

## Artigo

**O Papel de Carboidratos na Função Proteica: O Caso das PGHSs**

Sachett, L. G.; Verli, H.\*

*Rev. Virtual Quim.*, 2011, 3 (4), 275-285. Data de publicação na Web: 25 de junho de 2011<http://www.uff.br/rvq>**The Role of Carbohydrates on Protein Function: The Case of PGHSs**

**Abstract:** It is estimated that about half of all existing proteins are glycosylated. When bound to proteins, carbohydrates are able to affect several properties of such molecules, including physicochemical and biological properties, and therefore they became essential for understanding its function and its therapeutical modulation. One of many strategies to obtain information on the role of a glycoprotein's saccharidic moiety involves the tridimensional study of such macromolecules. This can be achieved using molecular modeling, specifically, molecular dynamics simulations. Therefore, our research group has been dedicated to the development and validation of low computational cost approaches, based on free of charge tools, capable of contribute to the understanding of biological phenomena. These procedures are presented next, using Prostaglandin Endoperoxide Synthase 1 and 2 as example.

**Keywords:** glycoproteins; molecular dynamics; cyclooxygenase

**Resumo**

Estima-se que em torno de metade das proteínas existentes na natureza sejam glicosiladas. Ao ligarem-se às proteínas, os carboidratos podem alterar diversas de suas propriedades, tanto físico-químicas quanto biológicas, tornando-se fundamentais no entendimento de suas funções e, como consequência, na sua modulação com finalidades terapêuticas. Uma das formas de obtermos informações acerca do papel da porção sacarídica de uma glicoproteína envolve o estudo da estrutura tridimensional destas biomacromoléculas, por exemplo, através de cálculos de modelagem molecular, particularmente simulações de dinâmica molecular.

Nosso grupo de pesquisas vem se dedicando ao desenvolvimento e a validação de abordagens de baixo custo computacional e baseadas em ferramentas gratuitas capazes de contribuir para o entendimento de fenômenos biológicos. Estes procedimentos serão apresentados a seguir, tomando como exemplo as enzimas denominadas Prostaglandinas Endoperoxído Sintases, em suas isoformas 1 e 2.

**Palavras-chave:** glicoproteínas; dinâmica molecular; ciclo-oxigenases.



\* Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43431, sala 202, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brasil.

✉ [hverli@cbiot.ufrgs.br](mailto:hverli@cbiot.ufrgs.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20110033](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110033)

## O Papel de Carboidratos na Função Proteica: O Caso das PGHSs

Liana G. Sachett, Hugo Verli\*

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

\* [hverli@cbiot.ufrgs.br](mailto:hverli@cbiot.ufrgs.br)

*Recebido em 21 de maio de 2011. Aceito para publicação em 14 de junho de 2011*

### 1. Introdução

### 2. Como obter modelos atomísticos para glicoproteínas?

#### 2.1. Estrutura Proteica

#### 2.2. Fração sacarídica

### 3. Papel da glicosilação na estrutura e função das PGHSs: impacto no planejamento de novos fármacos

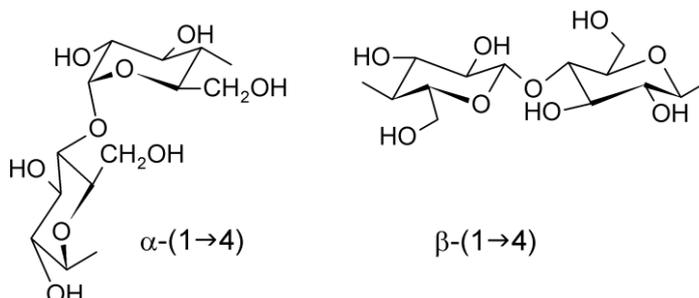
### 4. Conclusões

## 1. Introdução

Carboidratos são moléculas de grande complexidade estrutural e conformacional. Suas unidades monoméricas podem se ligar umas às outras de diferentes maneiras, ao contrário de proteínas e ácidos nucleicos, que fazem apenas um tipo de ligação entre si. Outra diferença entre estes polímeros biológicos é que carboidratos podem ser altamente ramificados, enquanto proteínas e moléculas como DNA e RNA são quase exclusivamente lineares.<sup>1</sup>

Os carboidratos são classificados de acordo com seu tamanho como monossacarídeos (uma única unidade de poli-hidroxialdeído ou cetona),

