-\text{C}-4'-\text{C}-5' \quad (2)$$

The decasaccharide topologies were generated with the PRODRG program,<sup>15</sup> and the ab initio calculations were performed using GAMESS.<sup>16</sup> Manipulation of structures was performed with the MOLDEN program,<sup>17</sup> and all MD calculations and analysis were performed using the GROMACS simulation suite and force field.<sup>18,19</sup>

**2.1.2. Topology construction.** The building of a heparin decasaccharide (Fig. 1) structure has already been described.<sup>7</sup> Briefly the heparin fragment was retrieved from protein data bank under code 1HPN.<sup>8</sup> This dodecasaccharide was reduced to a decasaccharide structure and then submitted to the PRODRG server.<sup>15</sup> The resultant topology was further submitted to refinements, for example, atomic charges and improper dihedrals in order to define the conformational state of IdoA residue (<sup>1</sup>C<sub>4</sub> or <sup>2</sup>S<sub>0</sub>).<sup>7</sup>

**2.1.3. Atomic charge calculations.** The calculation of atomic charges suitable to heparin MD simulations has been previously described.<sup>7</sup> Briefly the monosaccharide residues GlcA, IdoA, and GlcN, in their negatively charged forms, were submitted to full geometry optimization using ab initio quantum-mechanical computations at the 3-21G level with GAMESS.<sup>16</sup> The conformations of IdoA and GlcN residues that were used were obtained directly from the 1HPN PDB file, including the endocyclic and exocyclic dihedral conformations, thus reproducing the solution conformation evaluated by NMR methods.<sup>8</sup> These minimal energy conformations were submitted to single-point ab initio calculations at the 6-31G\*\* level in order to obtain the Löwdin, Mulliken, and electrostatic potential (ESP) derived charges. Hessian matrix analyses were employed to unequivocally characterize the conformations thus obtained as true minima potential energy surfaces.

**2.1.4. Molecular dynamics calculations.** The dodecasaccharide conformation determined by NMR methods<sup>8</sup> (PDB entry 1HPN) was the starting point for all MD simulations performed. This structure, reduced to a decasaccharide fragment of heparin, was solvated in a rectangular box using periodic boundary conditions and the SPC/E<sup>20</sup> water model, and 20 Na<sup>+</sup> ions were added in order to neutralize the simulated system (water plus the decasaccharide). The box size was adjusted to give a physiological sodium concentration, that is, ~145.0 mM. Sodium ions were added as counter-ions by manually changing the water molecule closest to each negatively charged group. The total system size comprised ~18,500 atoms for all MD simulations (runs 1,



**Figure 1.** Decasaccharide A–J fragment of heparin. This structure shows five disaccharide repeating units of GlcN and IdoA residues. The dihedral angles  $\phi$  and  $\psi$  are indicated.

2, 3, and 4). These systems were submitted to a steepest descent minimization and MD simulations for 3 ns, applying the Particle-Mesh Ewald method,<sup>21</sup> 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 deca-saccharide structure, for example, that of the glycosidic linkage and intramolecular hydrogen bonds, were obtained by averaging over four or five values for the same linkage located in five different positions in the deca-saccharide. 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.<sup>11</sup> It should be noted that when a hydrogen bond occurs between a donor and multiple acceptors, for example, carboxylate and sulfate groups, only the lowest distance of two or three possibilities was retrieved at each frame of MD. As a result we have an average distance representative of multiple interactions. A reference value of 3.5 Å between heavy atoms was considered for a hydrogen bond,<sup>22</sup> and a cutoff angle of 60° was used between donor–hydrogen–acceptor.<sup>19</sup>

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Atomic charges

We have previously determined a protocol to reproduce at a reasonable level of accuracy the heparin conformation in explicit aqueous solution using a non-carbohydrate force field.<sup>7</sup> More recently we applied such parameters in the study of the heparin–AT complex, being able to observe to some extent the conformational modifications induced in AT by heparin and to correctly predict the interaction energy in such a complex in an 8.0 ns simulation (Verli and Guimarães, manuscript in preparation).

In these studies, we have used atomic charges for heparin residues derived from a Löwdin population analysis.<sup>7</sup> In fact, this choice was motivated due to the tendency of Mulliken analysis to place all the charge on the oxygen

atom.<sup>23</sup> However, studies describing the influence of distinct atomic charge schemes in polysulfated polysaccharide dynamics are, to our knowledge, so far missing.

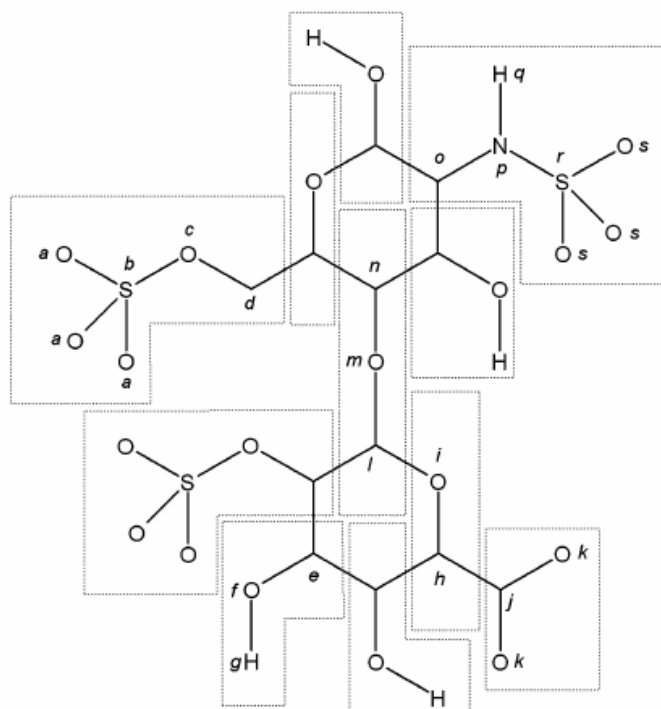
In order to fulfill this lack of information, regarding the choice of methods to parameterize carbohydrate-based force fields, we proceeded to the evaluation of both Löwdin and Mulliken population analysis and electrostatic potential derived charges (ESP) in the representation of heparin conformation in solution using molecular dynamics simulations. The calculated values of such atomic charges are presented in Table 1.

The data presented in Table 1 indicate that Mulliken analysis presents the greatest modular charge for 14 atoms in a total of 19, including oxygen atoms from sulfate and hydroxyl groups (Table 1), inducing an increase in the dipole of chemical bonds. The consequence of such a profile would be an increase in the electrostatic interactions within the molecule and with the surrounding environment. Regarding the comparison between Löwdin and ESP charges, these values are more similar between one another than with Mulliken charges. Furthermore, important charge differences can be observed in Table 1. For instance, the sulfate group is more charged in Löwdin charges than in ESP charges, while the carboxyl and hydroxyl groups are more charged in the ESP scheme than in the Löwdin scheme. In the sulfonamide group the charges are almost identical.

The unique characteristics observed in each group of atomic charges can be related to a previous works of Pérez et al., where several different parameterizations of force fields applied to carbohydrate simulation were compared.<sup>24</sup> In fact, it is possible that the accuracy of the data obtained from MD simulations using the above-mentioned charges depends on the system under study. We then decided to focus the application of these charges in heparin simulation in water, using the MD protocol previously described by our group,<sup>8</sup> and in the identification of which charges give better results describing such a system.

#### 3.2. Conformation of IdoA

The internal iduronate residues can adopt an equilibrium between chair <sup>1</sup>C<sub>4</sub> and skew-boat <sup>2</sup>S<sub>0</sub> forms,<sup>25</sup> as this flexibility is proposed to contribute to the unique

**Table 1.** Schematic representation of the atomic charges calculated for heparin uronic acids and glucosamine residues<sup>a</sup>

Atoms		Atomic charges <sup>b</sup>		
		Löwdin <sup>c</sup>	Mulliken	ESP charges
Sulfate	<i>a</i> (O)	-0.774	<b>-0.799</b>	-0.672
	<i>b</i> (S)	1.612	<b>1.783</b>	1.307
	<i>c</i> (O)	-0.515	<b>-0.763</b>	-0.431
	<i>d</i> (C)	0.225	<b>0.377</b>	0.140
Hydroxyl	<i>e</i> (C)	0.160	<b>0.356</b>	0.331
	<i>f</i> (O)	-0.400	<b>-0.759</b>	-0.735
	<i>g</i> (H)	0.240	0.403	<b>0.404</b>
Ether	<i>h</i> (C)	0.242	<b>0.420</b>	0.253
	<i>i</i> (O)	-0.242	<b>-0.420</b>	-0.253
Carboxyl	<i>j</i> (C)	0.172	0.650	<b>0.862</b>
	<i>k</i> (O)	-0.586	-0.825	<b>-0.931</b>
Glycosidic linkage	<i>l</i> (C)	0.254	<b>0.565</b>	0.285
	<i>m</i> (O)	-0.396	<b>-0.785</b>	-0.397
	<i>n</i> (C)	0.142	<b>0.220</b>	0.112
Sulfonamide	<i>o</i> (C)	0.095	<b>0.131</b>	0.095
	<i>p</i> (C)	-0.476	<b>-0.807</b>	-0.476
	<i>q</i> (H)	<b>0.192</b>	0.175	<b>0.192</b>
	<i>r</i> (S)	1.553	<b>1.790</b>	1.553
	<i>s</i> (O)	<b>-0.788</b>	-0.763	<b>-0.788</b>

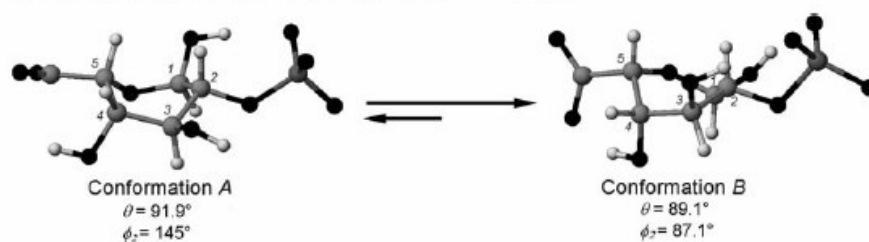
<sup>a</sup>The charges are presented for each atom (designed from *a* to *s*), within each charge group of a disaccharide unit, using Mulliken, Löwdin, and ESP schemes.

<sup>b</sup>The largest modular values are presented in boldface type.

<sup>c</sup>Data obtained from Ref. 7.

heparin-binding properties as compared to the lower antithrombotic activity of glycosaminoglycans presenting more rigid uronate residues.<sup>9</sup> In this context, the observation of IdoA minimization by an *ab initio* 3-21G basis set prior to the HF/6-31G\*\* (see methods for details), starting from the NMR obtained conformation, reveals some important features (Table 2).

As indicated in Table 2, the minimum-energy conformation of IdoA (conformation B) obtained by the HF/3-21G basis set unexpectedly showed a reorientation of some atoms during minimization, modifying the IdoA ring conformation related to the NMR conformation (conformation A, Table 2). While the interatomic distances within the residue did not change to a great extent

**Table 2.** Conformational modification of IdoA monomer during 3-21G minimization<sup>a</sup>

Conformation	Distances (Å)							
	H-1-H-2	H-1-H-3	H-1-H-4	O-1-O-4	H-1-H-5	H-2-H-4	H-3-H-4	H-4-H-5
A <sup>b</sup>	3.08	2.86	4.62	5.02	3.58	3.03	3.07	2.40
B <sup>c</sup>	3.00	2.88	3.93	4.25	3.74	3.64	2.64	2.47
Difference <sup>d</sup>	0.08	-0.02	<b>0.69</b>	<b>0.77</b>	-0.16	-0.61	0.43	-0.07

<sup>a</sup>The Cremer–Pople puckering parameters  $\theta$  and  $\phi_2$  relative to conformations A and B are presented, as well as the distances between the atoms connected to positions-1 and -4 of the ring. Atoms are shown as follows: hydrogen in white, oxygen in black, sulfur in dark gray and carbon in light gray.

<sup>b</sup>Conformation obtained from NMR data, Ref. 8.

<sup>c</sup>Conformation obtained after minimization using the 3-21G ab initio method.

<sup>d</sup>The distance in conformation A subtracted from the distance in conformation B. Negative values correspond to distances that increases in conformation B, whereas positive values correspond to distances that decreases in conformation B.

(i.e., <1.0 Å), the greatest changes are located between the atoms connected to positions-1 and -4 of the saccharide residue (~0.7 Å), which are the positions responsible for the 1→4 glycosidic linkages of heparin (Table 2).

The importance of such apparently small conformational modifications can be highlighted looking at the internal dihedral angles of IdoA (Table 3). Some angles presented structural torsions of about ~60°, a modification capable of reorienting the saccharide side chains, for example, the sulfate and hydroxyl groups, and consequently modifying both intramolecular hydrogen bonds and the interactions with the surrounding medium, which has previously been suggested to contribute to the global heparin conformation.<sup>7</sup>

In order to study saccharide ring conformations the Cremer–Pople representation<sup>26</sup> was also considered, where the general definition of the ring puckering coordinates involves the calculation of phase angles  $\phi_2$  and  $\theta$ . According to this representation, the  $\phi_2$  and  $\theta$  angles were evaluated for both conformations A and B and are presented in Table 2.

**Table 3.** Internal dihedral angles of IdoA and its variation from the NMR-determined conformation (conformation A) and the HF/3-21G minimized structure (conformation B)<sup>a</sup>

Dihedral angle	Conformation A	Conformation B
C-1-C-2-C-3-C-4	-57.23	-30.25
C-2-C-3-C-4-C-5	21.96	-30.43
C-3-C-4-C-5-O-6	38.88	60.12
C-4-C-5-O-6-C-1	-72.10	-25.16
C-5-O-6-C-1-C-2	34.44	-32.95
O-6-C-1-C-2-C-3	29.74	64.33

<sup>a</sup>The structures of conformations A and B are presented in Table 2.

The phase angles obtained for conformation A,  $\phi_2 = 145^\circ$  and  $\theta = 91.9^\circ$ , describes the  ${}^2S_0$  geometry ( $\phi_2 = 150^\circ$  and  $\theta = 90^\circ$ ), as previously described,<sup>8</sup> while the phase angles of conformation B,  $\phi_2 = 87.1^\circ$  and  $\theta = 89.1^\circ$ , represents another conformer of the boat-skew boat pseudorotational family,<sup>27</sup> matching to the  ${}^5S_1$  conformation ( $\phi_2 = 90^\circ$  and  $\theta = 90^\circ$ ). In fact, initial research on the IdoA conformation had pointed to other possible conformations for this residue,<sup>28,29</sup> although NMR studies reinforced the  ${}^2S_0$  conformation.<sup>25</sup> Such rationalization, based on the observed vicinal coupling constants, employed the empirical generalization of the Karplus equation proposed by Haasnoot et al.<sup>30</sup> This equation relates the vicinal coupling constants to the torsional angle between the coupling protons and accounts for the effects of electronegativity and the relative position of substituents attached to the H–C–C–H fragment. The application of such a relation requires that the H–C–C–H torsional angles be computed for geometrical models of each conformer, usually provided by molecular-mechanics calculations,<sup>29</sup> and this is the point where the results here presented differ from previous data regarding IdoA conformation. The lack of electron representation in force field calculations, together with the problems in adequately describing the properties of hypervalent groups (e.g., sulfonamide and sulfate),<sup>31</sup> remove important factors in conformational stabilization. As a consequence of the consideration of such stereo-electronic effects in ab initio calculations, one can expect that the energy map for the equatorial pseudorotational path of IdoA would be considerably different from previous data based on force field calculations,<sup>29</sup> and so would the relative stability of each conformation. In doing so, the use of those minimum-energy



conformations evaluated by quantum-mechanical methods in the rationalization of vicinal coupling constants is a necessary development.

In the context of the real importance of such conformational modification to heparin structure and conformation, it should be noted that experimental approaches based on the measurement of NMR coupling constants<sup>32</sup> or chemical shifts<sup>33</sup> usually lack precision<sup>11</sup> (NMR-based 3D structure determination has a resolution limitation of about 2–3 Å<sup>34</sup>), whereas angles derived theoretically that have been obtained from molecular mechanics energy calculations must be viewed with caution owing to their force-field dependence.<sup>11</sup> Moreover, the use of experimentally determined restraints during energy minimization can result in the formation of ‘virtual conformers’,<sup>35</sup> molecular conformations that are not at the global energy minimum. So next in the text we evaluate the effect of the atomic charge schemes (Löwdin, Mulliken, and ESP charges) and the two observed conformations of the IdoA residues (conformations A and B) in heparin dynamics using MD simulations.

### 3.3. MD simulations and IdoA conformations evaluation

Using the protocols previously described by our group in evaluating heparin conformation under the <sup>2</sup>S<sub>0</sub> and <sup>1</sup>C<sub>4</sub> conformations of IdoA,<sup>7</sup> we performed an MD simulation of a heparin decasaccharide considering the two accessed conformations of IdoA (conformations A and B), as well as the Löwdin, Mulliken, and ESP charges. The heparin conformation so obtained, described by its glycosidic linkages, is described in Table 4.

Related to the evaluation of distinct atomic charge schemes, the MD simulations indicate that the Löwdin and ESP charges give similar results in the description of heparin conformations (runs 2 and 4). The Mulliken basis set (run 3), however, presents a different behavior, showing a deviation of almost 15° in the IdoA→GlcN  $\phi$  angle related to the Löwdin and ESP charges (Table 4).

Related to the evaluation of distinct conformations of IdoA, the simulation of heparin with the conformation

A (run 1) produces an average geometry for the GlcN→IdoA  $\psi$  angle that deviates  $\sim 30^\circ$  from the NMR reference conformation, as previously described.<sup>7</sup> A correct description of this dihedral angle was achieved only by the substitution of the experimental conformation (conformation A) by the HF/3-21G conformation (conformation B) of the IdoA residue, as the difference between the conformations A and B is smaller than 1 Å (Table 2). In fact, a so small conformational modification in IdoA being capable of generating such a meaningful effect in the heparin conformation must be carefully observed with regard to both the molecular simulation and biological activity aspects. It is important to note that run 2 (with IdoA residues in the conformation B) is generated from the last structure obtained in run 1 (with IdoA residues in the conformation A), which was submitted to energy minimization in order to modify the IdoA conformation. In the same way, by taking the last structure of run 2 and changing its IdoA residues to the NMR conformation A, the dihedral angles obtained in a 3.0 ns MD simulation are equal to the values of run 1, which confirms the reproducibility and reversibility of this process, and thus the reliability of the data so obtained.

As we previously suggested, the intramolecular hydrogen bonds may be the main forces responsible for, and allowing an accurate reproduction of heparin conformational structure by MD methods.<sup>7</sup> Thus, in order to elucidate the origins of such conformational modification we performed an analysis of such interactions in the MD simulations (Table 5).

Our previous results suggested that the correct representation of the heparin structure under different conformations of IdoA (i.e., <sup>2</sup>S<sub>0</sub> and <sup>1</sup>C<sub>4</sub>) has a large contribution from the intramolecular hydrogen bonds.<sup>7</sup> For example, a hydrogen bond between the carboxyl group from IdoA and the hydroxyl group of GlcN could be the main factor in determining the NMR conformation of the GlcN→IdoA  $\psi$  angle. This conclusion was based in the observation of the distance representing such interactions in run 1, which was about 1 Å larger than the distance described in the 3D structure of

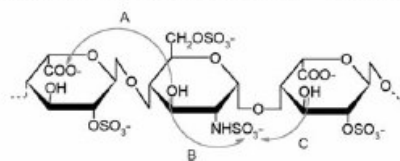
**Table 4.** Average dihedral angles and NMR reference values for the <sup>2</sup>S<sub>0</sub> conformation of IdoA MD simulations using different atomic charge basis sets (Löwdin, Mulliken, and ESP charges) and the conformations A and B of the IdoA residue

Dihedral angle	<sup>2</sup> S <sub>0</sub> NMR <sup>a</sup>	Average dihedral (°)			
		Run #			
		Löwdin		Mulliken	ESP
		1 <sup>b</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	4 <sup>c</sup>
IdoA→GlcN $\phi$	–55	–75 ± 11	–75 ± 15	–90 ± 14	–77 ± 15
IdoA→GlcN $\psi$	–107	–117 ± 11	–121 ± 11	–127 ± 11	–118 ± 10
GlcN→IdoA $\phi$	109	97 ± 14	89 ± 13	93 ± 15	88 ± 12
GlcN→IdoA $\psi$	–158	–125 ± 15	–151 ± 15	–145 ± 13	–145 ± 15

<sup>a</sup>Data obtained from PDB code 1HPN, Ref. 8.

<sup>b</sup>Simulation performed with IdoA residues in conformation A (Table 2).

<sup>c</sup>Simulation performed with IdoA residues in conformation B (Table 2).

**Table 5.** Average MD intramolecular hydrogen bond distances and NMR reference values in heparin

Hydrogen bond	Distance (Å)				
	<sup>2</sup> S <sub>0</sub> NMR <sup>a</sup>	Run #			
		Löwdin		Mulliken	ESP
		1 <sup>b</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	4 <sup>c</sup>
A	3.4	3.8 ± 0.5	4.2 ± 0.5	4.0 ± 0.4	4.2 ± 0.4
B	2.8	3.7 ± 0.6	4.8 ± 0.8	5.0 ± 0.8	5.2 ± 0.9

<sup>a</sup>Data obtained from PDB code 1HPN, Ref. 8.