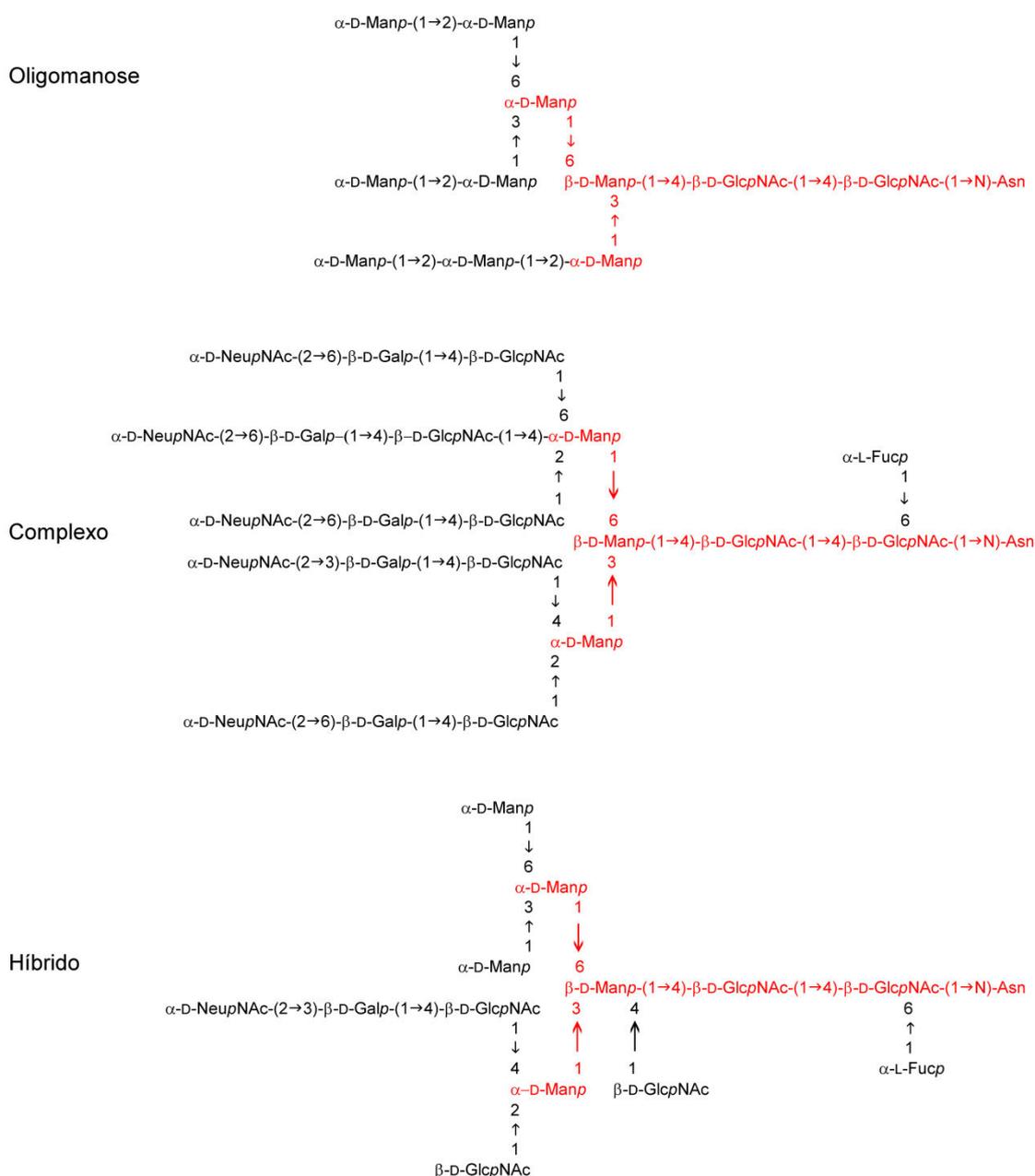
oligossacarídeos (cadeias curtas de unidades monossacarídicas) e polissacarídeos (polímeros de carboidratos de cadeias longas, geralmente com mais de 20 unidades monossacarídicas).<sup>2</sup> As ligações entre monossacarídeos, chamadas ligações glicosídicas, possuem duas possibilidades estereoquímicas,  $\alpha$  ou  $\beta$ , (Figura 1) enquanto cada monossacarídeo pode adotar duas formas isoméricas possíveis, D ou L (para maiores informações acerca de nomenclatura e estereoquímica de carboidratos, consultar IUPAC<sup>3</sup>). Ainda, os resíduos sacarídicos podem apresentar diversas modificações covalentes, como acetilação, metilação e sulfatação, dentre outros.<sup>4</sup>



**Figura 1.** Exemplos de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)

Oligossacarídeos podem ser encontrados ligados a diversas classes de moléculas, como triterpenos, flavonoides, lipídeos e proteínas gerando, neste último caso, as denominadas glicoproteínas. Estas biomoléculas são encontradas majoritariamente no lado externo da membrana plasmática, na matriz extracelular e no sangue. No interior das células são encontradas em organelas específicas, como no complexo de Golgi, retículo endoplasmático, grânulos secretores e lisossomos.<sup>1,5</sup> As glicoproteínas são fundamentais para muitos processos biológicos, incluindo resposta imune, crescimento celular, adesão entre células, degradação de coágulos sanguíneos e inflamação.<sup>1,6</sup>

As estruturas sacarídicas podem se ligar às proteínas através do átomo de nitrogênio de resíduos de asparagina (N-glicosilação) e do átomo de oxigênio de resíduos de serina, treonina ou hidroxilina (O-glicosilação). Adicionalmente, foram descritas C-, P- e S-glicosilações, embora não haja muitas informações sobre elas. A N-glicosilação apresenta um núcleo pentassacarídico característico e três tipos principais: oligomanose (apenas resíduos de manose adicionais ao núcleo), complexo (qualquer resíduo exceto manose adicionados ao núcleo) e híbrido (uma mistura dos dois tipos anteriores) (Figura 2).



**Figura 2.** Exemplos dos três tipos principais de N-glicosilação. Em vermelho está o núcleo pentassacarídico comum a todas as N-glicanas

O tipo de glicosilação pode depender tanto da proteína envolvida quanto do tecido onde ocorre a expressão da glicoproteína. Contudo, ao contrário do que ocorre na síntese de cadeias polipeptídicas, a síntese de oligo e polissacarídeos gera sequências de tamanhos variados, levando ao surgimento de populações de glicofomas para uma mesma glicoproteína. Assim, uma glicoproteína deve ser visualizada como uma coleção de glicofomas. Durante a adição das diferentes cadeias sacarídicas a uma determinada proteína, a glicosilação de um resíduo de aminoácido pode influenciar o processamento de outra glicosilação, principalmente através da limitação espacial ao acesso de glicosiltransferases.<sup>1,7</sup>

Os oligossacarídeos ligados nas glicoproteínas são capazes de alterar diversas das propriedades proteicas, tanto físico-químicas quanto biológicas. Isso é particularmente importante considerando estimativas de que em torno de 50% das proteínas existentes na natureza sejam glicosiladas.<sup>8</sup> Dentre as alterações físico-químicas podemos citar o aumento da resistência à proteólise e desnaturação, da viscosidade da solução, da solubilidade e a diminuição do ponto de congelamento da solução.<sup>9</sup> Do ponto de vista biológico, a presença de carboidratos ligados a proteínas pode facilitar sua interação com chaperonas, modificando seu processo de enovelamento, alterar sua interação com outras proteínas, seu transporte e a formação de unidades multiméricas, além de ser capaz de alterar a atividade catalítica e o pH ótimo de enzimas.<sup>10</sup>

Um exemplo de glicoproteína de grande importância terapêutica envolve as enzimas Ciclo-oxigenases ou Prostaglandina Endoperóxido Sintases (PGHSs), enzimas homodiméricas que atuam sintetizando prostaglandinas a partir de ácido araquidônico. As prostaglandinas, por sua vez, atuam como moléculas sinalizadoras em processos como dor, febre, inchaço e inflamação. Existem duas isoformas bem caracterizadas destas enzimas: a PGHS-1, conhecida como isoforma constitutiva, e a PGHS-2, isoforma majoritariamente induzida. Ambas são N-glicosiladas e encontradas no lúmen do retículo endoplasmático e no envelope nuclear, apresentando atividades ciclo-oxigenase e peroxidase.<sup>11</sup> A partir da cristalografia de raios X obtida para ambas isoformas,<sup>12,13</sup> pôde-se determinar as suas estruturas tridimensionais, sendo que cada monômero é composto por um domínio N-terminal do tipo fator de crescimento epidermal (EGF), um domínio de ligação à membrana (MBD, do inglês *membrane binding domain*) e um domínio catalítico C-terminal. Ambas PGHSs são N-glicosiladas nos resíduos de asparagina

Asn68, Asn144 e Asn410.<sup>14</sup> As glicanas encontradas nestes sítios são do tipo oligomanose<sup>15,16</sup> e fazem parte do processo de controle de qualidade para o correto enovelamento das enzimas.<sup>14</sup>

A estrutura dos oligossacarídeos presentes em glicoproteínas pode ser determinada experimentalmente por metodologias como a difração de raios-x e a ressonância magnética nuclear (RMN). Entretanto, se observarmos as estruturas de glicoproteínas depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB, [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)) obtidas por estes métodos, observamos que as estruturas sacarídicas geralmente estão incompletas. Isso se deve, principalmente, à alta flexibilidade das glicanas, que impede tanto a cristalização quanto a aquisição de densidade eletrônica adequada à solução das estruturas.<sup>17</sup> Mesmo quando conseguem ser obtidas por difração de raios-x, estas estruturas sacarídicas são de baixa qualidade, e estima-se que um terço dos dados para carboidratos encontrados no PDB contenha erros significativos de estereoquímica, nomenclatura e concordância com mapas de densidade eletrônica.<sup>18-20</sup> Ainda, frequentemente a porção sacarídica de glicoproteínas é removida para facilitar a cristalização de proteínas, de forma que muitas glicoproteínas tem sua estrutura tridimensional obtida na ausência de sua porção sacarídica<sup>21</sup>. Outro motivo para a ausência de carboidratos na estrutura de glicoproteínas se deve ao modo pelo qual estas moléculas são obtidas para cristalização, por exemplo, através de expressão recombinante em bactérias como *Escherichia coli*, conhecidas como incapazes de adicionarem carboidratos a resíduos de asparagina.<sup>18</sup>

Da mesma maneira, as estruturas obtidas por RMN também têm dificuldades em descrever corretamente carboidratos, já que elas representam uma média dos estados conformacionais existentes em solução, e a alta flexibilidade das glicanas produz um conjunto complexo de conformações, com a possibilidade de coexistirem múltiplos conformômeros simultaneamente em solução.<sup>17,22-24</sup> Como consequência, a média conformacional assim obtida pode não carregar consigo nenhuma ou pouca informação biologicamente relevante. A espectrometria de massas, por sua vez, é uma técnica capaz de descrever a composição dos oligossacarídeos contornando parte destas limitações,<sup>25</sup> embora não ofereça informações sobre a organização tridimensional dos compostos analisados.