<sup>b</sup>Simulation performed with IdoA residues in conformation A (Table 2).

<sup>c</sup>Simulation performed with IdoA residues in conformation B (Table 2).

heparin<sup>8</sup> (see Table 5). In other words, the increase in the distance between the carboxyl and hydroxyl groups would induce a weaker interaction and thus an extension of the glycosidic linkage at this point. However, looking at the data presented in Table 5, the distance relative to this interaction in run 2 that correctly predicts the geometry of the GlcN→IdoA  $\psi$  angle, is 2 Å larger than that from the NMR reference. This is an intriguing feature, suggesting that intramolecular hydrogen bonds may not be the only factors in determining heparin three-dimensional dynamics in solution. So we move in the direction of studying the intermolecular interactions, that is, the interaction of heparin with its counter ions and water. These interactions were analyzed by means of the average interaction energy and are described in Table 6.

In agreement with the idea of additional forces in the determination of heparin structure in solution, the observation of the atomic charges of the carboxyl group described by Löwdin and ESP charges basis sets indicates a 2-fold difference. In spite of this fact, such a modification in the electrostatic properties of the carboxyl group is not capable of modifying the intramolecular interactions nor the heparin conformation, since Löwdin (run 2) and ESP charges (run 4) generate the same heparin geometry. However, this difference is capable of inducing an increase of almost 70% in the interactions

with the sodium ions on the system (Table 6), while the interaction with water does not present a change of the same magnitude.

As an example of the influence of the interaction energy between heparin and the surrounding medium it is the geometry of the IdoA→GlcN  $\phi$  angle with Mulliken charges compared to Löwdin and ESP charges. The Mulliken method produces strong negative charges on the oxygen atoms of the sulfate and sulfonamide groups (Table 1). These negative charges increase the interaction energy of the heparin decasaccharide with sodium ions by almost 150% related to Löwdin atomic charges, which is correlated with the increase in the IdoA→GlcN  $\phi$  angle. It must be noted, however, that the influence of atomic charge is not linear, and the system is flexible enough to accommodate its electrostatic properties to some extent without compromising the global structure of the molecule of the decasaccharide under study. Above such limits (those for heparin appear to be determined by the ESP adjusted charges), conformational modifications in the solute structure can be observed, as is being observed with Mulliken charges.

The data presented in Table 6 highlight the pitfalls in choosing atomic charge basis sets to parameterize molecular mechanics force fields in molecules presenting hypervalent groups. While the different charge schemes

**Table 6.** Average interaction energy between the heparin decasaccharide and sodium ions or solvent molecules<sup>a</sup>

Molecules interacting	Interaction energy (kJ/mol)			
	Run #			
	Löwdin		Mulliken	ESP
	1 <sup>b</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	4 <sup>c</sup>
Heparin–Na <sup>+</sup>	–632.95 ± 256.65	–883.79 ± 149.62	–2074.32 ± 195.88	–1400.37 ± 289.23
Heparin–water	–6456.19 ± 284.82	–6279.39 ± 196.72	–6009.12 ± 214.35	–6373.51 ± 255.72

<sup>a</sup>Data obtained from PDB code 1HPN, Ref. 8.

<sup>b</sup>Simulation performed with IdoA residues in conformation A (Table 2).

<sup>c</sup>Simulation performed with IdoA residues in conformation B (Table 2).

can give similar descriptions of the three-dimensional structure of the molecule under study (Table 4), it can be observed at the same time differences in the interaction energy with the surrounding medium up to 1000 kJ/mol (Table 6).

The interaction energy between the heparin deca-saccharide and the surrounding medium (Table 6) presents high variations, mainly as a consequence of the molecular diffusion in the system. At the same time, the standard deviation is considerably constant within the same atomic charge basis set, indicating an intrinsic property, dependent on the non-bonded parameters of the system. By comparing the results of runs 1 and 2 (Table 6), it can be noted that the change in IdoA conformation decreases in about  $\sim 200$  kJ/mol the interaction energy between heparin and sodium ions, with a concomitant increase in the interaction with water (Table 6).

Apparently, the conformational modification of IdoA is capable of exposing its charged groups, that is, carboxylate and sulfate, increasing its interaction with the counter ions of the surrounding medium. While this modification is small when expressed in interatomic distances ( $<1$  Å, Table 2), it is more meaningful when expressed in torsion angles of the IdoA ring ( $\sim 60^\circ$ , Table 3), suggesting the reorientation of the saccharide side chains. The intensification in intermolecular interactions due to the IdoA change in the HF/3-21G conformation has the consequence of modifying the geometry of the glycosidic linkage, mainly the GlcN $\rightarrow$ IdoA  $\psi$  angle, allowing a correction in the description of the representation of the heparin structure.

It is somewhat surprising that small structural modifications in the IdoA conformation, even smaller than 1 Å, induce a  $\sim 200$  kJ/mol change in the intermolecular interactions within the simulated systems, indicating a unique sensitivity of these polysulfated molecules to small conformational modifications. An energy contribution of such magnitude to the ligand–receptor complex is, with no doubt, of great biological importance. For instance, this value corresponds to approximately one-third of the total energy interaction between the synthetic pentasaccharide and AT, estimated previously by MD simulations (Verli and Guimarães, manuscript in preparation).

#### 4. Conclusions

The use of NMR experiments for conformational studies of oligosaccharides differs significantly from that of proteins, in part because distance geometry calculations for such molecules are complicated due to their flexible nature.<sup>36</sup> In this context, computational methods, mainly molecular mechanics and molecular dynamics, are required as additional aids to comple-

ment the experimental data.<sup>36</sup> However, there is still no molecular mechanics force field parameterization capable of adequately reproducing all polysaccharide conformational features, that is, high polar functionality, flexibility, and conformational/configurational changes, like the anomeric, exo-anomeric, and gauche effects.<sup>6</sup> In this context, the data presented here support the indication and use of molecular modeling techniques to refine experimental data, including ab initio calculations, thus improving their capabilities to describe biological and chemical phenomena by computational methods.

Here we present a molecular modeling study comparing different atomic charge basis sets, that is, Löwdin, Mulliken, and ESP charges, in heparin simulation using MD in order to determine the best parameters to describe the solution properties of such a polysaccharide. Based on MD simulations of heparin in aqueous solution, the use of Löwdin atomic charges appears to be an adequate choice for parameterization of molecular mechanics force fields, with similar results when compared to ESP atomic charges, without a conformationally dependent behavior.

Moreover, in the energy minimization process of heparin residues, we observed a conformational modification in the IdoA residue. This new conformation, corresponding to a  ${}^5S_1$  form, was then inserted into MD simulations of heparin and was shown to be responsible for a  $25^\circ$  correction in the heparin GlcN $\rightarrow$ IdoA  $\psi$  angle description compared to the use of the NMR conformation in heparin MD, even based on an ab initio calculation without considering the solvent effect. Since the accuracy of a method can be judged by how well it reproduces known quantities,<sup>37,38</sup> we propose this new conformation as an alternative in refining the NMR heparin conformation data presented previously by Mulloy et al.<sup>8</sup>, corresponding to a small torsion in the IdoA residues that induced changes in the distances within the residue atoms in less than 1 Å. These small changes were, however, able to change the interaction energy of heparin with the surrounding medium by about  $\sim 200$  kJ/mol, thus indicating an unusual sensitivity of polysulfated carbohydrate polymers to small conformational modifications.

Throughout the fine tunings of polysaccharide structures as presented here for elucidation of molecular aspects of heparin interaction with its target proteins, we were able to find that small structural modifications even smaller than 1 Å can produce a large energy contribution to the system, thus affecting ligand–receptor complexes, so with a significant biological importance. It is concluded that the more frequent use of molecular modeling methodologies for GAGs and heparin-derived compounds can potentially contribute to the design of new antithrombotic agents.

### Acknowledgments

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), MCT, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brazil, for their financial support.

### References

- 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.
- Silva, M. E.; Dietrich, C. P. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 6841–6846.
- Linker, A.; Hovingh, P. *Carbohydr. Res.* **1984**, *127*, 75–94.
- Gettins, P. G. W. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4751–4803.
- Ragazzi, M.; Ferro, D. R.; Perly, B.; Petitou, M.; Choay, J. *Carbohydr. Res.* **1990**, *195*, 169–185.
- Imberty, A.; Pérez, S. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4567–4588.
- Verli, H.; Guimarães, J. A. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 281–290.
- Mulloy, B.; Forster, M. J.; Jones, C.; Davies, D. B. *Biochem. J.* **1993**, *293*, 849–858.
- Mikhailov, D.; Mayo, K. H.; Vlavov, I. R.; Toida, T.; Pervin, A.; Linhardt, L. J. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 93–102.
- Fahem, S.; Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Linhardt, R. J.; Rees, D. C. *Science* **1996**, *276*, 1116–1120.
- Mikhailov, D.; Linhardt, L. J.; Mayo, K. H. *Biochem. J.* **1997**, *328*, 51–61.
- Woods, R. J.; Pathiaseril, A.; Wormald, M. R.; Edge, C. J.; Dwek, R. A. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 372–386.
- Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, P. A.; Kollman, J. J. *Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269–10280.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *J. Mol. Biol.* **1970**, *52*, 1–17.
- (a) Schuettelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F. *Acta Crystallogr.* **2004**, *D60*, 1355–1363; (b) <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>.
- 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. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363.
- Schaftenaar, G. MOLDEN. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, 1997.
- Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43–56.
- van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. *GROMACS User Manual, v. 3.0*, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 2001.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269–6271.
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1992**, *98*, 10089–10092.
- Luzar, A.; Chandler, D. *Nature* **1996**, *379*, 55–57.
- Leach AR *Molecular Modeling Principles and Applications*, 2nd ed.; Pearson Education: Harlow, UK, 2001, pp 79–80.
- Pérez, S.; Imberty, A.; Engelsens, 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. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 141–155.
- Ferro, D. R.; Provasoli, A.; Ragazzi, M.; Torri, G.; Casu, B.; Gatti, G.; Jacquinet, J.-C.; Sinaÿ, P.; Petitou, M.; Choay, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6773–6778.
- Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354–1358.
- 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: New York, 1995, pp 71–77.
- Nieduszynski, I. A.; Gardner, K. H.; Atkins, E. D. T. *ACS Symp. Ser.* **1977**, *48*, 73–80.
- Ragazzi, M.; Ferro, D. R.; Provasoli, A. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 105–112.
- Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783–2792.
- Clare, B. W.; Supuran, C. T. *J. Mol. Struct.* **1998**, *428*, 109–121.
- Tvaroska, I.; Hricovani, M.; Petrakova, E. *Carbohydr. Res.* **1989**, *189*, 359–362.
- Bruyn, A. *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 159–180.
- Markley, J. L.; Ulrich, E. L.; Westler, W. M.; Volkman, B. F. Macromolecular Structure Determination by NMR Spectroscopy. In *Structural Bioinformatics*; Bourne, P. E., Weissig, H., Eds.; Wiley-Liss: New York, 2003, pp 89–113.
- Cumming, D. A.; Carver, J. P. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6664–6676.
- Peters, T.; Pinto, B. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 710–720.
- van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 992–1023.
- Karplus, M.; Petsko, G. A. *Nature* **1990**, *347*, 631–639.

#### **4.5 Trabalho IV**

Nos dois trabalhos anteriores foi possível demonstrar que a DM é capaz de reproduzir o comportamento conformacional da heparina em solução aquosa, próxima de condições fisiológicas. Desta forma, foram criadas as condições necessárias à simulação por DM do complexo heparina-AT, de forma a observar os detalhes dinâmicos deste reconhecimento molecular.

Assim sendo, o presente trabalho descreve o complexo formado pela AT com o pentassacarídeo sintético, utilizando simulações de DM. Os resultados obtidos, em comparação com a simulação de cada molécula livre em solução, permitiram a observação de um mecanismo do tipo encaixe-induzido na formação do complexo.

Simultaneamente, foi observada a exposição do resíduo P1 (Arg393) durante a DM, enquanto que a conformação cristalográfica apresenta este resíduo escondido do solvente. Estes resultados sugerem que a orientação cristalográfica é devida a efeitos de empacotamento, ao mesmo tempo em que explicam a especificidade do reconhecimento serpina-protease.

O efeito da conformação do resíduo IdoA,  ${}^2S_0$  ou  ${}^1C_4$ , na interação com a AT foi também avaliado, sugerindo que este não é um requerimento necessário à interação com a AT. Estes dados demonstram a capacidade da DM assistir ao desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos, baseados no mecanismo de ação da heparina, ao permitirem a caracterização e quantificação das interações e eventos-chave para formação do complexo ligante-AT.

### **Insights into the induced fit mechanism in Antithrombin-heparin interaction using using molecular dynamics simulations**

**Hugo Verli, Jorge A. Guimarães**

*J. Mol. Graph. Mod.*, **2005**, *24*; 203-212



## Insights into the induced fit mechanism in antithrombin–heparin interaction using molecular dynamics simulations

Hugo Verli, Jorge A. Guimarães\*

*Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500,  
CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil*

Received 18 July 2005; accepted 22 July 2005

Available online 16 September 2005

### Abstract

Heparin was isolated in the beginning of the 20th century and until today remains as one of the most important drugs able to interfere with the haemostatic process. Due to the side effects produced by heparin therapy, new promising drugs have been developed, as the synthetic pentasaccharide (synthetically derived from the sequence GlcN-GlcA-GlcN-IdoA-GlcN). The anticoagulant activity of this compound is based on potentiation of antithrombin (AT) inhibitory activity upon serine proteinases of clotting cascade, a mechanism based on the conformational modification of AT. In this context, we present here a molecular dynamics (MD) study of the interaction between the synthetic pentasaccharide and AT. The obtained data correctly predicted an induced fit mechanism in AT–pentasaccharide interaction, showing a solvent-exposed P1 residue instead of a hidden conformation. Also, the specific contribution of important amino acid residues to the overall process was also characterized, both in  $^2S_0$  and  $^1C_4$  conformations of IdoA residue, suggesting that there is no conformational requirement to the interaction of this residue with AT. Altogether, the results show that MD simulations could be used to characterize and quantify the interaction of synthetic compounds with AT, predicting its specific capacity to induce conformational changes in AT structure. Thus, MD simulations of heparin (and heparin-derived)–AT interactions are proposed here as a powerful tool to assist and support drug design of new antithrombotic agents.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Carbohydrate; Molecular dynamics; Serpin; Antithrombin; Synthetic pentasaccharide; Heparin; Induced fit

### 1. Introduction

Heparin was identified and then isolated in 1916 from a preparation of dog liver, being the first compound used clinically as anticoagulant and antithrombotic agent [1]. It is mainly composed of hexasaccharide units containing iduronic acid (IdoA) 2-sulfate, glucosamine (GlcN) 2,6-disulfate, and non-sulfated glucuronic acid (GlcA) [2], whereas small variations may occur among heparins from different sources [1]. Until today, heparin remains as one of the most important and efficient antithrombotic therapeutic agents because of its ability to interfere with the haemostatic process. Most recently, new promising drugs, as the synthetic pentasaccharide (Fig. 1), has been approved for clinical use [3].

The anticoagulant activity of heparin and other negatively charged glycosaminoglycans is due to the activation of a plasma protein called antithrombin (AT). This protein belongs to the serpin (serine proteinase inhibitors) protein family and is responsible for the inhibition of physiologically active plasma serine proteinases like fIIa and fXa. The activation of AT by heparin is due to two main mechanistic components: (1) a bridging interaction through which the linear heparin molecule binds simultaneously to both AT and proteinase; and (2) a conformational change-based mechanism in which the heparin binding induces AT conformational changes, increasing its reactivity towards the target proteinase [4].

The reactive bond that interacts with the active site of target proteinases lies on a loop denoted as reactive center loop (RCL), which comprises in AT structure the sequence between residues Asn376 and Arg393, i.e. P17 and P1,

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316 6068; fax: +55 51 3316 7309.  
E-mail address: [guimar@cbiot.ufrgs.br](mailto:guimar@cbiot.ufrgs.br) (J.A. Guimarães).

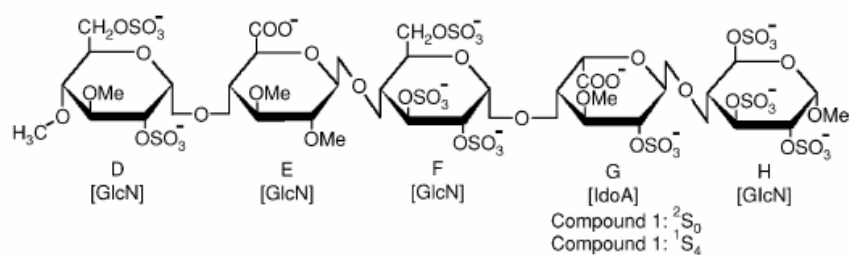


Fig. 1. Structure of the synthetic pentasaccharide compounds 1 ( ${}^2S_0$ ) and 2 ( ${}^1C_4$ ). Concerning the nomenclature used for each carbohydrate residue, see Section 2.

respectively, using the notation of Schechter and Berger [5]. In the native conformation, the RCL lies outside the tertiary core of the serpin main structure, i.e. in a solvent-exposed environment. However, in crystallographic structures this region is often involved in protein–protein contacts [6–8], already reported as a necessary event in order to support the observation of RCL coordinates in the final three-dimensional structure [9].

Efforts to elucidate the heparin recognition by AT–proteinase complex at the atomic level have faced difficulties in structure determination and dynamics regarding the participation of polysaccharides in general [10]. Just recently a work of Li et al. [11] presented the crystallographic structure of the complex between heparin, AT and thrombin. In this context, we have previously presented a reliable molecular dynamics (MD) protocol to simulate heparin in physiological conditions, e.g. salt concentration and explicit water representation [12]. The use of this MD methodology allowed simulation of carbohydrates in their natural environment, describing its dynamic properties with a reasonable level of accuracy.

The aim of this work is to evaluate the dynamics of AT–heparin complex, using the synthetic pentasaccharide (compound 1, Fig. 1) as a model. We also studied the influence of IdoA conformational equilibrium in heparin recognition. To this purpose, 8.0 ns MD simulation of both unbound AT and AT bounded to compound 1 has been performed. The results of these simulations are compared to crystallographic and mutagenesis data, concerning the AT–heparin system, to validate the obtained data. Finally, a MD-based scheme for heparin conformational modulation of AT is proposed, in which the IdoA conformation is not a requirement to formation of the AT–heparin complex. Also, several of the AT conformational modifications induced by heparin were well predicted, as the side chain conformation of Arg393 (P1) being solvent-exposed instead of solvent hidden, apparently due to crystallographic contacts. This is, to our knowledge, the first report describing such mechanisms using MD simulations.

## 2. Methods

### 2.1. Nomenclature and software

The recommendations and symbols of nomenclature as proposed by IUPAC [13] were used. The relative orientation

of a pair of contiguous sugar residues (e.g. iduronic acid, glucosamine and/or glucuronic acid) is described by two torsional angles at the glycosidic linkage, denoted  $\phi$  and  $\psi$ . For a (1 → 4) linkage the definitions become those shown in Eqs. (1) and (2):

$$\phi = O5-C1-O1-C4' \quad (1)$$

$$\psi = C1-O1-C4'-C5' \quad (2)$$

The topologies of compounds 1 and 2 were generated with the PRODRG program [14], manipulation of structures was performed with MOLDEN [15], VMD [16], and MolMol [17] programs, the homology modeling was performed with the Swiss-PDB Viewer [18], and all the MD calculations and analysis were performed using the GROMACS simulation suite and force field [19,20].

Due to structural similarities between the synthetic pentasaccharide and heparin, the residues D, E, F, G, and H were named according to the heparin residues GlcN, GlcA, GlcN, IdoA, and GlcN, respectively. This nomenclature was chosen in order to facilitate further structure–activity relationships. The main differences between the residues of the synthetic polysaccharide and the natural polysaccharide are the methoxylation of hydroxyl groups and the substitution of sulfonamide groups by sulfate groups.

### 2.2. Topology construction

The topologies for compounds 1 and 2 were built as previously described [12]. The pentasaccharide structure in 1E03 PDB code, presenting its IdoA residue in a  ${}^2S_0$  conformation, was submitted to the PRODRG site [14], and the initial geometry and topologies were retrieved, corresponding to compound 1.

The two conformational states of IdoA residue ( ${}^2S_0$  and  ${}^1C_4$ ) were defined by the addition of improper dihedral angles in the respective topology files. These angles intend to fix the IdoA geometry in chair or skew-boat conformations, so the same topology obtained for compound 1 could be used for compound 2 just by changing the improper dihedral values (for details see [12]). The atomic charges were obtained from a previous work of our group [12].

### 2.3. Structure refinement and molecular simulations

The AT–pentasaccharide complex was retrieved from PDB under code 1E03 [21]. The gap between positions 28 and 37 was fulfilled by means of homology modeling using the Swiss-Pdb Viewer program [18]. Based on this structure the unbound AT and the complexes formed between AT and compounds 1 and 2 were built, comprising three systems simulated for 8.0 ns each one. In addition, the two compounds were isolated from AT comprising two systems simulated for 2.0 ns each one. These structures were solvated in a rectangular box using periodic boundary conditions and SPC/E water model [22]. Counter ions ( $\text{Na}^+$ ) were added to neutralize the system. The MD protocol employed was based on previous MD studies [23], as described [12,24]. The Lincs and Settle methods [25,26] were applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2fs after an initial energy minimization using Steepest Descents algorithm. Electrostatic interactions were calculated with Particle Mesh Ewald method [27]. Temperature and pressure were kept constant separately by coupling the protein, carbohydrate, ions, and solvent to external temperature and pressure baths with coupling constants of  $\tau = 0.1$  and  $0.5$  ps [28], respectively. The dielectric constant was treated as  $\epsilon = 1$ , and the reference temperature was adjusted to 310 K. The systems were heated slowly from 50 to 310 K, in steps of 5 ps, each one increasing the reference temperature by 50 K. To determine if a hydrogen bond exists, a geometrical criterion was used, i.e.  $r \leq 0.35$  nm (donor–acceptor distance) and  $\alpha \geq 120^\circ$  (donor–hydrogen–acceptor angle) [20]. Data concerning the structure of compounds 1 and 2 (i.e.

glycosidic linkage) and interaction energies were obtained by averaging the property over the entire simulation (8.0 ns for the complex simulations and 2.0 ns for the uncomplexed ligands).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Simulation systems

Three simulations, each one 8.0 ns long, were performed including the unbound AT and the complexes of AT with compounds 1 and 2 (Fig. 1). Compound 1 corresponds to the synthetic pentasaccharide in its crystallographic conformation, with the IdoA residue in a  ${}^2S_0$  twist-boat conformation while compound 2, with the same pentasaccharide structure, had its IdoA residue changed to a  ${}^1C_4$  chair conformation (see Section 2 for details). The AT structure in its inhibitory form was retrieved from PDB code 1E03. The simulation systems comprised about 47,000 atoms, including counter ions and solvent molecules. Simulations of 2.0 ns were also performed including only solvent, compound 1 or compound 2, and counter ions, without the AT molecule.

### 3.2. Simulation stability

To monitor the progress of the performed simulations we evaluated the root mean square deviation (RMSD) of the simulated complexes from the crystallographic structure as a function of time. As can be observed in Fig. 2, all simulations were stable during the performed time scale,

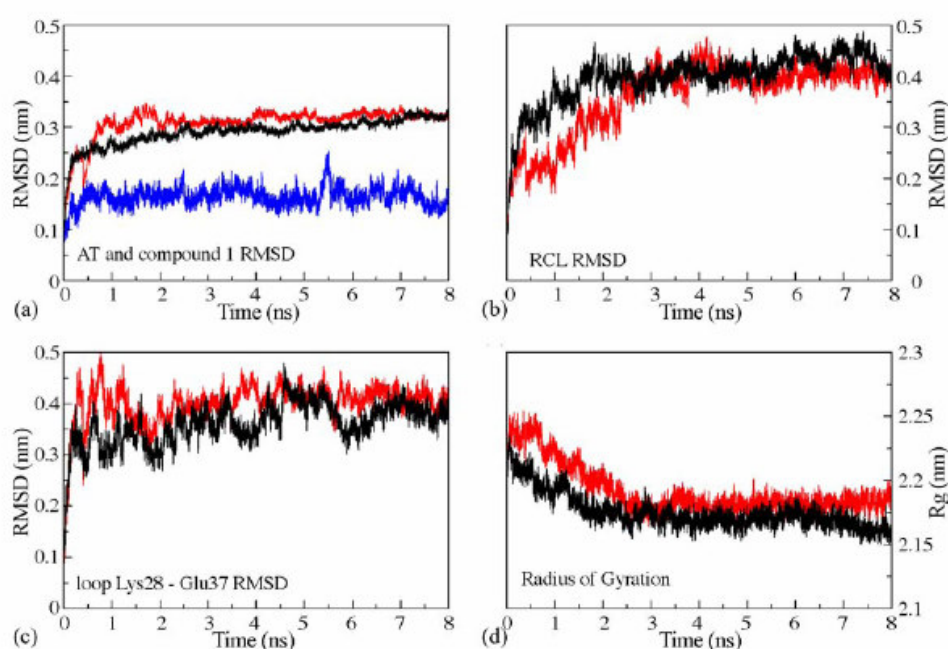


Fig. 2. All-atom RMSD from crystal structure and radius of gyration for unbound AT (red) and AT–compound 1 complex (black). (a) RMSD for bounded AT, for unbounded AT and for compound 1 (blue); (b) RMSD for the RCL sequence (comprising residues Asn376–Arg393, i.e. P17–P1); (c) RMSD for the loop-comprising residues Lys28–Glu37; and (d) radius of gyration.



with an average RMSD for the entire protein of about 0.3 nm for both complexed and uncomplexed AT. However, the unbound AT (red curve in Fig. 2a) presents a higher RMSD when compared to AT–compound 1 complex (black curve in Fig. 2a) for almost all the simulation time. This profile is probably due to the starting structure used in the simulations, i.e. the crystallographic complex between AT and compound 1 (1E03). Instead of using an unbound form of AT to simulate its free state, we decided to use the 1E03 structure, with the removal of compound 1. Doing so, we could observe the behavior of the conformational modifications induced in AT by compound 1 in its absence and in the presence of water. Therefore, in absence of compound 1 the forces that induce and stabilize these conformational changes are removed, so creating instabilities in AT solution simulations. Also a low RMSD value can be observed for compound 1 when complexed to AT (blue curve in Fig. 2a), as a possible consequence of the high affinity of polysulfated polysaccharides, such as compound 1, showing to be able to make specific complexes with AT.

The RMSD of the loop between positions 28 and 37 is presented in Fig. 2c. It seems that the high flexibility that this loop presents is indicative of its absence in serpin crystal structures, i.e. the diversity of conformations in solution could be kept in the crystal, creating a region of the crystalline cell with poor organization (see further).

As observed for the loop 28–37, the RCL also shows high flexibility (Fig. 2b). In this case, a slope can be clearly identified in the first 2.5 ns for unbounded AT (red curve in Fig. 2b) and in the first 2.0 ns for AT complexed with compound 1 (black curve in Fig. 2b). After this initial slope a stable profile is observed, with no clear distinction between the complexed and uncomplexed forms of AT. These slopes are highly correlated with the decreasing of radius of

gyration in the beginning of simulation (Fig. 2d), suggesting that a possible compacting process of the protein moiety is part of AT equilibration in solution.

### 3.3. Structural fluctuations of antithrombin

In order to assess the relative mobility of different regions of AT we analyzed the root mean square fluctuations (RMSF) as a function of residue number and time (Fig. 3) for unbound AT and AT–compound 1 complex. The analysis of the RMSF variation as a function of time, instead of a total average analysis, indicated some important features. As seen in Fig. 2, the equilibration of the simulated systems is markedly distinct over different regions of AT. The regions defined by the RCL and by the N-terminal loop, comprised by residues Lys28 and Glu37, present the slowest equilibration of the entire protein. While the RCL keeps a high flexibility over the entire trajectory, the loop 28–37 accommodates in solution after 2 ns or 3 ns, depending on the AT complexation state. Therefore, this equilibration period of 2–3 ns represents the searching of the loop for its solution conformation. However, it is interesting to observe that the loop 28–37 presents a lower flexibility in the complexed AT compared to the unbound AT. At the same time the RCL flexibility is greater in the complexed form of AT than in the free protein. While these differences could be associated to the degree of conformational sampling of the MD instead of a solution behavior, they are observed in more than 4.0 ns (the second half of the simulation), indicating the consistence of the simulation data. In this context, we consider the possibility that the mentioned RMSF profile is due to compound 1 effects over AT: (1) stabilizing the sequence comprised between Lys28 and Glu37; and (2) increasing the flexibility of the RCL. In other words, the conformational modifications expected to be

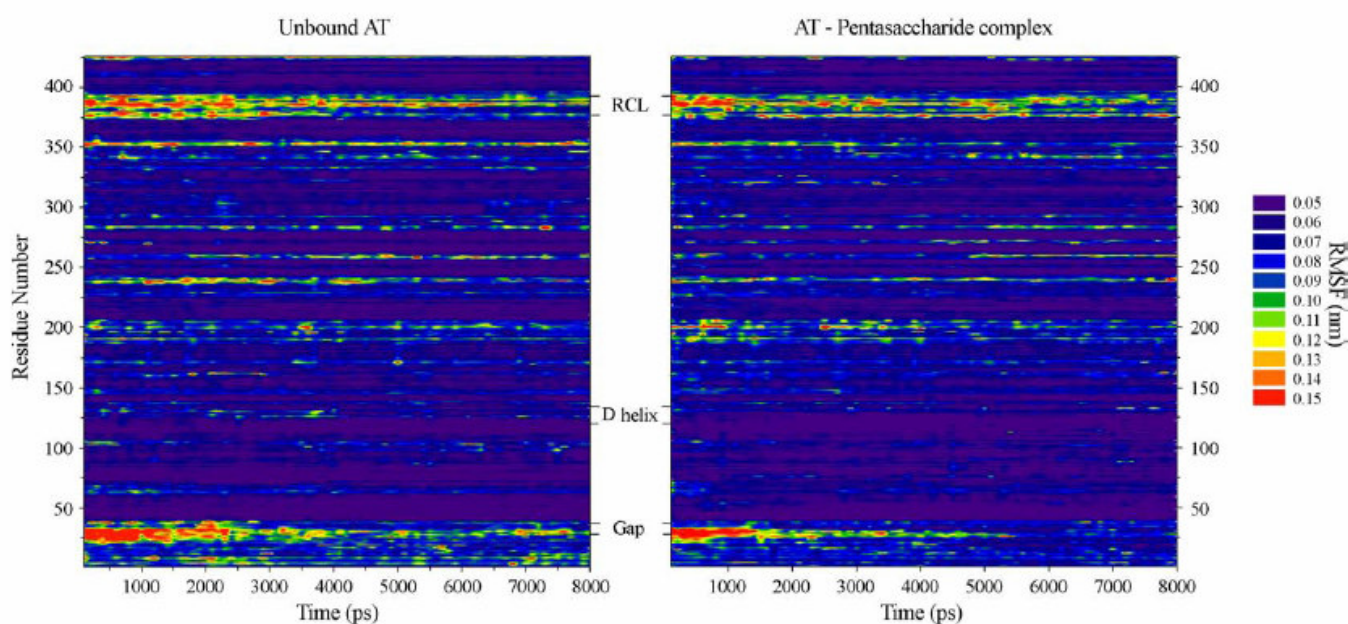


Fig. 3. RMSF as a function of both residue number and time for unbound AT and AT–compound 1 complex. The regions corresponding to the loop-comprising residues Lys28–Glu37 (Gap), D-helix and the reactive center loop (RCL) are also presented.

induced in AT by compound 1, which results in the profound potentiating effect of its inhibitory activity, could be observed and predicted by MD simulations.

### 3.4. Structural fluctuations of the polysaccharide moiety

In order to test the AT capabilities to induce conformational modifications in heparin, as previously suggested [29], we performed MD simulations of compounds 1 and 2 in solution, in absence of the protein moiety.

The structure and flexibility of the simulated carbohydrates were evaluated on the basis of the glycosidic linkage variation over the MD trajectory, as already reported [12]. The average dihedral angles of the glycosidic linkage for compounds 1 and 2 in solution or complexed with AT are presented in Table 1. For comparison, the reference values for  $\phi$  and  $\psi$  dihedral angles as obtained by NMR [30] and crystallography [21] studies were also presented.

With respect to the pentasaccharide simulations, it must be observed that, so far, there is no three-dimensional structure determined by experimental methods evidencing the solution geometry of GlcN  $\rightarrow$  GlcA and GlcA  $\rightarrow$  GlcN dihedral angles inside heparin or even any other polysaccharide molecule. The heparin structure previously reported concerns to a dodecasaccharide [30] composed exclusively by GlcN and IdoA residues, without GlcA. The only reference available to the heparin GlcN  $\rightarrow$  GlcA and GlcA  $\rightarrow$  GlcN dihedral angles is the crystallographic complex between compound 1 and AT [21]. This structure, however, may not correctly represent the heparin solution structure for two major reasons: (1) the synthetic pentasaccharide could have suffered conformational modifications as consequence of an induced fit mechanism; and (2) the synthetic pentasaccharide presents several structural modifications regarded to heparin, e.g. the substitution of hydroxyl by methoxyl groups and the substitution of sulfonamide by sulfate groups (Fig. 1). Even considering

that these chemical modifications did not impair the anticoagulant activity of the compounds, such substitutions are possibly inducing conformational modifications in the pentasaccharide compared to heparin.

As shown in Table 1, the MD simulations of compounds 1 and 2 in solution and complexed with AT were well correlated with the reference values obtained from NMR [30] and X-ray crystallography (Table 1) [21]. However, the dynamics of some of the glycosidic linkages have considerable differences between free and complexed compounds, suggesting that heparin-derived saccharides displaying anticoagulant activity interacts with AT by means of an induced fit mechanism. For instance with both compounds 1 and 2, the GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\phi$  angle change about 30° when complexed with AT. Significant alterations in the ligand–protein complex can be also observed for other angles: GlcN  $\rightarrow$  GlcA  $\psi$  ( $\sim$ 20° for compound 1) and GlcN  $\rightarrow$  IdoA  $\psi$  ( $\sim$ 20° for compounds 1 and 2). It should be noted that the conformation of IdoA appears not to interfere with the ligand conformational change once interacting with the target protein, since both compounds 1 and 2 can achieve the same bounded conformation.

These data may indicate that the overall geometry of the polysaccharide, as well as the IdoA geometry, is not a necessary prerequisite for AT activation, being the crystallization of its  ${}^2S_0$  form in the AT–pentasaccharide complex [21] due to a larger population of the skew-boat conformation over the chair conformation instead of the preference of AT to select such a conformation. In this way, the ligand plasticity seems to play a crucial role in inducing the required AT conformation in order to allow the protein to exert its potent anticlotting activity.

### 3.5. Ligand-receptor recognition

An understanding of those chemical forces which can drive the binding of heparin-derived compounds to AT could

Table 1  
Glycosidic linkage average of dihedral angles observed upon MD simulation of compounds 1 and 2 alone or complexed with AT

Dihedral angles <sup>a</sup>	NMR <sup>b,c</sup>	NMR <sup>b,d</sup>	1E03 <sup>e</sup>	Average dihedral (°) <sup>a,f</sup>			
				1 <sup>g</sup>	2 <sup>g</sup>	1 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup>
GlcN $\rightarrow$ GlcA ( $\phi$ )		–	96.9	89.5	85.8	77.9	77.3
GlcN $\rightarrow$ GlcA ( $\psi$ )		–	–153.7	–129.9	–135.6	–149.2	–149.4
GlcA $\rightarrow$ GlcN ( $\phi$ )		–	–72.5	–85.1	–87.3	–83.9	–87.7
GlcA $\rightarrow$ GlcN ( $\psi$ )		–	–116.8	–131.4	–128.9	–120.3	–117.2
GlcN $\rightarrow$ IdoA ( $\phi$ )	108.6	78.7	45.7	89.6	89.6	59.4	48.2
GlcN $\rightarrow$ IdoA ( $\psi$ )	–157.5	–149.9	–151.1	–126.9	–130.5	–144.4	–149.2
IdoA $\rightarrow$ GlcN ( $\phi$ )	–55.4	–77.1	–78.1	–77.7	–76.8	–63.3	–72.1
IdoA $\rightarrow$ GlcN ( $\psi$ )	–107.4	–110.1	–92.9	–116.5	–118.2	–108.8	–105.3

<sup>a</sup> See Section 2 for details.

<sup>b</sup> Data obtained from PDB code 1HPN [30].

<sup>c</sup> IdoA residues in  ${}^2S_0$  conformation.

<sup>d</sup> IdoA residues in  ${}^1C_4$  conformation.

<sup>e</sup> Data obtained from PDB code 1E03 [21].

<sup>f</sup> Standard deviation is approximately  $\pm 15^\circ$  for all values.

<sup>g</sup> Molecules in solution.

<sup>h</sup> Complex with AT.

Table 2  
Interaction energy analysis between AT and the simulated polysaccharides

AT residues <sup>a</sup>	Average interaction energy (kJ/mol)	
	Compound 1	Compound 2
Lys11	-101.5 ± 35.8	-92.9 ± 31.4
Arg13	-77.9 ± 41.9	-102.7 ± 30.1
Thr44	-43.4 ± 10.6	-52.3 ± 15.3
Asn45	-108.5 ± 13.9	-117.3 ± 12.1
Arg46	-19.5 ± 9.8	-37.7 ± 23.4
Arg47	-147.5 ± 12.2	-144.1 ± 10.9
Glu113	-45.5 ± 8.3	-46.6 ± 7.8
Lys114	-211.6 ± 9.8	-225.3 ± 11.9
Lys125	-27.4 ± 23.9	-63.5 ± 40.2
Arg129	-25.2 ± 20.8	-43.0 ± 10.2
Arg132	-3.1 ± 7.2	-8.3 ± 11.7
Lys133	-0.1 ± 0.4	-0.8 ± 1.1
Lys136	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Total	-965.7 ± 72.5	-1124.0 ± 61.4

<sup>a</sup> The selected amino acids correspond to approximately 80% of the total interaction energy between the simulated compounds and AT.

aid in the design of new antithrombotic compounds based on the conformation-induced mechanism of AT activation. In this context we evaluated the main interactions contributing to compound 1–AT complex. As shown in Table 2 some of these interactions ranged from -100 to -200 kJ/mol, approximately, confirming the recognized predominance of electrostatic contributions to the heparin–AT interaction. In general these high energy electrostatic interactions include several hydrogen bonds with different acceptors. For example, Arg47 makes hydrogen bonds with two distinct oxygen atoms from 2-O-sulfate group from residue H (GlcN), while performing a hydrogen bond with the carboxylate group of residue G (IdoA, Fig. 4). In the same way, Lys114 also performs several interactions, in a total of five hydrogen bonds with different acceptor atoms of compound 1 (Fig. 4). Altogether compound 1 performs an average of  $15.9 \pm 2.7$  hydrogen bonds over the 8.0 ns of

simulation. As this value is an average, it hides values ranging from 7 to 30 hydrogen bonds as the interactions between ligand and receptor fluctuate. This complex mosaic of intermolecular interactions can be simplified by means of interaction energy analysis, indicating the relative contribution of each residue as shown in Table 2. Such kind of information has important implications in the structure-based design of new antithrombotic compounds, indicating the particular contribution of each amino acid residue of AT and its possible relation to conformational modification of the interacting polysaccharide.

This is, to our knowledge, the first attempt to quantitatively determine the contribution of each one of the AT amino acid residues in their interactions with heparin-derived compounds. Our results are plentifully supported by other works reporting qualitative data on this subject, including X-ray crystallography [21] and mutagenesis studies [32–36]. Since the accuracy of a method can be judged by how well it reproduces known quantities [37,38], the obtained energies for the interactions between AT and compound 1 corroborates the validity of the performed simulations in describe the AT–heparin system.

### 3.6. Reactive center loop dynamics

The structures of both I- and L-AT (i.e. inhibitory and latent AT, respectively) co-crystallize as a dimer in which the I-AT RCL is partially inserted in the structure of L-AT [21,39]. This alignment appears to be held by a series of electrostatic interactions and hydrophobic contacts, including residues Glu237–Tyr240, Met251, Tyr260, Leu270, Leu285, Leu316–Val317, His319, Pro321, and Arg406 from L-AT and Glu255, Met315, and Thr386–Arg399 from I-AT, thus comprising almost all the RCL [21]. In this restrained conformation of RCL the P1 residue remains hid from solvent. This seems to represent a particular structural form since in other serpin crystal structures the P1 residue lies in a

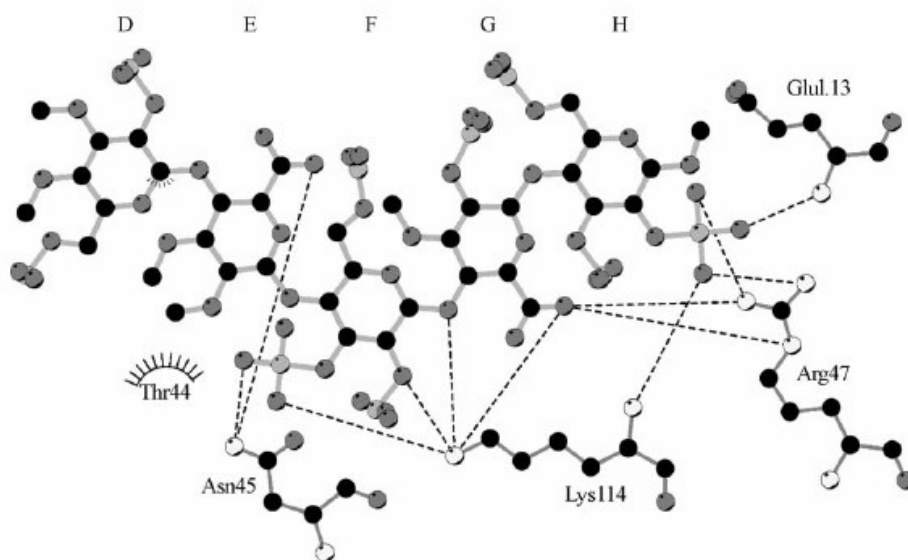


Fig. 4. Ligplot cartoon illustrating compound 1 binding to AT [31].

solvent-exposed manner [40]. What is not clear is whether the interaction with the latent molecule forces the RCL of the active molecule into this conformation or whether its preference for this conformation in solution allows it to co-crystallize with a latent partner [4]. Anyway the orientation of the RCL inserted into the L-AT implies that the side chain of P1 is in an internal orientation that does not allow the full match with the complementary conformation of the active site of target proteases.