A tridimensionalidade de estruturas sacarídicas é determinada, principalmente, pela geometria das ligações entre dois carboidratos vizinhos (ligação glicosídica). Esta, por sua vez, é principalmente

determinada pelos tipos de resíduos ligados, pelo tipo de ligação envolvida e pela interação destes resíduos com o solvente. Considerando estes aspectos, uma técnica adicional para estudo da estrutura tridimensional de carboidratos, ligados ou não a proteínas, envolve cálculos de modelagem molecular. Diversas abordagens vêm sendo empregadas na literatura para tal, tais como cálculos *ab initio*, cálculos de mecânica molecular, simulações por dinâmica molecular, *simulated annealing* e algoritmos genéticos, dentre outros.<sup>26,27</sup>

Neste contexto, nosso grupo de pesquisas vem se dedicando ao desenvolvimento e validação de abordagens prontamente disponíveis à comunidade científica, de baixo custo computacional e baseadas em ferramentas gratuitas, capazes de contribuir no entendimento de fenômenos biológicos.<sup>28</sup> Estes procedimentos serão apresentados a seguir, tomando como exemplo as PGHSs em suas isoformas 1 e 2. As ferramentas empregadas incluem o campo de força GROMOS96,<sup>29</sup> o pacote de simulação GROMACS<sup>30</sup> e os servidores *Glycosciences*<sup>31</sup> e PRODRG.<sup>32</sup>

## 2. Como obter modelos atomísticos para glicoproteínas?

Em linhas gerais, é possível inferir-se a estrutura de uma glicoproteína completa, mesmo na ausência de informações tridimensionais prévias para a parte sacarídica, através do emprego de ferramentas computacionais.<sup>33</sup> Para tal, podemos seguir as seguintes etapas principais: 1) obtenção da estrutura tridimensional da parte proteica; 2) obtenção da estrutura tridimensional da parte sacarídica; 3) ligação das partes proteica e sacarídica e avaliação das potenciais interferências mútuas entre carboidratos e aminoácidos (para auxílio no entendimento das metodologias de modelagem molecular empregadas, ver Sant'Anna, 2009<sup>26</sup>).

### 2.1. Estrutura proteica

Para obtenção da informação atomística da estrutura proteica, podemos empregar dados oriundos, principalmente, mas não exclusivamente, de: a) experimentos de difração de raios-X, b) experimentos de RMN, c) modelagem comparativa, d) modelagem por *folding recognition* e e) modelagem *ab initio*. Nos dois primeiros casos, os dados encontram-se disponíveis em repositórios públicos,

dentre os quais o principal é o PDB. Para os demais, programas e servidores gratuitos como Mholline para modelagem comparativa (<http://www.mholline.lncc.br/>), Robetta para modelagem *ab initio* (<http://rosetta.bakerlab.org/>) e Phyre para *folding recognition* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>), dentre outros, estão disponíveis. No presente caso, as estruturas das enzimas foram obtidas através do banco de dados PDB, sob códigos 1Q4G e 1CVU para PGHS-1 e PGHS-2, respectivamente.

### 2.2. Fração sacarídica

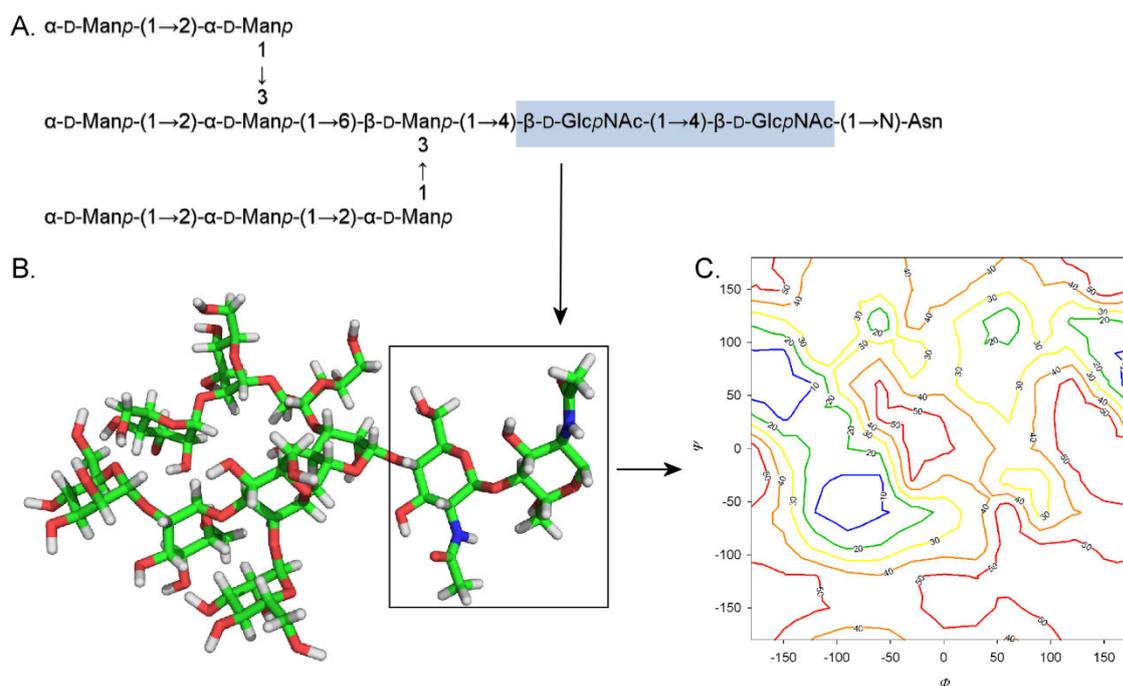
A abordagem empregada para construção de estruturas oligossacarídicas envolve as seguintes etapas: a) construção de mapas de contorno relaxados para cada ligação glicosídica; b) refinamento de cada mínimo de energia através de simulações de dinâmica molecular; c) identificação dos estados conformacionais majoritários em solução a serem empregados na d) construção das porções sacarídicas. Esta estratégia visa fornecer modelos tridimensionais de carboidratos representativos de seus estados conformacionais em soluções biológicas. Adicionalmente, a mesma abordagem pode ser empregada em outros meios, como soluções não-biológicas para o estudo de reações químicas.