In the MD simulations of the present work the I-AT was isolated from the L-AT, so the network of interactions constraining the RCL in the crystallographic structure was eliminated. Instead of the crystallographic interactions new contacts were created upon the addition of solvent, inducing conformational modifications in AT, as indicated by the time-dependent RMSD variation (Fig. 2), the RMSF (Fig. 3) and a visual examination of the simulations for the RCL and the loop-comprising residues Lys28 to Glu37. These motions could be highlighted in Fig. 5a, where the thickness of the sausage plot indicates the extent of protein chain motion. The highest mobility found in loops 28–37 and 376–393 should have important functional implications since the

first loop is adjacent to the heparin binding site and the last comprise the recognition sequence for clotting proteases. In fact, a closer look to P1 residue (Fig. 5b) shows a rotation of this residue of almost  $90^\circ$  in reference to crystal structure with consequent exposure of its side chain to solution and to the target proteases, bringing the RCL backbone closer to the AT body and so the radius of gyration reduction in the beginning of the simulations (Fig. 2d). A similar reorientation of P1 was observed in unbound AT and AT complexed to compound 2, indicating that instead of the crystallographic conformation of the RCL be due to its preference in solution it appears to be induced by the interactions with the AT latent molecule in the crystal. Also, it seems that the solvent exposure of Arg393 allows better recognition of AT by target proteinases, an assumption supported by previous works suggesting that (1) the P1 side chain is likely to be solvent accessible [41]; and (2) the natural state of the RCL is disordered, switching between a variety of conformers, readily accessible for insertion into the active site of a target protease [9].

Not only the change in P1 orientation was observed in the MD simulations, but important modifications in AT

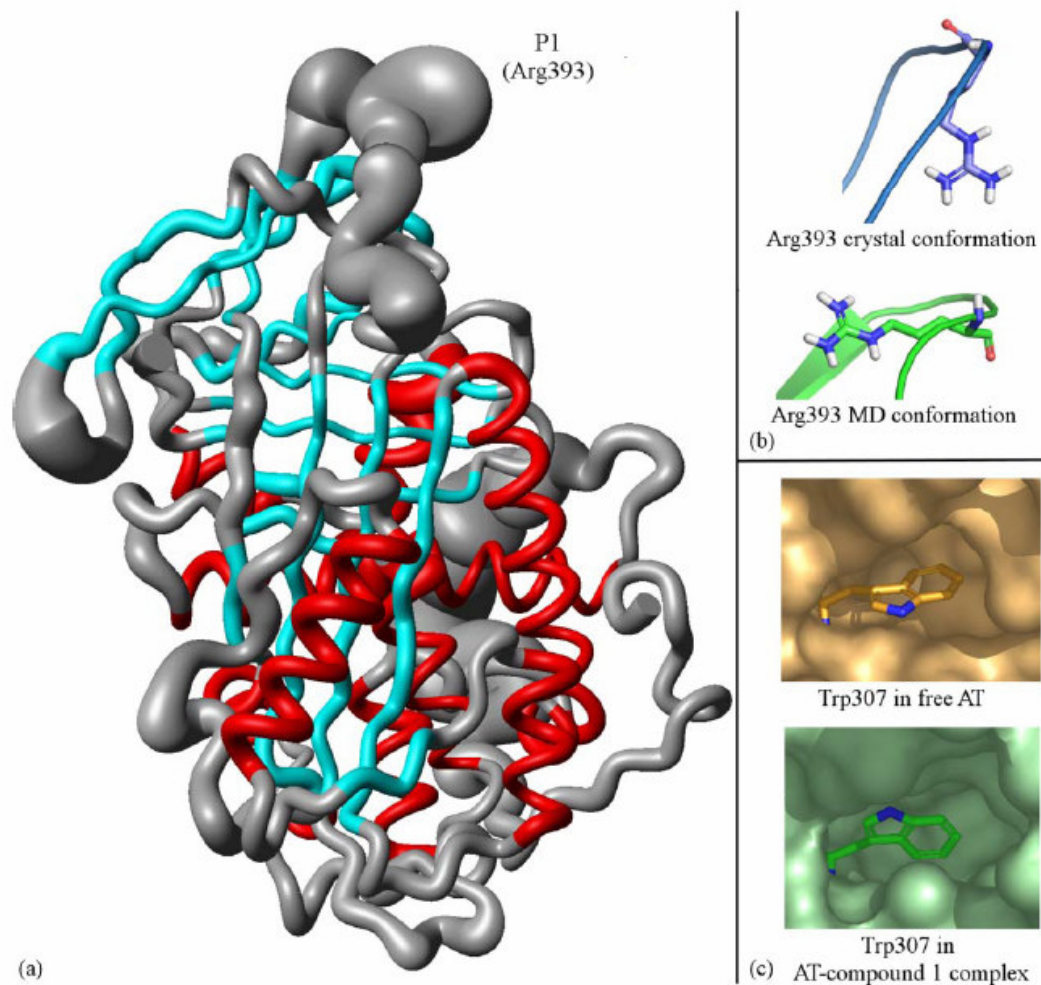


Fig. 5. (a) Sausage plot of AT complexed with compound 1 (omitted in order to clarify the picture). Coils are colored in gray,  $\beta$ -sheets are colored in cyan and  $\alpha$ -helices are colored in red; (b) Arg393 in crystal (blue) and MD (green) conformations; and (c) Trp307 in free AT (orange) and in AT-compound 1 complex (green). The figure was prepared by using MolMol [17].

secondary structure were also observed. As previously reported [42,43], the addition of increasing concentrations of heparin to an AT solution induces a progressive increase in its tryptophan fluorescence emission. In agreement with these data, the observation of the Trp307 conformation in the performed simulations indicates a reorientation of its side chain due to formation of AT–compound 1 complex (Fig. 5c). Such tryptophan residue presents an average interaction energy with its surrounding hydrophobic pocket (i.e. Val263, Val269, Ile284, Val295, Leu299, Val303, Leu304, and Leu308) of  $-91.1 \pm 17.3$  kJ/mol when in a free form. Due to complexation with compound 1, this interaction energy increases in almost 30 kJ/mol, to  $-61.7 \pm 6.5$  kJ/mol, indicating an exposition of Trp307 to solvent and so a change in fluorescence emission. No changes in Trp225 were observed in the performed calculations.

Analysis of the secondary structure of protein using the program DSSP [44] indicated that the D-helix (residues Gln118 to Lys136) decrease its size in MD simulations of unbound AT, but did not in AT complexed to compound 1. Besides the modifications found in the secondary structure of the protein, the PROCHECK program [45] indicated a remarkable quality of the performed simulations, where all the performed checks were found inside the reference values (results not shown).

It was previously proposed that heparin binding causes extension of helix D, which is connected to  $\beta$ -sheet A by a short linker, and that such helix extension causes contraction of  $\beta$ -sheet A and expulsion of the hinge residues P14 and P15 [46]. This process would change the flexibility and conformation of the RCL, which could explain the activation of AT by conformational modifications induced by heparin [47]. So we used other methods in order to confirm the unfolding of this AT-helix in the absence of the synthetic pentasaccharide. In this context the pseudo dihedral angle  $\xi$

(the torsion angle between planes defined by four consecutive  $\alpha$ -carbon atoms) provides a simplified backbone representation and continues to give information about secondary-structure elements. It could be seen in the plot helical and sheet like regions [48]. The  $\alpha$ -helices for instance are marked by a  $\xi = 45^\circ$ . The analysis of the  $\xi$  angle is in agreement with the DSSP and PROCHECK analyses, with a reduction in the  $\alpha$ -helices character over the first 2.5 ns of simulation (Fig. 6a). Also the ellipticity [49] of the residues His120 to Ala134 (Fig. 6b) indicates progressive loss of the helix character after the residue Arg129. This residue appears to be an inflexion point in the D-helix, the place where it abruptly lost more than 60% of the helix character (Fig. 6b). This is supported by previous data indicating an important role of Arg129 to the induced fit mechanism of heparin activation of AT [36]. This residue performs electrostatic interactions with compounds 1 and 2 and its importance in an induced fit mechanism of AT activation mediated by heparin has been previously suggested [36]. Therefore, the partial unfolding of D-helix, induced by the absence of compound 1 (Fig. 6b), indicates that MD simulations are able to correctly predict the stabilizing effect of heparin over AT D-helix.

Globally, the performed MD simulations make possible a dynamic and temporal connection and interpretation of several experimental data at a molecular level, starting from the polysaccharide–AT complex, with a quantitative description of the relevant interaction for such complex, passing through the induction of D-helix extension and the conformational modification of the carbohydrate moiety, to the increase in RCL flexibility, with emphasis on the structural analysis of the P1 residue exposure. Such profile, observed in solution for P1 conformation, can be considered an alternative view for AT structure in its biological environment when compared to the crystal orientation observed for this residue.

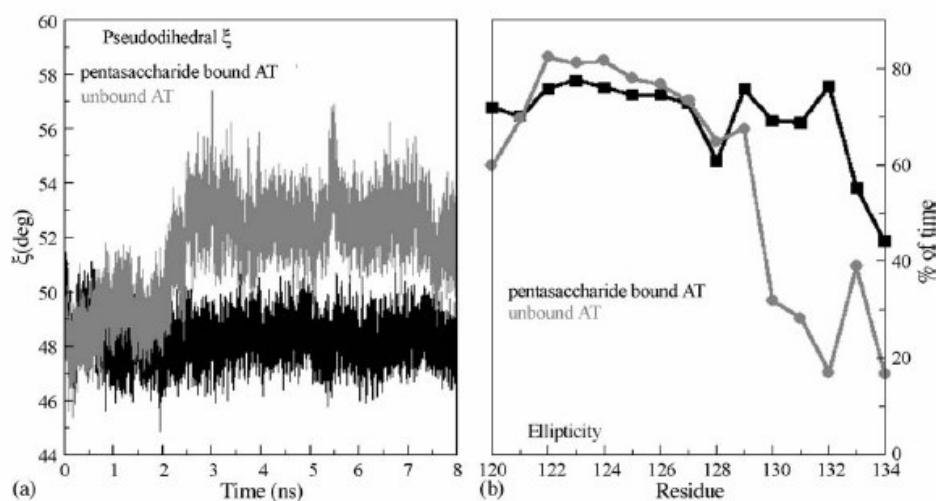


Fig. 6. (a) Pseudo dihedral  $\xi$  (i.e. the dihedral formed by 4 consecutive  $\alpha$ -carbon atoms  $C\alpha_i$ ,  $C\alpha_{i+1}$ ,  $C\alpha_{i+2}$ , and  $C\alpha_{i+3}$ ) as a function of time for helix D (residues His 120–Ala134) of unbound AT (dark grey) and AT–compound 1 complex (black) [40]; and (b) the ellipticity at 222 nm [49] (percent of time in which the residue presents a helix character) as a function of residue number of unbound AT (dark grey) and AT–compound bound complex (black).

#### 4. Conclusions

The current knowledge concerning antithrombin inhibitory activity and its modulation by heparin has been expanded in the last years by several studies. While these works traced a picture of heparin–AT complex based mainly on rigid X-ray crystallographic structure, mutagenesis and fluorescence studies, the connection of these qualitative information with the solution dynamics of ligand–AT interaction is almost absent, with a minor participation of molecular modeling and MD techniques.

In this context, the present work is the first to describe in the nanosecond time scale the interaction of a heparin analogue with AT using MD simulations. Several detailed conformational changes associated with this process were observed as: (a) formation of additional turns in D-helix in presence of heparin; (b) exposition of P1 to solvent; (c) transmission of conformational changes from D-helix elongation to RCL; and (d) increase in RCL flexibility in the presence of the synthetic pentasaccharide regarded to unbound AT (i.e. AT activation). In addition, the relative contribution of each amino acid residue could be estimated, with a high agreement with previously related mutagenesis and crystallographic data. Our data also suggest that there is no conformational requirement of IdoA to interact with AT, since both skew-boat and chair conformations contribute with similar enthalpy upon its interaction with the target protein.

Together, these data can contribute in the determination of the main requirements for anticoagulant polysaccharides modulating clotting serpins and so to assist in the development of new antithrombotic agents.

#### Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), MCT, Brasília, DF, Brazil; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brazil; and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), RS, Brazil.

#### References

- [1] H.B. Nader, M.A.S. Pinhal, E.C. Baú, R.A.B. Castro, G.F. Medeiros, S.F. Chavante, E.L. Leite, E.S. Trindade, S.K. Shinjo, H.A.O. Rocha, I.L.S. Tersariol, A. Mendes, C.P. Dietrich, Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (2001) 699–709.
- [2] M.E. Silva, C.P. Dietrich, Structure of heparin—characterization of products formed from heparin by action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 6841–6846.
- [3] J. Hirsh, Current anticoagulant therapy—unmet clinical needs, *Thromb. Res.* 109 (2003) S1–S8.
- [4] P.G.W. Gettins, Serpin structure, mechanism, and function, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4751–4803.
- [5] I. Schechter, A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 157–162.
- [6] S.-J. Kim, J.-R. Woo, E.J. Seo, M.-H. Yu, S.-E. Ryu, A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved  $\alpha_1$ -antitrypsin shows variability of the reactive center and other loops, *J. Mol. Biol.* 306 (2001) 109–119.
- [7] M. Simonovic, P.G.W. Gettins, K. Volz, Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 11131–11135.
- [8] P.E. Stein, A.G.W. Leslie, J.T. Finch, W.G. Tumell, P.J. McLaughlin, R.W. Carrel, Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins, *Nature* 347 (1990) 99–102.
- [9] S.J. Harrop, L. Jankova, M. Coles, D. Jardine, J.S. Whittaker, A.R. Gould, A. Meister, G.C. King, B.C. Mabbutt, P.M.G. Curmi, The crystal structure of plasminogen activator inhibitor at 2.0 Å resolution: implications for serpin function, *Structure* 7 (1999) 43–54.
- [10] A. Imberty, S. Pérez, Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations, *Chem. Rev.* 100 (2000) 4567–4588.
- [11] W. Li, D.J.D. Johnson, C.T. Esmon, J.A. Huntington, Structure of the antithrombin–thrombin–heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin, *Nat. Struct. Biol.* 11 (2004) 857–862.
- [12] H. Verli, J.A. Guimarães, Molecular dynamics simulations of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 281–290.
- [13] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains, *J. Mol. Biol.* 52 (1970) 1–17.
- [14] D.M.F. van Aalten, B. Bywater, J.B.C. Findlay, M. Hendlich, R.W.W. Hooft, 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. <http://davape1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>.
- [15] MOLDEN, Schaftenaar, G. 1997, CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands.
- [16] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD—Visual Molecular Dynamics, *J. Mol. Graphics* 14 (1996) 33–38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- [17] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graphics* 14 (1996) 51–55.
- [18] N. Guex, M.C. Peitsch, Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723. <http://www.expasy.org/spdbv>.
- [19] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS—a message-passing parallel molecular-dynamics implementation, *Comput. Phys. Commun.* 91 (1995) 43–56.
- [20] 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, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 2004.
- [21] L. Jin, J.P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R.N. Pike, R.W. Carrel, The anticoagulant activation of antithrombin by heparin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997) 14683–14688.
- [22] H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, T.P. Straatsma, The missing term in effective pair potentials, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 6269–6271.
- [23] B.L. de Groot, H. Grubmüller, Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-I and GlpF, *Science* 294 (2001) 2353–2357.
- [24] 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.
- [25] B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comput. Chem.* 18 (1997) 1463–1472.

- [26] S. Miyamoto, P.A. Kollman, SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models, *J. Comput. Chem.* 13 (1992) 952–962.
- [27] 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.
- [28] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular-dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690.
- [29] M. Hricovíni, M. Guerrini, A. Bisio, G. Torri, M. Petitou, B. Casu, Conformation of heparin pentasaccharide bound to antithrombin III, *Biochem. J.* 359 (2001) 265–272.
- [30] B. Mulloy, M.J. Forster, C. Jones, D.B. Davies, N.M.R. and molecular-modeling studies of the solution conformation of heparin, *Biochem. J.* 293 (1993) 849–858.
- [31] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein–ligand interactions, *Protein Eng.* 8 (1995) 127–134.
- [32] V. Arocas, S.C. Bock, S.T. Olson, I. Björk, The role of Arg46 and Arg47 of antithrombin in heparin binding, *Biochemistry* 38 (1999) 10196–10204.
- [33] S.J. Kridel, D.J. Knauer, Lysine residue 114 in human antithrombin III is required for heparin pentasaccharide-mediated activation, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7656–7660.
- [34] V. Arocas, S.C. Bock, S. Raja, S.T. Olson, I. Björk, Lysine 114 of antithrombin is of crucial importance for the affinity and kinetics of heparin pentasaccharide binding, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 43809–43817.
- [35] S. Schedin-Weiss, U.R. Desai, S.C. Bock, P.G.W. Gettins, S.T. Olson, I. Björk, Importance of lysine 125 for heparin binding and activation of antithrombin, *Biochemistry* 41 (2002) 4779–4788.
- [36] U. Desai, R. Swanson, S.C. Bock, I. Björk, S.T. Olson, Role of arginine 129 in heparin binding and activation of antithrombin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18976–18984.
- [37] W.F. van Gunsteren, H.J.C. Berendsen, Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 992–1023.
- [38] M. Karplus, G.A. Petsko, Molecular dynamics simulations in biology, *Nature* 347 (1990) 631–639.
- [39] R. Skinner, J.-P. Abrahams, J.C. Whisstock, A.M. Lesk, R.W. Carrel, M.R. Wardell, The 2.6 Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site, *J. Mol. Biol.* 266 (1997) 601–609.
- [40] P.R. Elliott, D.A. Lomas, R.W. Carrel, J.P. Abrahams, Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 676–681.
- [41] A. Futamura, J.M. Beechem, P.G.W. Gettins, Conformational equilibrium of the reactive center loop of antithrombin examined by steady state and time-resolved fluorescence measurements: consequences for the mechanism of factor Xa inhibition by antithrombin–heparin complexes, *Biochemistry* 40 (2001) 6680–6687.
- [42] P.H. Lin, U. Sinha, A. Betz, Antithrombin binding of low molecular weight heparins and inhibition of factor Xa, *Biochim. Biophys. Acta* 1562 (2001) 105–113.
- [43] R.F. Melo, M.S. Pereira, D. Foguel, P.A.S. Mourão, Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20824–20835.
- [44] W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: pattern-recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers* 22 (1983) 2577–2637.
- [45] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [46] C.A.A. van Boeckel, P.D.J. Grootenhuis, A. Visser, A mechanism for heparin-induced potentiation of antithrombin-III, *Nat. Struct. Biol.* 1 (1994) 423–425.
- [47] S.T. Olson, I. Björk, R. Sheffer, P.A. Craig, J.D. Shore, J. Choay, Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin–proteinase reactions, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12528–12538.
- [48] R.S. de Witte, E.J. Shakhnovich, Pseudodihedrals: simplified protein backbone representation with knowledge-based energy, *Protein Sci.* 3 (1994) 1570–1581.
- [49] J.D. Hirst, C.L. Brooks III, Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins, *J. Mol. Biol.* 243 (1994) 173–178.

## 5 Discussão Geral

### 5.1 Validação de simulações de DM

A modelagem molecular vem sem mostrando através dos anos como uma importante ferramenta no estudo da interação entre ligantes e receptores. Exemplos de planejamento de fármacos utilizando técnicas de modelagem molecular, tais como no desenvolvimento dos inibidores de protease de HIV indinavir e nelfinavir, vêm comprovando o potencial destas metodologias no desenvolvimento de novas substâncias bioativas (Verli & Barreiro, 2005). A determinação de estruturas 3D de biomoléculas por RMN e o refinamento de estruturas cristalográficas obtidas por raios-X são, também, áreas que se beneficiam diretamente da modelagem molecular, particularmente de simulações de DM (Karplus & Petsko, 1990).

Em geral, a validação de modelos obtidos por métodos de modelagem molecular reside, principalmente, na comparação dos resultados gerados a propriedades experimentais conhecidas (van Gunsteren & Berendsen, 1990). Neste contexto, a contínua aplicação da modelagem molecular na elucidação de propriedades moleculares conhecidas constitui-se num importante fator a acrescentar confiabilidade e visibilidade a tais métodos e, assim, em consolidar seu uso como método de previsão do comportamento de sistemas moleculares.