Este procedimento, embora independa de informações experimentais prévias sobre a estrutura tridimensional da parte sacarídica da glicoproteína, depende do conhecimento da sequência de resíduos de carboidratos ligados à proteína. Para as estruturas de glicosilação presentes na PGHS-1, dados de RMN indicam a existência apenas de resíduos de N-acetilglicosamina (D-Glc<sub>p</sub>NAc) e manose (D-Man<sub>p</sub>) (portanto, uma glicana do tipo oligomanose), apresentando uma variação de 6 a 9 resíduos de manose em decorrência da existência de múltiplas glicofomas.<sup>15</sup> Para as glicanas presentes na PGHS-2, dados de espectrometria de massas sugerem a existência de três glicofomas distintas, todas do tipo oligomanose, contendo de 6 a 10 resíduos de manose.<sup>16</sup> Também existem dados para as glicanas das PGHSs no banco de dados PDB, embora todos estejam incompletos; a estrutura com maior número de resíduos de manose apresenta apenas três unidades deste carboidrato. A partir destas informações, tornou-se possível construir um modelo para os três sítios de glicosilação encontrados nas PGHSs, em concordância com os dados experimentais atualmente disponíveis para estas glicoproteínas (Figura 3A) (para detalhes adicionais ver Fernandes *et*

al., 2010<sup>33</sup>).

Uma vez definida a estrutura sacarídica, torna-se necessário identificar sua conformação em um determinado meio, em geral aquoso quando estudamos moléculas em meio biológico. Uma das formas de obter tais informações é através dos denominados mapas de contorno relaxados. Estes mapas são análogos a mapas de Ramachandran<sup>34</sup> e descrevem mínimos locais de energia para cada ângulo de diedro analisado. Assim, para definição da

conformação adotada pela parte sacarídica das PGHSs cada dissacarídeo contido na estrutura apresentada na Figura 3A foi submetido ao cálculo de mapas de contorno relaxados, em torno da ligação glicosídica. Isso foi feito girando-se os ângulos de torção  $\phi$  e  $\psi$  (Figura 4) de  $-180^\circ$  até  $150^\circ$ , em passos de  $30^\circ$ , totalizando assim 144 confôrmeros para cada ligação entre dois monossacarídeos (Figura 3).



**Figura 3.** A. Estrutura do oligossacarídeo presente nos sítios de glicosilação das PGHSs. A ligação  $\beta(1\rightarrow4)$  entre dois resíduos de D-GlcNAc está destacada. B. Estrutura tridimensional do mesmo oligossacarídeo presente em A. C. Mapa de contorno obtido para a ligação glicosídica destacada nos itens anteriores, mostrando as conformações de menor energia para esta ligação (regiões em azul)

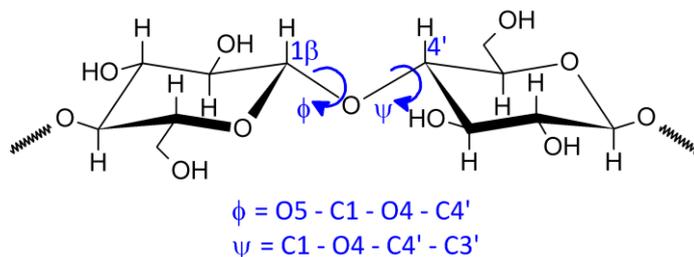
A orientação relativa de um par de resíduos de carboidratos é descrita, para diferentes tipos de ligação, por dois ou três ângulos de torção na ligação glicosídica (Figura 4). Para uma ligação (1 $\rightarrow$ X), onde 'X' é 2, 3, 4 ou 6 para ligações (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) e (1 $\rightarrow$ 6) respectivamente, os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  são definidos como:

$$\phi = \text{O5-C1-OX-CX}$$

$$\psi = \text{C1-OX-CX-C(X-1)}$$

Para a ligação (1 $\rightarrow$ 6) o ângulo  $\omega$  é definido como:

$$\omega = \text{O6-C6-C5-C4}$$



**Figura 4.** Ângulos de torção dos diedros  $\phi$  e  $\psi$  para uma ligação do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  de um dissacarídeo

Um aspecto importante na obtenção de mapas de contorno é que os mesmos são usualmente obtidos no vácuo. As conformações de menor energia assim obtidas, portanto, podem apresentar menor correspondência com fenômenos que ocorram em meio biológico. Desta forma, buscando contornar esta limitação ao adicionar efeitos do solvente na geometria das moléculas em estudo, os diferentes estados de mínimo de energia obtidos dos mapas de contorno foram submetidos a simulações de dinâmica molecular, na presença de moléculas de água. Tais

simulações permitem-nos caracterizar a abundância relativa dos diferentes estados conformacionais adotados por cada ângulo de diedro em uma ligação glicosídica. Estas geometrias, apresentadas na Tabela 1, foram empregadas na construção das glicanas que, em seguida, podem ser ligadas a estrutura da proteína empregando o portal *Glycosciences* (<http://www.glycosciences.de/>)<sup>31</sup> e, assim, possibilitar a obtenção de um modelo completo para a glicoproteína de interesse.