O uso de métodos semi-empíricos no estudo da conformação da turbinatina contribuiu na elucidação de valores de constantes de acoplamento anormais e fortes efeitos NOE observados entre os átomos de hidrogênio nas posições 20 e 21, demonstrando que o confôrmero de mínimo de energia por tais métodos apresenta o anel D em conformação torcida. Tal torção, capaz de aproximar o diedro definido pelos átomos H-21-C-21-C-20-H-20 de um plano, claramente justifica os dados experimentais obtidos por RMN. A consistência de tal previsão é devida: 1) a reprodutibilidade dos dados obtidos utilizando diferentes métodos semi-empíricos, *i.e.* AM1 e PM5, 2) ao tamanho da diferença de energia entre as conformações, de até 5 kcal/mol, e 3) a consideração do solvente (metanol) no qual os espectros de RMN foram gerados. Em suma, tais resultados exemplificam a potencialidade do uso da modelagem molecular na elucidação das razões moleculares para propriedades experimentais previamente determinadas. Mais do que isto demonstram que, na



ausência do conhecimento prévio de tais propriedades, possibilitariam suas previsões.

## **5.2 Parametrização de simulações de DM para carboidratos**

### 5.2.1 Parâmetros gerais para simulação da heparina

A aplicação de métodos computacionais no desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes, baseados na estrutura e/ou mecanismo de ação da heparina, esbarra na dificuldade destes métodos em descrever glicosaminoglicanos polissulfatados. Isto se deve ao fato de que a compreensão 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 & Pérez, 2000).

É importante considerar que os problemas associados à descrição da estrutura 3D e conformação de polissacarídeos não se restringem somente à modelagem molecular. No contexto da heparina, as informações de sua estrutura se restringem até o momento a uma estrutura cristalográfica (Faham *et al.*, 1996) e três estruturas obtidas por RMN (Mulloy *et al.*, 1993, Mikhailov *et al.*, 1996 e Mikhailov *et al.*, 1997). Contudo, o uso de métodos de cristalografia e RMN, aplicados a carboidratos, geralmente resultam em um único modelo 3D, o qual é incapaz de representar adequadamente as propriedades dinâmicas de tais compostos. Desta forma, a modelagem molecular permite complementar as informações obtidas por estes métodos experimentais, descrevendo os carboidratos em seus ambientes naturais, solvatados, com contra-íons e/ou interagindo com suas proteínas-alvo.

A simulação por DM de um fragmento da heparina foi previamente relatada (Mikhailov *et al.*, 1997). Neste trabalho, um hexassacarídeo foi solvatado com ~600 moléculas de água e simulado por 600ps. Segundo o protocolo de simulação utilizado, foram necessárias restrições no início da simulação, de forma a impedir a distorção do polissacarídeo. Tanto estas instabilidades quanto os resultados obtidos podem estar sendo influenciados pelo tamanho do sistema, muito reduzido. De fato, é sabido que o uso de poucas moléculas de solvente é capaz de induzir artefatos em simulações de DM (Leach, 2001). Estes aspectos nos levaram a tentar outra estratégia na simulação de DM da heparina, utilizando o pacote GROMACS.

A escolha do GROMACS, como ferramenta de simulação de DM, foi motivada por dois principais motivos: 1) este pacote possui uma implementação dos algoritmos de DM extremamente rápida, e 2) ser um programa gratuito, além de ser de fácil manipulação. É importante ter em mente que a velocidade do programa é um fator crucial, pois permite tanto o uso de computadores mais baratos, *i.e.* de menor capacidade, quanto à simulação de sistemas moleculares maiores, reduzindo duplamente o custo computacional. Isto será fundamental na simulação do complexo binário heparina-AT e, possivelmente, do complexo ternário protease-heparina-AT.

Infelizmente, a escolha do pacote GROMACS criou um problema. Os campos de força incluídos neste programa não apresentam parâmetros para simulações de carboidratos, sendo focados principalmente em proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e solventes mais comuns. Assim sendo, tornou-se premente a necessidade de calcular parâmetros mínimos, capazes de permitir ao GROMACS a representação adequada da estrutura da heparina em solução. Estes parâmetros incluem tanto termos do campo de força associados a interações não-ligadas (cargas atômicas e parâmetros de van der Waals) quanto interações ligadas (constantes de ligação, ângulo e diedro) (Figura 16). A solução encontrada foi uma abordagem híbrida, na qual alguns parâmetros seriam gerados a partir de uma ferramenta automática do GROMACS, denominada PRODRG (van Aalten *et al.*, 1996), e outros (cargas atômicas) seriam obtidos através de cálculos *ab initio*.

A própria obtenção de cargas atômicas é uma tarefa complexa, tendo-se em vista o enorme número de abordagens disponíveis e a dependência dos dados obtidos nos conjuntos de métodos escolhidos. Com relação ao estudo da heparina, a presença de grupos sulfato e sulfonamida automaticamente impediu o uso de métodos semi-empíricos, uma vez que estes não apresentam parâmetros para orbitais *d*, presentes na hibridação do átomo de enxofre nos grupamentos sulfato e sulfonamida ( $sp^3d^2$ ) (Stewart, 1999), de forma que foram escolhidos os métodos *ab initio* para a geração das cargas atômicas. Em função do custo computacional, o protocolo utilizado constituiu-se numa minimização utilizando a base 3-21G e em um cálculo de *single point* utilizando a base 6-31G<sup>\*\*</sup>.

Os cálculos *ab initio*, utilizando o pacote GAMESS, oferecem dois tipos de cargas atômicas: as cargas baseadas na análise de Mulliken e as cargas baseadas na análise de Löwdin. A abordagem de Mulliken, em certos sistemas, é capaz de atribuir a orbitais um número negativo de elétrons ou de mais de 2 elétrons, em uma

clara contradição ao princípio da exclusão de Pauli (Leach, 2001). A consequência prática disto é a obtenção de cargas atômicas menores que -1 para átomos de oxigênio. Isto aumenta o dipolo das ligações químicas e intensifica as propriedades eletrostáticas do sistema, introduzindo artefatos na simulação de DM<sup>6</sup>. Assim sendo, o esquema de cargas escolhido para esta primeira tentativa em descrever a heparina por DM foi o de Löwdin, uma vez que não apresenta as deficiências do esquema de Mulliken.

As cargas atômicas obtidas foram então aplicadas a um decassacarídeo de heparina, gerado a partir de um dodecassacarídeo determinado por RMN (Mulloy *et al.*, 1993, PDB ID 1HPN). A redução de 12 para 10 unidades sacarídicas deveu-se a limitações do programa PRODRG em lidar com moléculas maiores. Mesmo com esta redução, o aumento dos seis resíduos simulados previamente (Mikhailov *et al.*, 1997) para os dez que utilizamos permitiu a redução da distorção das ligações glicosídicas como consequência da maior flexibilidade das extremidades da molécula ao oferecer uma maior região central de ancoragem conformacional. Juntamente com este aumento no tamanho do polissacarídeo, o tamanho da camada de solvatação foi significativamente elevado, passando de ~600 para ~6000 moléculas de água, enquanto que o tempo de simulação subiu de 600ps para 3,0ns, completamente estável durante toda a trajetória. Mais importante, a simulação apresentou significativa semelhança com a estrutura de partida, obtida por RMN. Estes dados nos permitiram, em grande medida, superar ao menos em parte as dificuldades em simular polissacarídeos por DM e, assim, testar uma série de fatores capazes de influenciar a conformação da heparina em solução.

O primeiro destes fatores avaliado foi a concentração de íons no sistema, controlada através do tamanho da camada de solvatação (*i.e.* do tamanho da caixa). Este parâmetro, dentro dos limites avaliados (~145mM a ~404mM), não demonstrou influência sobre a simulação, embora apresente uma redução de quase 1/3 no custo computacional. Isto sugere que o aumento na amostragem, por DM, de sistemas polissacarídicos pode ser alcançada com a redução na camada de solvatação, com consequente aumento na concentração de íons sem, contudo, comprometer a qualidade da simulação.

---

<sup>6</sup> Experiências iniciais utilizando cargas de Mulliken oriundas de cálculos semi-empíricos introduziram instabilidades nas simulações de DM, provocando grandes distorções da estrutura da heparina e terminando com a explosão do sistema.

### 5.2.2 Descrição do perfil conformacional do IdoA

O segundo fator avaliado foi a capacidade da simulação em descrever as mudanças na geometria da heparina associadas à transição do resíduo IdoA da forma  ${}^2S_0$  para a  ${}^1C_4$  e vice-versa. Contudo, embora a DM tenha sido sensível à mudança conformacional deste resíduo, com a modificação da geometria das ligações glicosídicas, os valores obtidos para a conformação  ${}^1C_4$  foram piores do que para a conformação  ${}^2S_0$ , tomando-se como base a estrutura de referência (Mulloy *et al.*, 1993, PDB ID 1HPN). Isto foi associado a dificuldades da DM em descrever interações intramoleculares importantes, como a interação entre a hidroxila da glicosamina e o carboxilato do ácido idurônico. De qualquer forma, os dados obtidos, principalmente referentes à conformação  ${}^2S_0$ , reproduzem satisfatoriamente os dados de referência, principalmente à luz da heterogeneidade das demais fontes de informação acerca da geometria da heparina (Mulloy *et al.*, 1993, Faham *et al.*, 1996, Mikhailov *et al.*, 1996 e Mikhailov *et al.*, 1997), as quais apresentam variações que alcançam 60°.

Um dado interessante se refere à energia de interação dos decassacarídeos simulados com o solvente. De acordo com trabalhos anteriores, propondo que a conformação de carboidratos em solução será a que menos interferir na estrutura do solvente circundante (Uedaira *et al.*, 2001), foi observado que a heparina apresentando o resíduo IdoA na forma  ${}^2S_0$  interage em torno de 550kJ/mol mais intensamente com o solvente em comparação a heparina apresentando o resíduo IdoA na forma  ${}^1C_4$  sugerindo, portanto, explicações para as razões moleculares da preferência conformacional deste resíduo em solução.

Com relação somente à forma  ${}^2S_0$  do resíduo IdoA, a minimização da geometria de RMN para este resíduo através de cálculos HF 3-21G demonstrou aspectos inesperados com relação à conhecida mobilidade deste monossacarídeo (Ferro *et al.*, 1990 e Mulloy & Forster, 2000). Foi observada uma pequena torção na geometria do anel, menor que 1Å. Contudo, esta torção implicou na mudança em até 60° dos diedros endocíclicos, principalmente nas posições 1 e 4, as quais estão envolvidas na formação da ligação glicosídica da heparina (1→4). Quando incluída nas simulações de DM, esta nova conformação do resíduo IdoA acarretou na correção da geometria do ângulo GlcN→IdoA  $\psi$ , de -125° para -151°, de acordo com a estrutura de referência da heparina, -158°. Esta correção na geometria da

heparina, ao contrário das expectativas iniciais, não está relacionada a interações intramoleculares, mas sim a interações intermoleculares, envolvendo principalmente íons presentes na solução. Com a mudança conformacional do resíduo IdoA, ocorre uma maior exposição de seus grupos carboxilato e sulfato ao meio, implicando na intensificação da interação com os contra-íons  $\text{Na}^+$  em aproximadamente 200kJ/mol. A consequência deste aumento na interação entre soluto e solvente seria a reacomodação da geometria da ligação glicosídica, equiparando os valores experimentalmente obtidos para a estrutura da heparina. Tal resultado nos fez considerar que, possivelmente, a geometria do resíduo IdoA estivesse distorcida na estrutura de RMN. De fato, a resolução máxima alcançada para a determinação de estruturas 3D por este método está em torno de 2 a 3Å (Markley *et al.*, 2003), além das modificações estruturais observadas na minimização por *ab initio*, menores que 1Å.

Esta mudança conformacional, avaliada sob o prisma da nomenclatura de Cremer e Pople, significa uma alteração da conformação  ${}^2\text{S}_0$  para a conformação  ${}^5\text{S}_1$ , outro membro da família de pseudorotâmeros bote – bote-torcido (Cremer & Szabo, 1995). A razão para tal mudança, provavelmente, deve-se justamente ao uso de métodos *ab initio*, em contraposição aos trabalhos originais utilizando métodos de mecânica molecular.

Os estudos iniciais abordando as diferentes populações de confôrmeros do resíduo IdoA utilizaram, principalmente, constantes de acoplamento vicinais empregando uma generalização da equação de Karplus (Haasnoot *et al.*, 1980). Tal procedimento se baseia numa geometria dos ângulos de torção previamente obtida, geralmente, através de mecânica molecular. Além das dificuldades de parametrizar tais métodos para mudanças conformacionais sutis, a mecânica molecular é incapaz de descrever efeitos estereoeletrônicos, os quais podem ter importante papel na estabilização relativa de cada conformação. Tais efeitos, adequadamente expressos nos métodos *ab initio*, poderiam em muito contribuir na racionalização de constantes de acoplamento vicinais obtidas por experimentos de RMN.

### 5.2.3 Comparação de diferentes esquemas de carga na simulação por DM da heparina

Além da concentração de íons e da influência do perfil conformacional do resíduo IdoA, tornou-se necessário comparar o efeito de diferentes tipos de carga na

reprodução do perfil conformacional da heparina. Este aspecto se destaca, principalmente, em função da carência de trabalhos apresentando o efeito de diferentes esquemas de carga na parametrização de campos de força de mecânica molecular.

Assim sendo, os esquemas de Löwdin, Mulliken e as cargas ajustadas ao potencial eletrostático foram utilizados no cálculo de cargas atômicas para a simulação da heparina e derivados. Destas, as cargas de Mulliken apresentaram os maiores valores modulares destes três conjuntos de dados, incluindo-se os átomos de oxigênio da hidroxila, sulfato e sulfonamida. Este aumento modular implica na intensificação das interações eletrostáticas realizadas pela molécula, seja com o meio circundante, seja com o receptor-alvo. De fato, a energia de interação do decassacarídeo de heparina com os íons  $\text{Na}^+$  do sistema simulado mais do que dobraram nestas cargas, em relação às cargas de Löwdin (de -883,79 para -2074,32). A consequência deste efeito parece ser a distorção do ângulo  $\text{IdoA} \rightarrow \text{GlcN} \phi$ , que muda de  $-75^\circ$  no esquema de Löwdin para  $-90^\circ$  no esquema de Mulliken. Embora no limite do desvio padrão observado para esta variável, fica clara a tendência de mudança na geometria da ligação glicosídica. Mas muito mais importante do que esta mudança é o significado do aumento da energia de interação no contexto do estudo de complexos ligante-receptor. Enquanto parâmetros de carga diferentes são capazes de produzir geometrias semelhantes, são também capazes de ocasionarem diferenças nas energias de interação com o meio circundante, seja solvente seja um receptor, da ordem de 1000 kJ/mol, o que certamente influenciará as propriedades obtidas na trajetória de DM, sobrevalorizando o componente eletrostático envolvido.

Efeitos semelhantes foram observados na comparação entre as cargas ajustadas ao ESP e as cargas de Löwdin. As cargas obtidas a partir do potencial eletrostático molecular são amplamente utilizadas na parametrização de campos de força, e são reconhecidamente melhores do que as cargas de Mulliken na descrição das propriedades moleculares (Clare & Supuran, 1998). Contudo, são altamente dependentes da conformação molecular, o que pode tornar necessário o uso de diferentes conformações da molécula a ser parametrizada, gerando no final uma média das cargas obtidas para cada conformação. Soma-se a isto o maior custo computacional associado à sua obtenção.

Os valores das cargas obtidos para Löwdin e ESP foram, de fato, muito similares. As únicas diferenças significativas envolvem o grupo carboxilato e o átomo de hidrogênio da hidroxila, maiores em módulo no conjunto ajustado ao ESP. Estas diferenças não foram capazes de modificar a estrutura global da heparina, diferentemente do que ocorreu com as cargas de Mulliken. Mas, de forma análoga, influenciaram na interação com os íons do sistema, representando um aumento de quase 50% em relação ao esquema de Löwdin (-1400,37 e -883,79, respectivamente). Novamente, merece destaque a possível influência de tal modulação nas propriedades eletrostáticas na interação de ligantes com receptores de interesse biológico.

Os dados obtidos com diferentes cargas atômicas também evidenciam uma elevada capacidade de sistemas moleculares, principalmente polissacarídeos complexos, em acomodarem diferentes parâmetros na descrição de suas estruturas sem induzirem, contudo, induzirem uma significativa modificação das mesmas. Com relação à parametrização de campos de força de mecânica molecular, o uso de esquemas de Löwdin surge como promissora alternativa, apresentando resultados semelhantes aos descritos pelas cargas ajustadas ao ESP, mas sem demonstrar tanta dependência na conformação molecular e com um menor custo computacional associado.

### **5.3 Estudo por DM do complexo heparina-AT**

Uma vez tendo sido demonstrada a bem sucedida aplicação da DM na descrição da estrutura e conformação da heparina em solução aquosa (Verli & Guimarães, 2004 e Becker, Guimarães & Verli, 2005), o interesse do trabalho foi focado no estudo de complexos envolvendo a heparina e seus derivados, marcadamente o complexo com a AT. Embora a heparina apresente diversas proteínas-alvo (Mulloy & Linhardt, 2001), a AT é a única proteína da cascata de coagulação co-cristalizada a um análogo de heparina (Jin *et al.*, 1997)<sup>7</sup>, além de ser a responsável pela inibição de trombina e fator Xa mediada por polissacarídeos. Tendo-se em vista a carência de estudos de DM envolvendo polissacarídeos e seus

---

<sup>7</sup> No decorrer da presente tese foi publicada a estrutura cristalográfica de um complexo ternário, envolvendo a protease-alvo, a AT e um heparinóide, ilustrando o mecanismo de molde na ação da heparina (Figura 8, código PDB 1TB6, Li *et al.*, 2004).

complexos, a reprodução deste complexo cristalográfico é, também, uma forma de validar os protocolos e condições de simulação desenvolvidas pelo grupo.

A estratégia escolhida nestas simulações envolveu, inicialmente, a simulação do complexo cristalográfico pentassacarídeo sintético – AT, acrescido de água e íons. Seguindo-se a esta simulação, os componentes do complexo (carboidrato e proteína) foram simulados isoladamente de forma a avaliar como a formação da estrutura bi-molecular seria capaz de modificar a estrutura e a conformação de cada um dos participantes, *i.e.* a ocorrência do encaixe induzido. Foi também avaliada a influência do perfil conformacional do resíduo IdoA de forma a testar hipóteses prévias acerca do papel desta conformação na interação com a AT (Mikhailov *et al.*, 1996).

### 5.3.1 Dinâmica da alça Lys28-Glu37 e do RCL

A observação da flutuação dos resíduos de aminoácidos da AT (RMSF) demonstrou que as duas regiões da proteína com maior flexibilidade eram as alças compreendidas pelos resíduos Lys28 a Glu37 e Asn376 a Arg393 (RCL). Ambas as regiões são expostas ao solvente, o que justifica esta elevada flexibilidade. A alça *N*-terminal corresponde a uma região normalmente não observada em estruturas cristalográficas de serpinas (Whisstock *et al.*, 1998) tendo sido, portanto, modelada. Neste caso específico, a alta flexibilidade representa mais a demora na região modelada em se equilibrar na simulação do que necessariamente um estado de alta mobilidade em solução, uma vez que após os 3 primeiros nanosegundos a flexibilidade desta região torna-se semelhante ao resto da proteína.

Embora este perfil de equilíbrio até os primeiros 3ns da simulação também seja observado para o RCL, ao contrário da alça 28-37, a região compreendida entre as posições 376 e 393 mantém alta mobilidade durante toda a simulação, sugerindo que a alça reativa é a região de maior flexibilidade da AT. Este dado está de acordo com sua função como inibidor, na qual a Arg393 agiria como uma “isca”, exposta como substrato suicida às proteases-alvo.



Tanto com relação à alça 28-37 quanto à alça 376-393, a presença do pentassacarídeo acarreta no aumento da flexibilidade e/ou no tempo de equilíbrio da proteína, efeito este também observado em outras regiões da AT, marcadamente a sua porção *N*-terminal. Isto é possivelmente decorrente de interações eletrostáticas entre o pentassacarídeo e a AT, permitindo a estabilização direta da proteína. Contudo, embora seja imediata a compreensão deste efeito em regiões próximas ao sítio de ligação do pentassacarídeo, como a porção *N*-terminal e a alça 28-37 (mesmo que a mesma não apareça no cristal, sugerindo que não interage diretamente com o ligante), o efeito do pentassacarídeo na dinâmica do RCL é sob certo aspecto surpreendente em função da distância entre os dois grupos. Embora este efeito seja devido ao tamanho da amostragem conformacional possibilitada pela DM realizada, é tentador crer que o que está sendo observado é precisamente o efeito da ativação conformacional da AT. Contudo, análises mais específicas precisam ser realizadas de forma a balizar esta possibilidade.

O aspecto mais importante observado durante as simulações realizadas, referente ao RCL, se refere à orientação do resíduo P1 durante as simulações. De fato, enquanto que na estrutura cristalográfica a cadeia lateral da Arg393 está voltada para o corpo da serpina, durante a DM este resíduo voltou-se e expôs-se francamente para o solvente. Tal comportamento é suportado, principalmente, por trabalhos anteriores sugerindo que o resíduo P1 encontra-se exposto ao solvente (Futamura *et al.*, 2001). De fato, a orientação cristalográfica do resíduo responsável pela atividade inibitória da AT, a Arg393, não explica a especificidade do reconhecimento das serino-proteinases-alvo, o que foi possibilitado pelos resultados apresentados.