**Tabela 1:** Preferências conformacionais dos dissacarídeos presentes nas PGHSs quando simulados livres em solução

Dissacarídeo	Ângulo (°)		
	$\phi$	$\psi$	$\omega$
$\beta$ -D-GlcNAc-(1→4)- $\beta$ -D-GlcNAc	-80 ± 24	115 ± 16	-
$\beta$ -D-Manp-(1→4)- $\beta$ -D-GlcNAc	-160 ± 21	90 ± 18	-
$\alpha$ -D-Manp-(1→3)- $\alpha$ -D-Manp	160 ± 21	80 ± 21	-
$\alpha$ -D-Manp-(1→6)- $\beta$ -D-Manp	80 ± 23	-160 ± 30	60 ± 17
$\alpha$ -D-Manp-(1→2)- $\alpha$ -D-Manp	80 ± 25	-135 ± 36	-

Dados expressos em média ± desvio padrão, para o estado conformacional majoritário de cada ângulo de diedro, obtidos a partir de dissacarídeos simulados livres em solução. Estas geometrias são empregadas como pontos de partida para estudos de DM de glicoproteínas. Para detalhes adicionais ver Pol-Fachin & Verli, 2011<sup>28</sup>

### 3. Papel da glicosilação na estrutura e função das PGHSs: impacto no planejamento de novos fármacos

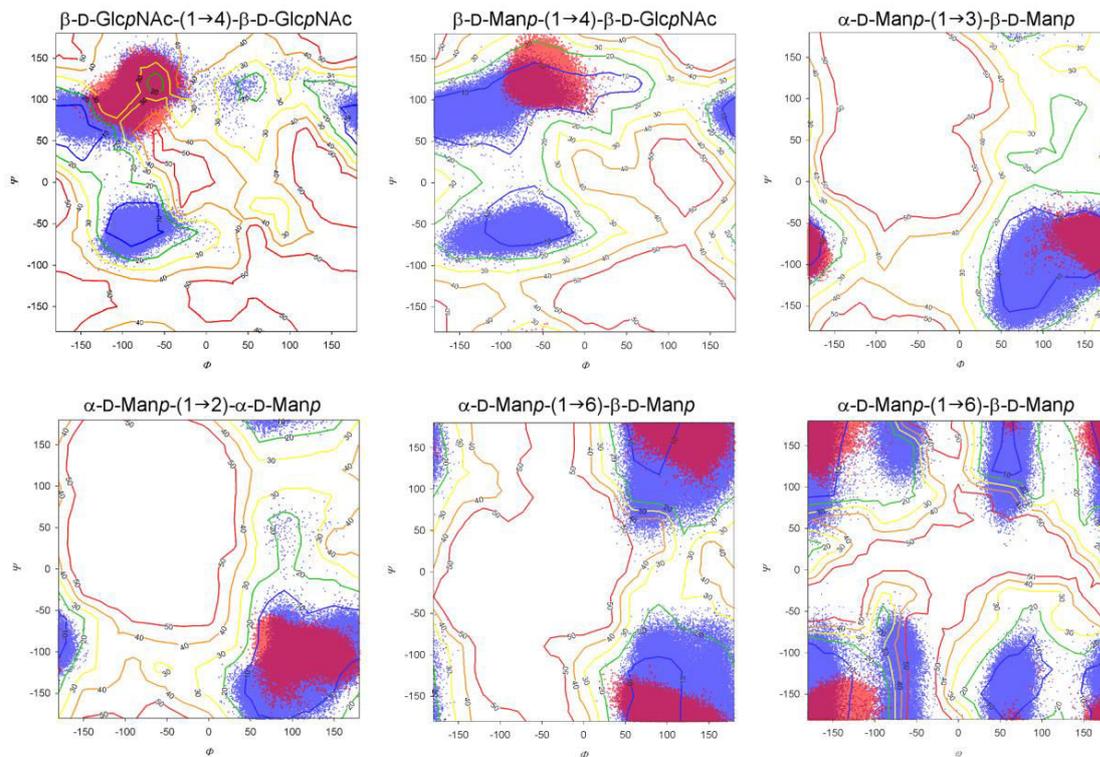
A partir da obtenção de um modelo para a estrutura completa de uma glicoproteína torna-se possível estudar o papel da parte sacarídica na estrutura, dinâmica e função proteicas. Para proteínas que são também receptores-alvo de fármacos, a obtenção de modelos mais precisos para a descrição de suas propriedades pode ter impacto direto no sucesso de esforços para obtenção de novos agentes terapêuticos. Uma das estratégias mais amplamente empregadas na literatura para obtenção destas informações, assim como para refinamento do modelo obtido, é a dinâmica molecular. Esta metodologia permite a caracterização da flexibilidade

e comportamento conformacional de moléculas e, particularmente no caso das glicoproteínas, o entendimento do papel da parte sacarídica na dinâmica de sua parte proteica.

Tal potencialidade das simulações de dinâmica molecular no entendimento da flexibilidade de compostos pode ser ilustrada na Figura 5, onde são sobrepostos mapas de contorno obtidos no vácuo aos estados conformacionais populados por diferentes ligações glicosídicas das glicanas ligadas às PGHSs. A maioria destes estados ocorre dentro ou nas proximidades de regiões de menor energia descritas nos respectivos mapas. Contudo, regiões adjacentes ou mesmo de maior energia são também populadas em solução, apontando para o papel do solvente na estabilização de diferentes estados conformacionais. Adicionalmente, podemos observar que o arcabouço glicoproteico é capaz de aumentar a rigidez das

ligações glicosídicas em relação à mesma ligação em dissacarídeos isolados (pontos vermelhos *versus* pontos azuis). Isto ocorre, principalmente, através do surgimento de interações intramoleculares entre os resíduos de carboidratos e de aminoácidos nas glicoproteínas. Contudo, estas interações tendem a

não promover grandes mudanças conformacionais nas ligações glicosídicas, isto é, não promovem novos estados conformacionais, mas predominantemente estabilizam estados já encontrados em solução para dissacarídeos isolados.<sup>33</sup>

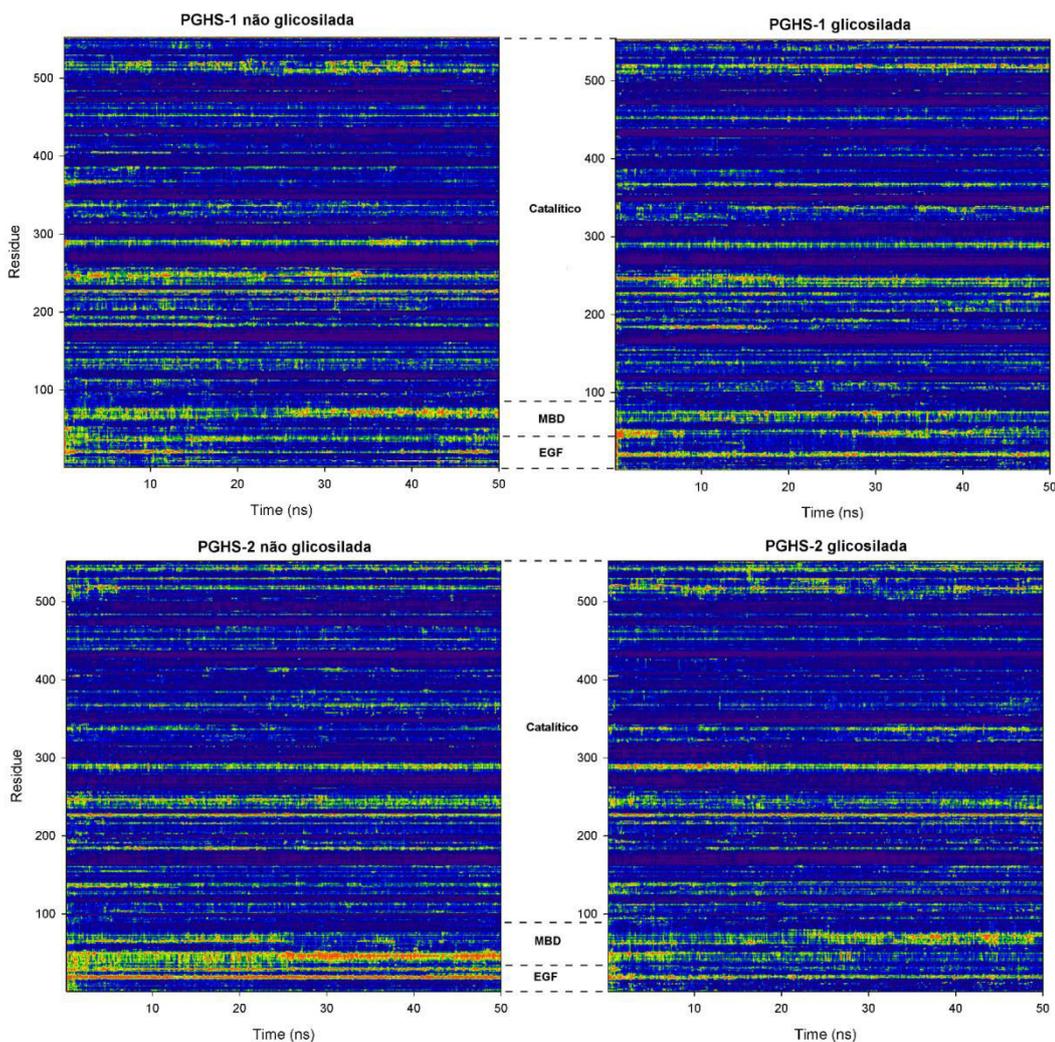


**Figura 5.** Mapas de contorno para cada uma das ligações glicosídicas contidas nas PGHSs. Cada mapa está sobrepostos às conformações populadas por cada ligação durante simulações de dinâmica molecular, quando na forma de dissacarídeos livres em solução (azul) e quando inseridos no ambiente glicoproteico (vermelho)

Uma das formas pelas quais carboidratos podem interferir na dinâmica proteica se dá através do enrijecimento da cadeia polipeptídica. Este tipo de alteração já havia sido descrito em trabalhos prévios no nosso grupo de pesquisa na proteína reguladora do complemento humana CD59, no domínio de adesão da proteína CD2, na subunidade a da gonadotrofina coriônica e também no domínio tipo EGF no fator VII de coagulação.<sup>24</sup> Nas PGHSs, também observamos um enrijecimento, na presença de glicosilação, no domínio EGF (Figura 6). Adicionalmente, dados obtidos por outros grupos têm demonstrado este tipo de efeito de enrijecimento do esqueleto peptídico na presença de glicanas, principalmente pelo aumento no número de interações polares entre soluto e solvente através dos resíduos de carboidratos adicionados, restringindo assim sua mobilidade.<sup>35</sup>

Outra forma pela qual a estrutura de carboidratos pode interferir na estrutura proteica se dá através da