É importante observar que a conformação de todo o RCL é mantida, no cristal, por uma série de interações por ligação de hidrogênio e pontes salinas entre duas moléculas de AT compondo a unidade cristalina. O isolamento de uma destas moléculas, e a conseqüente substituição destas interações entre proteínas por interações com a água deve ser o maior responsável pela reorientação da Arg393.

### 5.3.2 Interação pentassacarídeo-AT

Considerando-se que o entendimento das forças envolvidas no complexo ligante-receptor podem auxiliar diretamente no desenvolvimento de novos compostos bioativos, indicando potenciais sítios de interação, a contribuição

específica de cada resíduo de aminoácido para o complexo pentassacarídeo sintético-AT foi calculada. Tal contribuição havia sido estimada até então somente em bases qualitativas (Jin *et al.*, 1997; Kridel & Knauer, 1997; Arocas *et al.*, 1999; Desai *et al.*, 2000; Arocas *et al.*, 2001; Schedin-Weiss *et al.*, 2002).

Os dados obtidos confirmam a já esperada contribuição predominante de forças eletrostáticas no complexo heparina-AT, marcadamente por fortes ligações de hidrogênio e pontes salinas, alcançando cerca de 200 kJ/mol, como na interação com a Lys114. Um aspecto interessante, complementar à estrutura cristalográfica descrita para o complexo simulado (Jin *et al.*, 1997), é o dinamismo de tais interações. Grandes flutuações podem ser vistas no decorrer da simulação, com ligações de hidrogênio sendo feitas e desfeitas, ou com a mudança no átomo acceptor da ligação. Este mosaico de interações, de difícil análise segundo distâncias médias de interação, é em grande medida simplificado através das médias das energias de interação, demonstrando os resíduos-chave para a formação do complexo.

Ao mesmo tempo, enquanto que trabalhos prévios sugeriram que o equilíbrio conformacional do resíduo IdoA contribuiria para as propriedades anticoagulantes observadas para a heparina, comparativamente a outros glicosaminoglicanos apresentando resíduos de ácidos urônicos mais rígidos (Mikhailov *et al.*, 1996), os dados obtidos sugerem que a mudança da conformação  ${}^2S_0$  para a  ${}^1C_4$  em nada prejudica a ligação da heparina a AT. Ao contrário, considerando-se que a forma de cadeira interage menos eficientemente com o solvente do que a forma de bote-torcido (Verli & Guimarães, 2004), seria de esperar que a geometria  ${}^1C_4$  da heparina apresentasse maior afinidade pelo receptor-alvo por apresentar menor energia de dessolvatação. Provavelmente, a observação da forma  ${}^2S_0$  no cristal deve-se à presença, quase exclusiva, desta conformação em solução (van Boeckel *et al.*, 1988). Este indício está diretamente relacionado à determinação dos requisitos geométricos mínimos para a modulação da atividade da AT por derivados da heparina.

### 5.3.3 Encaixe-induzido no complexo heparina-AT

Trabalhos anteriores demonstraram que a ligação da heparina à AT acarreta a extensão da hélice D, ou seja, induz a formação de voltas adicionais na região C-terminal desta hélice a partir de uma pequena alça, responsável pela conexão da

hélice D à folha- $\beta$  A. Esta extensão acarretaria na contração da folha- $\beta$  A, culminando na expulsão dos resíduos P14 e P15 (Figura 2, van Boeckel *et al.*, 1994). Este processo acarretaria o aumento da flexibilidade do RCL, o que implicaria na ativação da AT pela heparina (Olson *et al.*, 1992). Como apresentado anteriormente, as simulações de DM nos permitiram observar mudanças nas propriedades conformacionais do RCL, de forma que buscamos avaliar se, durante as simulações, também ocorreram alterações conformacionais na hélice D, como consequência da presença ou ausência do pentassacarídeo.

De acordo com o protocolo de simulação utilizado, a estrutura da AT livre simulada é a mesma estrutura presente no complexo com o pentassacarídeo, somente sem a presença deste ligante. Tal abordagem nos permitiria observar quais características conformacionais da serpina eram induzidas e mantidas pelo ligante, e quais eram intrínsecas à proteína. Neste sentido, a simulação da forma livre da AT demonstrou o des-enovelamento das últimas voltas da hélice D, criadas pela presença do pentassacarídeo sintético, demonstrando a capacidade da DM em descrever o efeito estabilizador da heparina sobre a estrutura secundária da AT. Além do efeito global sobre a hélice, a DM também demonstrou corretamente o papel de resíduos específicos na modulação conformacional da hélice D, tais como a Arg129 (Desai *et al.*, 2000).

No contexto de um processo do tipo encaixe-induzido, não somente a proteína está sujeita a sofrer mudanças conformacionais, mas também o ligante (Verli & Barreiro, 2005), conforme já postulado para o complexo heparina-AT (Hricovíni *et al.*, 2001). De acordo com estes dados, a observação do perfil conformacional do pentassacarídeo sintético, livre da AT, nas simulações de DM demonstra que a formação do complexo é capaz de torcer alguns ângulos da ligação glicosídica em até 30°. Tal mudança conformacional é observada tanto para o pentassacarídeo apresentando o resíduo de IdoA na conformação  ${}^1C_4$  quanto na  ${}^2S_0$ , novamente indicando que a AT não distingue as duas geometrias. Sugere, contudo, que a plasticidade do ligante pode ser um fator importante para a complexação e ativação da AT, facilitando sua acomodação ao sítio de ligação e, em consequência, maximizando as interações com o receptor-alvo.

#### **5.4 Implicações para o desenvolvimento racional de novos agentes anticoagulantes, baseados no mecanismo de ação da heparina**

A partir dos resultados obtidos, pode-se contextualizar a participação de ferramentas de modelagem molecular, marcadamente a DM, no planejamento racional de novos agentes anticoagulantes baseados no mecanismo de ação da heparina. Este processo, esquematizado na Figura 20, pode ser resumido nas seguintes etapas:

1) Seleção de oligossacarídeos e/ou compostos estruturalmente promissores, tais como produtos naturais análogos ao composto (10), Figura 14, na modulação da AT;

2) Verificação e comprovação de que as propriedades anticoagulantes destes compostos são mediadas pela AT;

3) Uma vez confirmada a AT como provável alvo molecular dos compostos selecionados, segue-se ao estudo computacional dos compostos, tanto em suas formas isoladas, quanto em complexo com a AT. Esta etapa possibilitará tanto a identificação das interações intermoleculares envolvidas no complexo, quanto à avaliação da capacidade de cada composto em induzir modificação conformacional da AT, à luz dos dados previamente obtidos para o complexo heparina-AT;

4) Planejamento de derivados sintéticos, de forma a potencializar as interações com a AT, a capacidade de ativar esta serpina e a reduzir os custos de dessolvatação;

5) Síntese dos derivados propostos;

6) Avaliação das propriedades anticoagulantes dos derivados propostos. Neste momento o ciclo pode ser reiniciado inúmeras vezes, até que seja obtido um ou mais compostos/padrões moleculares com propriedades anticoagulantes satisfatórias.

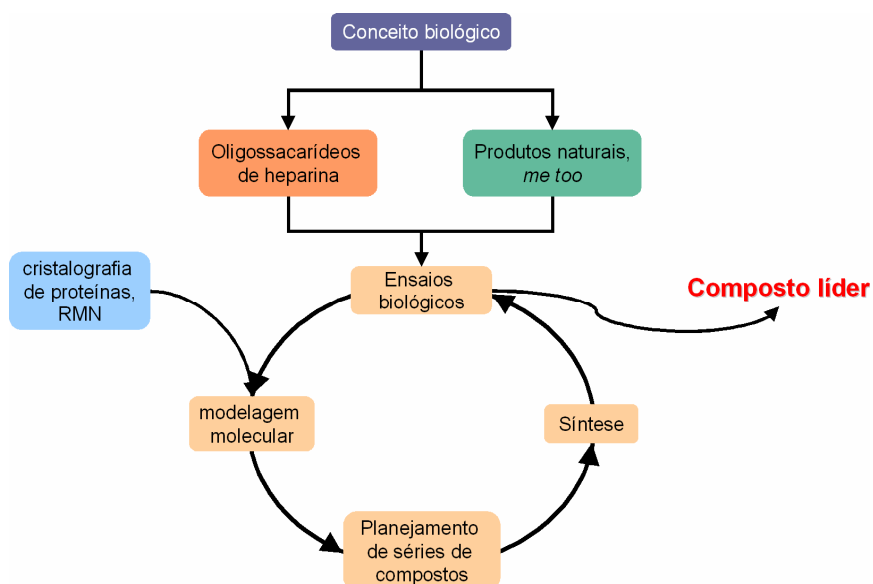


Figura 20: Esquema representando um processo de desenvolvimento de novos compostos bioativos, envolvendo a participação de métodos de modelagem molecular.

Em linhas gerais, espera-se que a DM seja capaz de agilizar o planejamento de novos compostos anticoagulantes, ao permitir a identificação e quantificação dos principais resíduos de aminoácidos envolvidos no reconhecimento molecular, assim como o papel dos mesmos na ativação da AT.

## 6 Conclusões

A partir dos objetivos traçados, o presente trabalho permitiu:

- Obtenção de cargas atômicas para simulação de DM da heparina e outros polissacarídeos polissulfatados, capazes de reproduzirem adequadamente os dados experimentais disponíveis;
- Proposição das cargas de Löwdin como alternativas à parametrização de campos de força de mecânica molecular;
- Reprodução do comportamento conformacional da heparina em solução aquosa, considerando tanto a conformação  ${}^2S_0$  quanto a  ${}^1C_4$  do resíduo IdoA;
- Proposição de refinamento da conformação reconhecida para o resíduo IdoA, passando de  ${}^2S_0$  para  ${}^5S_1$ ;
- Re-interpretação da orientação cristalográfica do resíduo P1, o qual estaria exposto ao solvente, em oposição às estruturas 3D atualmente disponíveis para a AT;
- Análise quantitativa da contribuição de cada resíduo de aminoácido para a energia de interação heparina-AT;
- Re-interpretação do papel da conformação do resíduo IdoA para o reconhecimento molecular da heparina pela AT, sendo aparentemente irrelevante neste processo;
- Reprodução, por DM, do encaixe induzido na formação do complexo AT-heparina.

Globalmente, os resultados obtidos confirmam o potencial de ferramentas de modelagem molecular no estudo de sistemas biológicos, conectando informações previamente obtidas por métodos experimentais, oferecendo explicações moleculares para tais informações e sugerindo novas propriedades a serem confirmadas posteriormente por outras metodologias.

## 7 Perspectivas

Considerando-se os procedimentos de simulação propostos e validados no presente trabalho, assim como as informações obtidas acerca da heparina e de sua proteína-alvo, a AT, as seguintes perspectivas podem ser traçadas:

- Estudo estrutural e conformacional de polissacarídeos polissulfatados, não relacionados estruturalmente à heparina, tais como galactanas e fucanas;
- Início de um projeto de planejamento racional de novos agentes anticoagulantes sintéticos, não-relacionados estruturalmente a heparina, mas capazes de ativar conformacionalmente a AT;
- Considerando-se que a AT é uma glicoproteína, avaliar o efeito da glicosilação na dinâmica da proteína e na formação do complexo heparina-AT, em face tanto do papel fisiológico da parte sacarídica da AT quanto da ausência de simulações de DM considerando glicoproteínas.

## 8 Glossário<sup>8</sup>

**Análise Populacional de Mulliken**: a análise populacional de Mulliken é um método para distribuir os elétrons em átomos com a finalidade de gerar cargas atômicas parciais. Os resultados são fortemente dependentes do conjunto de bases usado.

Análise populacional de Mulliken: Um esquema de partição, baseado no uso das matrizes de densidade e de recobrimento, para distribuir os elétrons de uma entidade molecular de algum modo fracionário entre suas várias partes (átomos, ligações, orbitais). Como em outros esquemas usados para distribuir a densidade eletrônica em moléculas, a análise populacional de Mulliken é arbitrária e fortemente dependente do conjunto de bases empregado. Contudo, a comparação de análises populacionais para uma série de moléculas é útil para uma descrição quantitativa das interações intramoleculares, de reatividade química e de regularidades estruturais.

**Arquivo PDB**: um arquivo PDB (do inglês *Protein Data Bank*, Banco de Dados de Proteínas) é um arquivo ASCII (do inglês American Symbolic Code for Information Interexchange = text, Código Simbólico Americano para Troca de Informação) usado para armazenar as coordenadas atômicas de uma molécula, geralmente uma proteína ou ácido nucléico (veja *PDB*).

**Cálculos *ab initio***: Cálculos *ab initio* são cálculos mecânico-quânticos que usam equações exatas, sem aproximações, que envolvem a população eletrônica total da molécula.

Métodos mecânico-quânticos *ab initio* (sinônimo com métodos mecânico-quânticos não empíricos): métodos de cálculos mecânico-quânticos independentes de qualquer experimento que não seja a determinação de constantes fundamentais. Os métodos são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Na prática, aproximações são necessárias para restringir a complexidade da função de onda eletrônica e tornar seu cálculo possível.

**Cálculos AM1**: Cálculos AM1 são cálculos semi-empíricos de orbital molecular desenvolvidos na Universidade de Austin no Texas (AM1 = *Austin Model 1*, Modelo Austin 1). Estes cálculos envolvem os elétrons de valência dos átomos da molécula.

**Cálculos Mecânico-quânticos**: Cálculos mecânico-quânticos são cálculos de propriedades moleculares baseados na equação de Schrödinger que levam em conta as interações entre os elétrons em uma molécula.

**Cálculos PM3**: PM3 (do inglês *Parametric Method 3*) é um programa de cálculo semi-empírico de orbital molecular largamente usado (veja *Métodos semi-empíricos*).

<sup>8</sup> Definições obtidas de de Sant'Anna, 2002 e van der Spoel *et al.*, 2002.



**Campo de Força**: é um conjunto de funções e parametrizações usadas em cálculos de mecânica molecular. Estas funções definem as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto diedro) de uma molécula, quando comparadas com a sua conformação não tensionada (aquela caracterizada pelos valores padrões de comprimentos e de ângulos de ligação). Alguns campos de força podem conter termos de interação entre átomos não ligados, de efeitos eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de outros efeitos estruturais.

**Campo e Potencial Eletrostáticos**: O campo e o potencial eletrostáticos são propriedades de uma molécula que surgem da interação entre uma sonda carregada, tal como uma carga pontual unitária positiva representando um próton, e a molécula alvo. Este campo e o potencial são usados em estudos de relações quantitativas estrutura-atividade tridimensionais (3D-QSAR) e para comparar ou estimar a semelhança de um conjunto de moléculas.

**Dinâmica Molecular**: é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton. As forças que agem nos átomos, necessárias para simular seus movimentos, são calculadas usando campos de força de mecânica molecular.

**Mecânica Molecular**: é o cálculo das características geométricas e de energia de entidades moleculares baseado em funções de potencial empíricas, cuja forma é tomada da mecânica clássica. O método pressupõe que as funções de potencial possam ser transferidas dentro de um conjunto de moléculas semelhantes. Uma suposição é feita sobre os comprimentos e ângulos “naturais” de ligação, cujos desvios resultam em tensão de ligação e tensão angular, respectivamente. As forças de Van der Waals e eletrostáticas também são levadas em conta.

**Métodos Semi-Empíricos**: Métodos semi-empíricos são cálculos de orbital molecular que usam vários graus de aproximação e que usam apenas elétrons de valência.

Métodos mecânico-quânticos semi-empíricos: Os métodos que usam parâmetros derivados de dados experimentais para simplificar os cálculos computacionais. A simplificação pode ocorrer em vários níveis: simplificação do Hamiltoniano (por exemplo, como no método de Hückel estendido), avaliação aproximada de certas integrais moleculares (veja, por exemplo, recobrimento diferencial zero), simplificação da função

de onda (por exemplo, o uso da aproximação do elétron  $p$  como no método Pariser-Parr-Pople).

**Minimização de Energia**: é um procedimento matemático para localizar as conformações estáveis (mínimos de energia) de uma molécula, determinadas por cálculos de mecânica molecular ou mecânico-quânticos.

**Modelagem Molecular**: é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares usando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional, sob um conjunto de circunstâncias.

**Protein Data Bank (PDB)**: é um banco de dados de proteínas mantido no Laboratório Nacional Brookhaven, Upton, New York, que contém estruturas de raios-X de dezenas de milhares de proteínas.

**Planejamento de Fármacos**: inclui não somente o planejamento do ligante, mas também a farmacocinética e a toxidez, que estão na maior parte das vezes além das possibilidades do planejamento auxiliado pela estrutura ou por computador. O termo planejamento de fármacos é mais freqüentemente usado do que o termo correto "Planejamento de Ligantes".

**Planejamento de Ligantes**: é o planejamento de ligantes que usa informações estruturais sobre o alvo ao qual os ligantes devem se ligar, freqüentemente tentando maximizar a energia de interação.

**Planejamento Baseado em Estrutura (Structure-Based Design)**: é uma estratégia para novas entidades químicas baseadas na estrutura tridimensional (3D) de um alvo obtido de estudos de raios-X ou de ressonância magnética nuclear ou de modelos de homologia de proteínas.

**Química Computacional**: é uma disciplina que usa métodos matemáticos para o cálculo de propriedades moleculares e para a simulação do comportamento molecular. Também inclui, por exemplo, o planejamento de sínteses, a pesquisa de bancos de dados e a manipulação de bibliotecas combinatoriais.

**Receptor**: é uma proteína ou um complexo de proteínas localizado no interior ou na superfície de uma célula, que reconhece especificamente e interage com um composto que atua como um mensageiro molecular (neurotransmissor, hormônio, fármaco, etc). Em um sentido mais amplo, o termo receptor é freqüentemente usado como sinônimo para qualquer sítio específico de ligação de fármacos (em oposição

a não específico, como a ligação às proteínas do plasma), também incluindo ácidos nucleicos, tais como o DNA.

**Termos de Energia Não-Ligados**: são funções de energia potencial que descrevem interações de Van der Waals, eletrostáticas e de ligação hidrogênio em um campo de força.

**Topologia Molecular**: Topologia molecular é a descrição do modo pelo qual os átomos estão ligados em uma molécula. Em diversos programas de dinâmica molecular constitui-se em um arquivo que descreve em quais átomos ou combinações de átomos as diversas contribuições de um campo de força irão atuar. Apresenta atributos constantes para cada átomo, como quais átomos existem em uma molécula, as características destes átomos (*e.g.* um oxigênio carbonílico é diferente de um oxigênio em um grupamento éter ou hidroxila), como cargas atômicas, termos ligados e não-ligados.

## 9 Referências Bibliográficas

### Referências citadas no texto e nos artigos publicados

- 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.
- Alpert, J. S.; Dalen, J. E.: Epidemiology and natural history of venous thromboembolism. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **1994**, *36*, 417-422.
- Anderson, F. A.; Wheeler, H. B.; Goldberg, R. J.; Hosmer, D. W.; Patwardhan, N. A.; Jovanovic, B.; Forcier, A.; Dalen, J. E.: A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT study. *Arch. Intern. Med.*, **1991**, *151*, 933-938.
- Angulo, J.; Nieto, P. M.; Martin-Lomas, M.: A molecular dynamics description of the conformational flexibility of the L-iduronate ring in glycosaminoglycans. *Chem. Commun. (Cambridge)*, **2003**, *13*, 1512–1513.
- Arocas, V.; Bock, S. C.; Olson, S. T.; Björk, I.: The role of Arg46 and Arg47 of antithrombin in heparin binding. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 10196-10204.
- Arocas, V.; Bock, S. C.; Raja, S.; Olson, S. T.; Björk I.: Lysine 114 of antithrombin is of crucial importance for the affinity and kinetics of heparin pentasaccharide binding. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 43809-43817.
- Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, P. A.; Kollman, P. A.: A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 10269-10280.
- Basten, J.; Jaurand, G.; Olde-Hanter, B.; Petitou, M.; van Boeckel, C. A. A.: Biologically active heparin-like fragments with a "non-glycosamino"glycan structure. Part 2: a tetra-O-methylated pentasaccharide with high affinity for antithrombin III. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992a**, *2*, 901-904.
- Basten, J.; Jaurand, G.; Olde-Hanter, B.; Duchaussoy, P.; Petitou, M.; van Boeckel, C. A. A.: Biologically active heparin-like fragments with a "non-glycosamino"glycan structure. Part 3: O-alkylated-O-sulphated pentasaccharides. *ibid.*, **1992b**, *2*, 905-910.

- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Em Intermolecular Forces; Pullman, B., Ed.; Reidel: Dordrecht, The Netherlands, **1981**; pp 331–342.
- 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.
- BioMedCACHe 5.0; Fujitsu Ltd. & Oxford Molecular Ltd., 2001.
- Boneu, B.: Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? *Thromb. Res.*, **2000**, *100*, V113-V120.
- 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.
- Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M.: CHARMM - A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.*, **1983**, *4*, 187-217.
- Butenas, S.; Mann, K. G.: Kinetics of human factor VII activation. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 1904-1910.
- 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.
- Cheng, J. W. M.: Fondaparinux: a new antithrombotic agent. *Clin. Ther.*, **2002**, *24*, 1757-1769.
- Choay, J.; Lormeau, J.-C.; Petitou, M.; Sinay, P.; Fareed, J.: Structural studies on a biologically active hexasaccharide obtained from heparin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1981a**, *370*, 644-649.
- Choay, J.; Lormeau, J. C.; Petitou, M.: Low molecular weight oligosaccharides active in plasma against factor Xa. *Ann. Pharm. Fr.*, **1981b**, *39*, 37-44.

- Choay, J.; Petitou, M.; Lormeau, J. C.; Sinayï, 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.
- Clark, M.; Cramer, R. D.; van Opdenbosch, N.: Validation of the general-purpose Tripos 5.2 force-field. *J. Comput. Chem.*, **1989**, *10*, 982-1012.
- 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.
- Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, Jr. K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P.A.: A 2<sup>nd</sup> generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids, and organic-molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5179-5197.
- Craig, P. A.; Olson, S. T.; Shore, J. D.: Transient kinetics of heparin-catalyzed protease inactivation by antithrombin III. Characterization of assembly, product formation, and heparin dissociation steps in the factor Xa reaction. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 5452-5461.
- Cremer, D.; Pople, J. A.: A general definition of puckering coordinates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 1354-1358.
- 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.
- Cros, S.; Petitou, M.; Sizun, P.; Pérez, S.; Imberty, A.: Combined NMR and molecular modeling study of an iduronic acid-containing trisaccharide related to antithrombotic heparin fragments. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *5*, 1301-1309.
- Cumming, D. A.; Carver, J. P.: Virtual and solution conformations of oligosaccharides. *Biochemistry*, **1987**, *26*, 6664-6676.
- Dagget, V.; Levitt, M.: Realistic Simulations of Native-Protein Dynamics in Solution and Beyond. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1993**, *22*, 353-380.
- Danielsson, 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 of 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.
- de Bruyn, A. *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 159-180.
- de Groot, B. L.; Grubmüller, H.: Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **2001**, *294*, 2353-2357.
- de Sant'Anna, C. M. R.: Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações IUPAC 1997). *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 505-512.
- de Silva, K. T. D.; Smith, G. N.; Warren, K. E. H.: Stereochemistry of strictosidine. *Chem. Commun.*, **1971**, 905-907.
- de Silva, K. T. D.; King, D.; Smith, G. N.: 5a-Carboxystrictosidine. *Chem. Commun.*, **1971**, 908-909.
- de Witte, R. S.; Shakhnovich, E. J.: Pseudodihedrals: simplified protein backbone representation with knowledge-based energy. *Protein. Sci.*, **1994**, *3*, 1570-1581.
- Delprete, G. P.: Notes on calycophyllous Rubiaceae. Part I. Morphological comparison of the genera *Chimarrhis*, *Bathysa*, *Calycophyllum* with new combinations and a new species, *Chimarrhis gentryana*. *Brittonia*, **1996**, *48*, 35-44.
- 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.
- Drake, T. A.; Morrissey, J. H.; Edgington, T. S.: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am. J. Pathol.*, **1989**, *134*, 1087-1097.
- 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. *Biochemistry*, **1986**, *25*, 505-512.
- Eaton, W. A.; Muñoz, V.; Thompson, P. A.; Henry, E. R.; Hofrichter, J.: Kinetics and dynamics of loops,  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -hairpins, and fast-folding proteins. *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 745-753.

- Elliott, P. R.; Lomas, D. A.; Carrel, R. W.; Abrahams, J. P.: Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin. *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, *3*, 676-681.
- Engelsen, S. B.; Monteiro, C.; de Penhoat, C. H.; Pérez, S.: The diluted aqueous solvation of carbohydrates as inferred from molecular dynamics simulations and NMR spectroscopy. *Biophys. Chem.*, **2001**, *93*, 103–127.
- Esmon, C. T.: The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 4743-4746.
- Faham, S.; Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Linhardt, R. J.; Rees, D. C.: Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science*, **1996**, *276*, 1116–1120.
- Fareed, J.; Jeske, W.; Hoppensteadt, D.; Clarizio, R.; Walenga, J. M.: Low-molecular-weight heparins: pharmacologic profile and product differentiation. *Am. J. Cardiol.*, **1998**, *82*, 3L-10L.
- Ferro, D. R.; Provasoli, A.; Ragazzi, M.; Torri, G.; Casu, B.; Gatti, G.; Jacquinet, J.-C.; Sinay, P.; Petitou, M.; Choay, J.: Evidence for conformational equilibrium of the sulfated L-iduronate residue in heparin and in synthetic heparin mono- and oligosaccharides: NMR and force-field studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 6773-6778.
- 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.; Pumilia, P.; Ragazzi, M.: An improved force field for conformational analysis of sulfated polysaccharides. *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*, 351–367.
- Futamura, A.; Beechem, J. M.; Gettins, P. G. W.: Conformational equilibrium of the reactive center loop of antithrombin examined by steady state and time-resolved fluorescence measurements: consequences for the mechanism of factor Xa inhibition by antithrombin-heparin complexes. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 6680-6687.
- 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* (supp.), 1325-1755.
- Gettins, P. G. W.: Keeping the serpin machine running smoothly. *Genome Research*, **2000**, *10*, 1833–1835.



- Gettins, P. G. W.: Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.*, **2002a**, *102*, 4751-4803.
- Gettins, P. G. W.: The F-helix of serpins plays an essential, active role in the proteinase inhibition mechanism. *FEBS Lett.*, **2002b**, *523*, 2-6.
- 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>.
- 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.
- Gunatilaka, A. A. L.; Samaranyake, G.; Kingston, D. G. I.: Bioactive Ergost-5-ene-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol Derivatives from *Pseudobersama mossambicensis*. *J. Nat. Prod.*, **1992**, *55*, 1648-1654.
- Gunnarsson, G. T.; Desai, U. R.: Designing small, nonsugar activators of antithrombin using hydrophobic interaction analyses. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1233-1243.
- 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.
- Halgren, T. A.: Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comp. Chem.*, **1996a**, *17*, 490-519.
- Halgren, T. A.: Merck molecular force field .2. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions. *ibid.*, **1996b**, *17*, 520--552.
- Halgren, T. A.: Merck molecular force field .3. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. *ibid.*, **1996c**, *17*, 553-586.
- Halgren, T. A.: Merck molecular force field .4. Conformational energies and geometries for MMFF94. *ibid.*, **1996d**, *17*, 587-615.
- Halgren, T. A.: Merck molecular force field .5. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules. *ibid.*, **1996e**, *17*, 616-641.
- Hansen, J.-B.; Sandset, P. M.: Differential effects of low molecular weight heparin and unfractionated heparin on circulating levels of antithrombin and tissue factor

- pathway inhibition (TFPI): a possible mechanism for difference in therapeutic efficacy. *Thromb. Res.*, **1998**, *91*, 177-181.
- Harrop, S. J.; Jankova, L.; Coles, M.; Jardine, D.; Whittaker, J. S.; Gould, A. R.; Meister, A.; King, G. C.; Mabbutt, B. C.; Curmi, P. M. G.: The crystal structure of plasminogen activator inhibitor at 2.0 Å resolution: implications for serpin function. *Structure*, **1999**, *7*, 43-54.
- Herbert, J. M.; Herault, J. P.; Bernat, A.; van Amsterdam, R. G. M.; Lormeau, J. C.; Petitou, M.; van Boeckel, C.; Hoffmann, P.; Meuleman, D. G.: Biochemical and pharmacological properties of SANORG 34006, a potent and long-acting synthetic pentasaccharide. *Blood*, **1998**, *91*, 4197-4205.
- 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.
- 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.
- Hirst, J. D.; Brooks III, C. L.: Helicity, circular dichroism and molecular dynamics of proteins. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *243*, 173-178.
- Homans, S. W.: A molecular mechanical force field for the conformational analysis of oligosaccharides: comparison of theoretical and crystal structures of Man.alpha.1-3Man.beta.1-4GlcNAc. *Biochemistry*, **1990**, *29*, 9110-9118.
- Hricovíni, 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. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 8495-8503.
- Huntington, J. A.; Read, R. J.; Carrell, R. W.: Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, **2000**, *407*, 923-926.

- 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.
- Jaques, L. B.: Heparins - anionic polyelectrolyte drugs. *Pharmacol. Rev.*, **1979**, 31, 99-166.
- Jaurand, G.; Basten, J.; Lederman, I.; van Boeckel, C. A. A.; Petitou, M.: Biologically active heparin-like fragments with a "non-glycosamino"glycan structure. Part 1: a pentasaccharide containing a 3-O-methyl iduronic acid unit. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, 2, 897-900.
- 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.
- Jenny, N. S.; Mann, K. G.: Coagulation Cascade: An Overview. Em *Thrombosis and Hemorrhage*, 2<sup>a</sup> Ed., Loscalzo, J.; Schafer, A. I. Eds.; Williams & Wilkins, Baltimore, **1998**, pp 3-8.
- 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.*, **1997**, 94, 14683-14688.
- Jorgensen, W. L.; Swenson, C. J.: Optimized intermolecular potential functions for amides and peptides. Structure and properties of liquid amides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 569-578.
- Kabsch, W.; Sander, C.: Dictionary of protein secondary structure: pattern-recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **1983**, 22, 2577-2637.
- 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.; Petsko, G. A.: Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, **1990**, 347, 631-639.

- Kim, S.-J.; Woo, J.-R.; Seo, E. J.; Yu, M.-H.; Ryu, S.-E.: A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved  $\alpha_1$ -antitrypsin shows variability of the reactive center and other loops. *J. Mol. Biol.*, **2001**, *306*, 109-119.
- Kirschner, K. N.; Woods, R. J.: Solvent interactions determine carbohydrate conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 10541-10545.
- Kitson, D. H.; Hagler, A. T.: Theoretical-studies of the structure and molecular-dynamics of a peptide crystal. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 5246-5257.
- Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K.: MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics*, **1996**, *14*, 51-55.
- Kridel, S. J.; Knauer, D. J.: Lysine residue 114 in human antithrombin III is required for heparin pentasaccharide-mediated activation. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 7656-7660.
- Kutchan, T. M. Em *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: London, **1998**, pp 259-267.
- Langley, C. H.; Allinger, N. L.: Molecular mechanics (MM4) calculations on amides. *J. Phys. Chem. A*, **2002**, *106*, 5638-5652.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **1993**, *26*, 283-291.
- Leach, A. R.: *Molecular Modelling Principles and Applications*, 2<sup>nd</sup> Ed., **2001**, Longman, Cingapura.
- Leonard, J.: Recent progress in the chemistry of monoterpenoid indole alkaloids derived from secologanin. *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, *16*, 319-338.
- Levitt, M.; Hirshberg, M.; Sharon, R.; Dagget, V.: Potential-energy function and parameters for simulations of the molecular-dynamics of proteins and nucleic-acids in solution. *Comp. Phys. Commun.*, **1995**, *91*, 215-231.
- Li, W.; Johnson, D. J. D.; Esmo, C. T.; Huntington, J. A.: Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat. Struct. Biol.*, **2004**, *11*, 857-862.
- Lii, J.-H.; Allinger, N. L.: The MM3 force-field for amides, polypeptides and proteins. *J. Comput. Chem.*, **1991**, *12*, 186-199.
- Linker, A.; Hovingh, P.: Structural studies on heparin. Tetrasaccharides obtained by heparinase degradation. *Carbohydr. Res.*, **1984**, *127*, 75-94.

- Loebermann, H.; Tokuoka, R.; Deisenhofer, J.; Huber, R.: Human  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor: Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J. Mol. Biol.*, **1984**, *177*, 531-556.
- Luzar, A.; Chandler, D.: Hydrogen-bond kinetics in liquid water. *Nature*, **1996**, *379*, 55–57.
- Maple, J. R.; Hwang, M.-J.; Jalkanen, K. J.; Stockfish, T. P.; Hagler, A. T.: Derivation of class II force fields: V. Quantum force field for amides, peptides, and related compounds. *J. Comp. Chem.*, **1998**, *18*, 430-458.
- Markley, J. L.; Ulrich, E. L.; Westler, W. M.; Volkman, B. F. Macromolecular Structure Determination by NMR Spectroscopy. Em *Structural Bioinformatics*, Bourne, P. E.; Weissig, H., Eds.; Wiley-Liss, New Jersey, **2003**; pp 89-113.
- 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.
- Mismetti, P.; Laporte-Simitsidis, S.; Tardy, B.; Cucherat, M.; Buchmuller, A.; Juillard-Delsart, D.; Decousous, H.: Prevention of venous thromboembolism in internal medicine with unfractionated or low molecular weight heparins: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Thromb. Haemost.*, **2000**, *83*, 14-19.
- 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.
- MOLDEN. G. Schaftenaar, CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, 1997.
- Morrissey, J. H.; Macik, B. G.; Neuenschwander, P. F.; Comp, P. C.: Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood*, **1993**, *81*, 734-744.
- Mulloy, B.; Forster, M. J.; Jones, C.; Davies, D. B.: N.M.R. and molecular-modeling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem. J.*, **1993**, *293*, 849-858.
- Mulloy, B.; Forster, M. J.: Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology*, **2000**, *10*, 1147–1156.

- Mulloy, B.; Linhardt, R. J.: Order out of complexity – protein structures that interact with heparin. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2001**, *11*, 623-628.
- 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.; Kisiel, W.: Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 10819-10824.
- Ofosu, F. A.; Modi, G. J.; Hirsh, J.; Buchanan, M. R.; Blajchaman, M. A.: Mechanisms for inhibition of the generation of thrombin activity by sulfated polysaccharides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1986**, *485*, 41-55.
- Ofosu, F. A.; Hirsh, J.; Esmon, C. T.; Modi, G. J.; Smith, L. M.; Anvari, N.; Buchanan, M. R.; Fento Blajchman, M. A.: Unfractionated heparin inhibits thrombin-catalyzed amplification reactions of coagulation more efficiently than those catalyzed by factor Xa. *Biochem. J.*, **1989**, *257*, 143-150.
- Olson, S. T.; Halvorson, H. R.; Bjork, I.: Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 6342-6352.
- Olson, S. T.; Björk, I.; Sheffer, R.; Craig, P. A.; Shore, J. D.; Choay, J.: Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 12528-12538.
- 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.
- Patthy-Lukáts, A.; Károlyházy, L.; Szabó, L. F.; Podányi, B.: First Direct and Detailed Stereochemical Analysis of Strictosidine. *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 69-75.
- Peçanha, E. P.; Verli, H.; Rodrigues, C. R.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.: Highly diastereoselective mercury-mediated synthesis of functionalized 2-azabicyclo[3.3.0]octane derivatives. *Tetrahedr. Lett.*, **2002**, *43*, 1607-1611.

- Pereira, M. S.; Vilela-Silva, A. C. E. S.; Valente, A. P.; Mourão, P. A. S.: A 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. *Carbohydr. Res.*, **2002**, *337*, 2231-2238.
- 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.
- Peters, T.; Pinto, B. M.: Structure and dynamics of oligosaccharides: NMR and modeling studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1996**, *6*, 710-720.
- Petitou, M.; Duchaussoy, P.; Lederman, I.; Choay, J.; Sinay, P.; Jacquinet, J.-C.; Torri, G.: Synthesis of heparin fragments. A chemical synthesis of the pentasaccharide O-(2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyluronic acid)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2-O-sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronic acid)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-glucopyranose decasodium salt, a heparin fragment having high affinity for antithrombin III. *Carbohydr. Res.*, **1986**, *147*, 221-236.
- Petitou, M.; Duchaussoy, P.; Lederman, I.; Choay, J.; Jacquinet, J.-C.; Sinay, P.; Torri, G.: Synthesis of heparin fragments: a methyl  $\alpha$ -pentaoside with high affinity for antithrombin III. *Carbohydr. Res.*, **1987**, *167*, 67-75.
- Petitou, M.; Lormeau, J. C.; Choay, J.: Interaction of heparin and antithrombin III. The role of O-sulfate groups. *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *176*, 637-640.
- Petitou, M.; Jaurand, G.; Derrien, M.; Duchaussoy, P.; Choay, J.: A new, highly potent, heparin-like pentasaccharide fragment containing a glucose residue instead of a glucosamine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1991**, *1*, 95-98.
- Ponder, J. W.; Case, D. A.: Force fields for protein simulations. In *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.

- 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.
- Rueffer, M.; Kan-Fan, C.; Husson, H. P.; Stockigt, J.; Zenk, M. H.: 4,21-Dehydrogeissoschizine, an intermediate in heteroyohimbine alkaloid biosynthesis. *J. Chem Soc., Chem. Commun.*, **1979**, *22*, 1016-1018.
- Sandler, D. A.; Martin, J. F.: Autopsy proven pulmonary embolism in hospital patients: are we detecting enough deep vein thrombosis? *J. R. Soc. Med.*, **1989**, *82*, 203-205.
- Schaftenaar, G. MOLDEN. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, 1997.
- Schechter, I.; Berger, A.: On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, *27*, 157-162.
- 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. *Biochemistry*, **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.
- Schuttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F.: PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Cryst.*, **2004**, D60, 1355-1363
- Scott, W. R. P.; Hünenberger, P. H.; Tironi, I. G.; Mark, A. E.; Billeter, S. R.; Fennenn, J.; Torda, A. E.; Huber, T.; Krüger, P.; van Gunsteren, W. F.: The GROMOS biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, *103*, 3596-3607.
- Shamma, M.; Hindenlang, D. M. Em *Carbon 13-NMR Shift Assignments of Amines and Alkaloids*; Shamma, M., Hindenlang, D. M., Eds.; Plenum Press: New York, **1979**, pp 499-616.
- 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.



- Simonovic, M.; Gettins, P. G. W.; Volz, K.: Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *98*, 11131-11135.
- Skinner, R.; Abrahams, J.-P.; Whisstock, J. C.; Lesk, A. M.; Carrel, R. W.; Wardell, M. R.: The 2.6Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site. *J. Mol. Biol.*, **1997**, *266*, 601-609.
- Stein, P. E.; Leslie, A. G. W.; Finch, J. T.; Turnell, W. G.; McLaughlin, P. J.; Carrel, R. W.: Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature*, **1990**, *347*, 99-102.
- Stevens, L. H.: Formation and Conversion of Strictosidine in the Biosynthesis of Monoterpenoid Indole and Quinoline Alkaloids. Ph.D. Thesis, Leiden niversity, **1994**, p 121.
- Stewart, J.P., **1990**. MOPAC 6.00 Frank J. Seiler Research Laboratory, United States Air Force Academy, Colorado Springs, CO 80840-6528, USA.
- Stewart, J. J. P. *MOPAC 2000*; Fujitsu Limited: Tokyo, Japan, **1999**.
- Teien, A. N.; Lie, M.; Abildgaard, U.: Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated factor X. *Thrombosis Res.*, **1976**, *8*, 413-416.
- Thromboembolic Risk Factors (THRIFT) Consensus Group: Risk of and prophylaxis for venous thromboembolism in hospital patients. *Br. Med. J.*, **1992**, *305*, 567-574.
- Trager, W. F.; Lee, C. M.; Phillipson J. D.; Beckett, A. H.: The absolute configuration of paynantheine and hirsutine. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 1043-1047.
- Tvaroska, I.; Hricovani, M.; Petrakova, E.: An attempt to derive a new Karplus-type equation of vicinal proton carbon coupling-constants for C-O-C-H segments of bonded atoms. *Carbohydr. Res.*, **1989**, *189*, 359-362.
- Uedaira, H.; Okouchi, S.; Tsuda, S.; Uedaira, H.: Hydration of glucose and galactose derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2001**, *74*, 1116-1120.
- van Boeckel, C. A. A.; Beetz, T.; van Aelst, S. F.: Synthesis of a potent antithrombin activating pentasaccharide: a new heparin-like fragment containing two 3-O-sulphated glucosamines. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 803-806.
- 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 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/prodrq/prodrq.html>
- van der Spoel, D.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Hess, B.; Feenstra, K. A.; Lindahl, E.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C.: **2002**. GROMACS user manual version 3.1.1, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands.
- van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.: Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual. **1987**, Universidade de Groningen, Holanda.
- van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.: Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, *29*, 992-1023.
- Verli, H.; Barreiro, E. J.: Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Quim. Nova*, **2005**, *28*, 95-102.
- Verpoorte, R.; van der Heijden, R.; Moreno, P. R. H. Em *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Cordell, G. A., Ed.; Academic: London, **1997**, pp 221-299.
- 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.
- Wallace, A.C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M.: LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering*, **1995**, *8*, 127-134.
- Wenkert, E.; Chang, C.-J.; Chawla, H. P. S.; Cochran, D. W.; Hagaman, E. W.; King, J. C.; Orito K.: General methods of synthesis of indole alkaloids. 14. Short routes of construction of yohimboid and ajmalicinoid alkaloid systems and their carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 3645-3655.
- Whisstock, J. C.; Skinner, R.; Lesk, A. M.: An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem. Sci.*, **1998**, *23*, 63-67.

- Whisstock, J. C.; Skinner, R.; Carrel, R. W.; Lesk, A. M.: Conformational changes in serpins: I. The native and cleaved conformations of  $\alpha_1$ -antitrypsin. *J. Mol. Biol.*, **2000**, *295*, 651-665.
- Woods, R. J.; Pathiaseril, A.; Wormald, M. R.; Edge, C. J.; Dwek, R. A.: The high degree of internal flexibility observed for an oligomannose oligosaccharide does not alter the overall topology of the molecule. *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *258*, 372-386.
- Wright, H. T.: Ovalbumin is an elastase substrate. *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 14335-14336.
- 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.

## 10 Anexos

Durante a realização desta tese tive a oportunidade de realizar colaborações com os grupos do Prof. Eliezer J. Barreiro (Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio, Faculdade de Farmácia - UFRJ) e do Prof. Amílcar Tanuri (Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Genética – UFRJ), além de orientar a aluna de iniciação científica Camila F. Becker, Faculdade de Farmácia - UFRGS. Destas colaborações surgiram alguns trabalhos já publicados, submetidos ou em fase de finalização.

### 10.1 Trabalho I

*Quim. Nova*, **2005**, *28*, 95-102

#### **Um Paradigma da Química Medicinal: a Flexibilidade dos Ligantes e Receptores**

**Hugo Verli, Eliezer J. Barreiro**

#### **RESUMO**

In general, molecular modeling techniques applied in medicinal chemistry have been static and drug based. However the active site geometry and the intrinsic flexibility of both receptor and ligand are fundamental properties for molecular recognition and drug action. As a consequence, the use of dynamic models to describe the ligand-receptor complex is becoming a more common procedure. In this work we discuss the relevance of considering the receptor structure in medicinal chemistry studies as well as the flexibility of the ligand-receptor complex.

## 10.2 Trabalho II

*J. Pharm. Sci.*, **2004**, *23*, 363-369

### New Optimized Piperamide Analogues with Potent *in vivo* Hypotensive Properties

Carolina de Mattos Duarte, **Hugo Verli**, João Xavier de Araújo-Júnior, Isac Almeida de Medeiros, Carlos Alberto Manssour Fraga, Eliezer J. Barreiro

#### RESUMO

We describe herein the structural optimization of new piperamide analogues, designed from two natural prototypes, piperine **1** and piperdardine **2**, obtained from *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae). Molecular modeling studies using semiempirical AM1 method were made in order to establish rational modifications to optimize them by molecular simplification. The targeted compounds were obtained using benzaldehyde (**12**) and *para*-anisaldehyde (**13**) as starting materials. <sup>1</sup>H-NMR spectra showed that the target compounds were diastereoselectively obtained as the (*E*)-isomer, the same geometry of the natural prototypes. The new synthetic amides presented significant hypotensive effects in cardiovascular essays using *in vivo* methodologies. Compound **11** (*N*-[5-(4'-methoxyphenyl)-2(*E*)-pentenoyl]thiomorpholine) showed a potency >10,000 times greater than its prototype **5**, evidencing an optimization of the molecular architecture for this class of hypotensive drug candidates.

### **10.3 Trabalho III**

*J. Inf. Diseases*, 2005, 191, 1961-1970.

## **Subtype-dependent resistance to protease inhibitors by the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) protease L89M polymorphism**

Alexandre Calazans, Rodrigo Brindeiro, Patrícia Brindeiro, **Hugo Verli**, Luis Felipe M. Gonzalez, Jorge A. Guimarães, Ricardo Sobhie Diaz, Octavio C. Antunes, Amilcar Tanuri

### **RESUMO**

HIV-1 protease mutations rendering resistance to protease inhibitors (PIs) are phenotypically characterized mainly for subtype B viruses. In this work, we describe the role of HIV-1 protease L89M substitution from subtype F -recognized as a molecular signature of many non-B HIV-1 subtypes- for the viral resistance to six PIs (SQV, IDV, RTV, NFV, APV and LPV). This Leu to Met polymorphism is the same of its neighbor amino acid (aa.) 90, conferring primary resistance to Saquinavir (SQV) and Nelfinavir (NFV). Site-directed mutageneses were performed over plasmid-cloned drug susceptible protease genes of subtype B and F (Bwt and Fwt), to respectively create and reverse the M polymorphism of aa. 89; as well for the creation of L90M mutation. All the constructs were phenotyped in quadruplicates for PI susceptibility by MT-4 cell –MTT based cell viability assay. Their replicative capacity were also accessed by replicative competition assay (fitness assay). The L89M mutation conferred 4.5-, 2-, 6-, 4.7-, 4.5- and 3.4-fold increases in EC<sub>50</sub> for IDV, SQV, NFV, RTV, APV and LPV respectively, on Fwt 89M 90L virus; comparable to the fold resistance values obtained with Bwt 89L 90M virus. Surprisingly, Bwt 89M 90L clone behaved phenotypically similar to the susceptible Bwt 89L 90L virus for the latter four PIs. The Fwt 89M 90L also showed a replicative fitness comparable to the PI-susceptible Bwt 89L 90L and were more fit than its counterpart Bwt 89M 90L. Computational molecular dynamics analysis of F and B subtype proteases have

pointed significant differences between them for the hydrogen bond between the catalytic residue Asp25 and the hydroxyl group of Nelfinavir, besides differences in the PI positioning under the protease cleft. The L89M mutation impacts phenotypic resistance to SQV, NFV, RTV, APV and LPV differently for F and B clade viruses.

## 10.4 Trabalho IV

*J. Mol. Graph. Mod.*, 2005, em preparação

### **Differences Between Crystal and Solution 3D Structures of HIV p17: a Molecular Dynamics Study**

**Hugo Verli**, Alexandre Calazans, Rodrigo Brindeiro, Amilcar Tanuri, Jorge A. Guimarães

#### **RESUMO**

The matrix protein p17 (MA) is a product of proteolytic cleavage of the gag gene encoded polyprotein and is formed when HIV particles undergo the process of maturation. The MA protein is associated with the inner surface of the viral membrane and determines the overall shape of the virion. Previous studies have shown the existence of trimers of MA in solution and in the crystalline state. However, important structural differences could be observed in the p17 structure determined by NMR and crystallographic methods, as the C-terminal helix partial unfolding in solution structure. Since this helix is responsible for the anchoring of several HIV particle proteins, the understanding of its structural properties is a necessary upcoming in order to elucidate the molecular details of HIV maturation. In this context we use molecular dynamics (MD) simulations to describe the p17 solution structure, using both the NMR and crystallography determined structures as starting points for the simulations. The 10.0ns MD trajectories obtained indicates a partial unfolding of the C-terminal helix when the crystallographic structure is simulated in solution conditions, while the NMR structure is quite stable. These results suggest that the p17 folding can be influenced by crystal packing. As a consequence, the p17 function should be observed at the atomic level considering the existence of a C-terminal loop, instead of a rigid helix, a feature that accommodates more flexible and inducible interactions, as well as macromolecular assemblings.



## 10.5 Trabalho V

*Carbohydr. Res.*, 2005, em preparação

### **Molecular Dynamics Simulation Galactan and Fucan in Aqueous Solution**

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

#### **RESUMO**

Molecular dynamics (MD) simulations on galactan and fucan deca-saccharides were carried out, using explicit water models, in order to propose the 3D structure of each molecule in solution. The effect of both  ${}^1C_4$  and  ${}^4C_1$  chair forms on the polysaccharide conformation were evaluated. The glycosidic linkage energy map for sulfated and non-sulfated saccharides, the ligand-solvent interactions, and the global structure of each compound are related to its anticoagulant activities and compared to heparin properties.

## 11 Curriculum Vitae

### I. Prêmios recebidos:

- 20<sup>a</sup> Jornada de Iniciação Científica da UFRJ:** menção honrosa de mérito científico e 2<sup>o</sup> melhor trabalho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 23<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ:** melhor trabalho na seção de Química Medicinal da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- 32<sup>a</sup> Reunião Anual da SBBq:** 1<sup>o</sup> Colocado no IV Prêmio Painel da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.
- 33<sup>a</sup> Reunião Anual da SBBq:** Um dos 5 finalistas do 8<sup>o</sup> Prêmio Jovem Talento para Ciências da Vida da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

### II. Apresentação de Palestras:

- Verli, H.** 2002 Dinâmica molecular como ferramenta de planejamento racional de ligantes (inibidores) seletivos da ciclooxigenase-2, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1 de março de 2002.
- Verli, H.** 2002 Modelagem molecular e bioinformática aplicadas ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, XV Semana Acadêmica de Química, Universidade Luterana do Brasil, 10 de outubro de 2002.
- Verli, H.** 2004 O mercado farmacêutico internacional e o desenvolvimento de novos compostos bioativos, VI Semana Acadêmica de Farmácia, Universidade de Passo Fundo, 26 e 27 de outubro de 2003.

### III. Trabalhos científicos apresentados em congressos:

#### a. Nacionais:

- Verli, H.,** Romeiro, N. C., Alencastro, R. B. & Barreiro, E. J. **1998** Modelagem Molecular de Análogos Benzodiazepínicos. *Resumos da 21<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, vol. 1, SA-026. 21<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 25 a 28 de maio de 1998, Poços de Caldas, MG, Brasil.

- Verli, H.**, Albuquerque, M. G., Alencastro, R. B. & Barreiro, E. J. **1998** Estudos da Atividade de Análogos Benzodiazepínicos. *Resumos da 20ª Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio de Janeiro*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 20ª Jornada de Iniciação Científica da UFRJ, 3 a 6 de novembro de 1998, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Verli, H.**, Albuquerque, M. G., Alencastro, R. B. & Barreiro, E. J. **1999** Modelo de QSAR-3D para Receptor Benzodiazepínico: uma Nova Metodologia de Descrição da Afinidade. *Resumos da 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, vol. 1, MD-067. 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 25 a 28 de maio de 1999, Poços de Caldas, MG, Brasil.
- Verli, H.**, Albuquerque, M. G., Alencastro, R. B. & Barreiro, E. J. **1999** Estudos da Atividade de Análogos Benzodiazepínicos. *Resumos da 51ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, A.53-021/J – PUC-RS. 51ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência e 6ª Jornada Nacional de Iniciação Científica, 11 a 16 de julho de 1999, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Verli, H.**, Albuquerque, M. G., Rodrigues, C. R., Alencastro, R. B. & Barreiro, E. J. **1999** Modelo de QSAR-3D para Receptor Benzodiazepínico. *Resumos da 21ª Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio de Janeiro*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21ª Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 3 a 6 de novembro de 1999, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Verli, H.**, Albuquerque, M. G., de Alencastro, R. B. & Barreiro, E. J. **1999** Modelo Farmacofórico 3D para Ligantes do Receptor Benzodiazepínico: Descritores de Volumes de Interseção Setorizados. *Resumos do 8º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Rio*. 8º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Rio, 16 a 18 de novembro de 1999, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Duarte, C. M., **Verli, H.**, Araújo Jr., J. X., Rodrigues, C. R., Medeiros, I. A., Fraga, C. A. M. & Barreiro, E. J. **2000** Síntese, Modelagem Molecular e Avaliação Farmacológica de novos Análogos de Piperamidas Naturais, Planejados como Novos Agentes Cardiodepressores. *Resumos da 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, vol. 1, MD-075. 23ª Reunião Anual da

- Sociedade Brasileira de Química, 23 a 26 de maio de 2000, Poços de Caldas, MG, Brasil.
- Reis, A. L. A., Brito, F., Silva, E. T., Gonçalves, E. A., **Verli, H.**, Neves, J., Lima, L. M., Veloso, M. P., Rodrigues, C. R., Fraga, C. A. M., Miranda, A. L. P. & Barreiro, E. L. **2000** Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Candidatos a Protótipos de Fármacos Antitrombóticos e Antiinflamatórios, Utilizando Produto Natural. *Resumos do 6º Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica*, 2-34. 6º Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica, 30 de julho a 2 de agosto de 2000, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Menegatti, R., Macchi Jr, I. L., **Verli, H.**, Rodrigues, C. R., Fraga, C. A. M., Lima, V. L. E., & Barreiro, E. L. **2000** Planejamento e Síntese de Novos Candidatos a Protótipos de Agentes Neuroativos. *Resumos do 6º Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica*, 2-33. 6º Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica, 30 de julho a 2 de agosto de 2000, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Verli, H.**, Rodrigues, C. R. & Barreiro, E. J. **2001** Estudo do Modo de Interação de Inibidores da Enzima COX-2: O Papel do Encaixe Induzido. *Resumos da 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, MD-073. 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23 a 26 de maio de 2001, Poços de Caldas, MG, Brasil.
- Verli, H.**, Rodrigues, C. R., Fraga, C. A. M. & Barreiro, E. J. **2001** Interaction Profile of Fused Pyrazolopyridine Derivatives: A New Class of Neuroprotective Acetylcholinesterase Inhibitors. *Program and Abstracts of 3<sup>rd</sup> Workshop on Chemical Structure and Biological Activity: Perspectives on QSAR*, PII-14. 3<sup>rd</sup> Workshop on Chemical Structure and Biological Activity: Perspectives on QSAR, 8 a 10 de novembro de 2001, São Paulo, SP, Brasil.
- De Souza, S. D., Rodrigues, C. R., Fraga, C. A. M., Lima, L. M., **Verli, H.** & Barreiro, E. J. **2001** Desenvolvimento de Modelo de Reconhecimento Molecular de Agentes Moduladores de TNF-alfa e Inibidores de Fosfodiesterases (PDE's). *Resumos da 23ª Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio de Janeiro*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 23ª Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 6 a 10 de março de 2002, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- Ejzykowicz, F., **Verli, H.**, Rodrigues, C. R., Pinto, M. M. M. & Barreiro, E. J. **2001** Análise Conformacional de uma Série de Derivados Xantônicos Moduladores da PKC. *Resumos da 23ª Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio de Janeiro*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 23ª Jornada de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 6 a 10 de março de 2002, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Câmara, C. A., **Verli, H.**, Brazil-Más, L., Castro, N. G., Cintra, W. M., Aracava, Y., Albuquerque, E. X., Rodrigues, C. R. & Barreiro, E. J. **2001** Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Derivados Pirazolo[3,4-b]piridínicos inibidores da Acetilcolinesterase. *Workshop: Novas Aproximações para a Descoberta de Fármacos. Possibilidades e Limitações na América Latina*, Hotel do Frade, 19-24 de agosto de 2001, Angra dos Reis, RJ, Brasil.
- Rodrigues, C. R., Menezes, C. M. de S., Ifa, D., **Verli, H.**, Veloso, M. P., Fraga, C. A. M., Miranda, A. L. P. & Barreiro, E. J. **2001** Modelagem Molecular como Ferramenta para o Planejamento de Novos Fármacos. *Workshop: Novas Aproximações para a Descoberta de Fármacos. Possibilidades e Limitações na América Latina*, Hotel do Frade, 19-24 de agosto de 2001, Angra dos Reis, RJ, Brasil.
- Verli, H.**, Peçanha, E. P., Rodrigues, C. R., Barreiro, E. J. & Fraga, C. A. M. **2002** Diastereosseletividade em Reações de Heteromercuração de Olefinas: Uma Visão da Modelagem Molecular. *Resumos da 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, QO-047. 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 20 a 23 de maio de 2002, Poços de Caldas, MG, Brasil.
- Verli., H.** & Guimarães, J. A. **2003** Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin. *Programas e Resumos da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, M-99. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17 a 20 de maio de 2003, Caxambu, MG, Brasil.
- Verli, H.** & Guimarães, J. A. **2003** Molecular dynamics investigation of heparin recognition by antithrombin. *Resumos do V Congresso Ibero-Americano de Biofísica*, 30. XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica e V Congresso Ibero-Americano de Biofísica, 12 a 15 de outubro de 2003, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

**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.

**b. Internacionais:**

Araújo Jr., J. X., Parente, J. P., Duarte, C. M., **Verli, H.**, Rodrigues, C. R., Medeiros, I. A., Fraga, C. A. M., Julien, C., Barrès, C. & Barreiro, E. J. **2000** Síntese, Avaliação Farmacológica e Modelagem Molecular de Novos Análogos Cardioativos de Piperamidas Naturais. *Resumos do 24º Congresso Latinoamericano de Química*, QCB-112, 24º Congresso Latinoamericano de Química e XXI Congresso Peruano de Química, 15 a 19 de outubro de 2000, Lima, Peru.

Menegatti, R., Cunha, A. C., Fraga, C. A. M., Rodrigues, C. R., Macchi Jr., I. L., Lima, V. L. E., **Verli, H.** & Barreiro, E. J. **2000** Planejamento e Síntese de Novos Candidatos a Protótipos de Agentes Anti-Psicóticos, *N*-fenilpiperazínicos. *Resumos do 24º Congresso Latinoamericano de Química*, QCB-111, 24º Congresso Latinoamericano de Química e XXI Congresso Peruano de Química, 15 a 19 de outubro de 2000, Lima, Peru.

**Verli, H.** & Guimarães, J. A. **2004** Molecular dynamics investigation of the synthetic pentasaccharide recognition by antithrombin. *Protein Science*, **2004**, *13*, suppl. 1. Eighteenth Symposium of the Protein Society, 14 a 18 de agosto de 2004, San Diego, CA, EUA.

**IV. Publicações em periódicos especializados:**

**a. Nacionais:**

**Verli, H.**, Barreiro, E. J. **2005** Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores *Quim. Nova*, *28*, 95-102.

**b. Internacionais:**

**Verli, H.**, Albuquerque, M. G., Alencastro, R. B. & Barreiro, E. J. **2002** Local Intersection Volume: A New 3D Descriptor Applied to Develop a 3D-QSAR

- Pharmacophore Model for Benzodiazepine Receptor Ligands *Eur. J. Med. Chem.*, *37*, 219-229.
- Peçanha, P. E., **Verli H.**, Rodrigues C. R., Barreiro, E. J. & Fraga, C. A. M. **2002** Highly diastereoselective mercury mediated synthesis of functionalized 2-azabicyclo[3.3.0]octane derivatives *Tetrahedron Lett.*, *43*, 1607-1611.
- Rodrigues, C. R., Veloso, M. P., **Verli, H.**, Fraga, C. A. M., Miranda, A. L. P. & Barreiro, E. J. **2002** Selective PGHS-2 Inhibitors: A Rational Approach for Treatment of the Inflammation *Curr. Med. Chem.*, *9*, 849-867.
- Cardoso, C. L., Silva, D. H. S., Tomazela, D. M., **Verli, H.**, Young, M. C. M., Furlan, M., Eberlin, M. N., Bolzani, V. S. **2003** Turbinatine, a Potential Key Intermediate in the Biosynthesis of Corynanthean-Type Indole Alkaloids *J. Nat. Prod.*, *66*, 1017-1021.
- Barreiro, E. J., Camara, C. A., **Verli, H.**, Brazil-Mas, L., Castro, N. G., Cintra, W. M., Aracava, Y., Rodrigues, C. R., Fraga, C. A. M. **2003** Design, synthesis, and pharmacological profile of novel fused pyrazolo[4,3-d]pyridine and pyrazolo[3,4-b][1,8]naphthyridine isosteres: a new class of potent and selective acetylcholinesterase inhibitors *J. Med. Chem.*, *46*, 1144 - 1152.
- Rodrigues, C. R., Veloso, M. P., **Verli, H.**, Fraga, C. A. M., Miranda, A. L. P. & Barreiro, E. J. **2004** Selective PGHS-2 Inhibitors: A Rational Approach for Treatment of the Inflammation *Med. Chem. Rev. – Online*, *1*, 73-90.
- Verli, H.**, Guimarães, J. A. **2004** Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution *Carbohydr. Res.*, *339*, 281-290.
- Duarte, C. M., **Verli, H.**, Araújo-Júnior, J. X., Medeiros, I. A., Fraga, C. A. M., Barreiro, E. J. **2004** Molecular modeling, synthesis and pharmacological evaluation of new bioactive series of optimized piperamide analogues with potent hypotensive properties *in vivo Eur. J. Pharm. Sci.*, *23*, 363-369.
- Calazans, A.; Brindeiro, R.; Brindeiro, P.; **Verli, H.**, Arruda, M. B.; Gonzalez, L. M. F.; Guimarães, J. A.; Diaz, R. S.; Antunes, O. A.; Tanuri, A. **2005** Low accumulation of L90M in the Human Immunodeficiency *J. Inf. Diseases*, *191*, 1961-1970.
- 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.*, in press.
- Verli, H.**, Guimarães, J. A. **2005** Molecular dynamics investigation of heparin recognition by antithrombin *J. Mol. Graph. Mod.*, submetido.

**V. Orientações de Iniciação Científica:****a. Concluídas:**

Misael Schleger. *Estudo de modelagem molecular da atividade de formas mutantes da enzima quimosina*. Centro de Biotecnologia, UFRGS, de agosto de 2003 a fevereiro de 2005.

Vitório Sassi. *Desenvolvimento de ferramentas de análise aplicadas a simulações de dinâmica molecular*. Centro de Biotecnologia, UFRGS, a partir de março de 2004 a fevereiro de 2005.

**b. Em andamento:**

Camila Franco Becker. *Estudo de modelagem molecular da conformação de glicosaminoglicanos em solução aquosa*. Centro de Biotecnologia, UFRGS, a partir de agosto de 2003.

**VI. Bolsa recebida:**

Bolsista CNPq – PIBIC de março de 1999 a fevereiro de 2001.

Bolsista CNPq do programa de mestrado em química orgânica pelo Instituto de Química da UFRJ de março de 2001 a julho de 2002.

Bolsista CNPq do programa de doutorado em biologia molecular e celular pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS a partir de agosto de 2002.