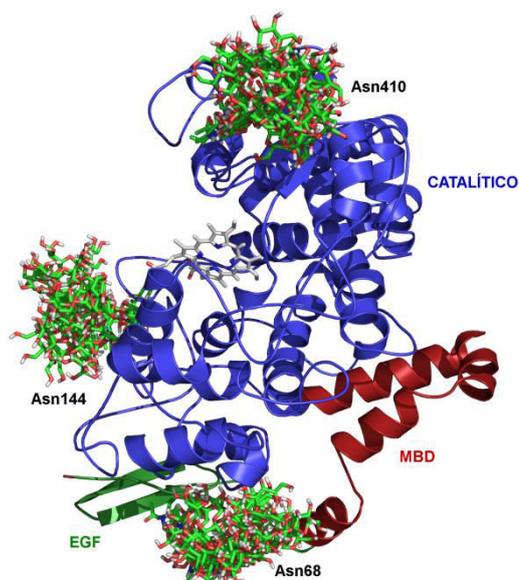
sua capacidade de cobrir uma ampla área da superfície proteica (Figura 7). Isso pode afetar a estrutura proteica de diversas maneiras, pois uma quanto maior a estrutura sacarídica, maior a sua capacidade de influenciar a conformação de diferentes regiões da glicoproteína, seja através de interações intramoleculares seja com o solvente. Isso também pode permitir que eles cubram áreas funcionalmente importantes, como sítios ativos, modulem interações de glicoconjugados com outras moléculas e afetem a taxa de ocorrência de mudanças conformacionais. Desta forma, carboidratos podem interferir diretamente, por exemplo, no acesso a sítios de ligação, na ativação proteica, na transmissão de efeitos conformacionais e na alteração na movimentação de alças. Adicionalmente, a glicosilação anormal de proteínas é diagnóstico de muitas doenças, incluindo artrite reumatóide e câncer.<sup>1</sup>



**Figura 6.** Dados de RMSF para as enzimas PGHS-1 e PGHS-2 glicosiladas e não glicosiladas. Este dado demonstra a variação na flexibilidade de cada resíduo durante o tempo de simulação. Regiões em laranja ilustram as maiores flexibilidades, enquanto regiões em azul pertencem a áreas mais rígidas

Tais influências da glicosilação nas propriedades proteicas podem impactar diretamente vários processos fisiológicos, particularmente aqueles dependentes de interações específicas proteína-proteína. De fato, interações entre proteínas e carboidratos (contidos ou não em glicoproteínas) são fundamentais para o processo de reconhecimento

entre células. Como consequência, o conhecimento da conformação de carboidratos torna-se fundamental para o entendimento da resposta biológica de interesse e sua posterior modulação terapêutica ao oferecer informações sobre os requisitos estruturais para o reconhecimento fármaco-receptor.



**Figura 7.** Sobreposição dos passos de uma simulação de dinâmica molecular (a cada 10 ns, num total de 50 ns de simulação) da enzima PGHS-2, contendo estruturas do tipo oligomanose nos três sítios de N-glicosilação, demonstrando assim a alta flexibilidade desta porção sacarídica

#### 4. Conclusões

A aquisição de modelos confiáveis de estrutura tridimensional de carboidratos em sistemas biológicos complexos, como glicoproteínas, tem sido um desafio tanto para os métodos experimentais quanto para os teóricos. Enquanto a DM tem sido considerada progressivamente uma boa estratégia para obter descrições conformacionais de moléculas em solução, muito utilizada para descrever proteínas, ácidos nucleicos e membranas, seu uso para representar glicoproteínas é muito menos frequente. Isso se deve principalmente à falta de parametrização de carboidratos, tarefa a qual nosso grupo de pesquisa tem se dedicado.

A descrição conformacional de glicanas pertencentes a sistemas biológicos, em seus diferentes níveis de complexidade, utilizando pacotes de simulação moleculares rápidos e gratuitos, pode ser realizada, conforme descrito. Os mapas de contorno relaxados obtidos para os dissacarídeos resultaram em conformações de menor energia que representaram um ponto de partida adequado para os demais refinamentos por dinâmica molecular do comportamento conformacional dos dissacarídeos e ligações glicosídicas. A combinação de simulações no vácuo e em solução é capaz de oferecer uma base adequada para um conjunto conformacional de ligações glicosídicas, baseado apenas na sequência do sacarídeo e na ausência de informações experimentais prévias. Esta abordagem, portanto, é

uma estratégia potencial para a construção de modelos tridimensionais de glicoproteínas, como exemplificado para as enzimas PGHS-1 e PGHS-2, auxiliando no entendimento do papel biológico de glicoconjugados em nível atômico.

A análise de estruturas oligossacarídicas por dinâmica molecular se apresenta, assim, como um método apropriado para determinar as conformações possíveis de um oligossacarídeo, sendo capaz de facilitar o planejamento de análogos de carboidratos específicos, capazes de inibir interações carboidrato-proteína, e assim desenvolver novos agentes terapêuticos para tratamento de doenças humanas, como artrite reumatóide, doenças priônicas, câncer e desordens congênitas de glicosilação.

#### Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, MCT e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brasil.

#### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- <sup>2</sup> Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. E.; *Essentials of Glycobiology*, 2a ed., Cold Spring Harbor: New York, 2009.
- <sup>3</sup> I.U.P.A.C.-I.U.B. *Commission on Biochemical Nomenclature Pure Applied Chemistry* **1996**, 68, 1919.
- <sup>4</sup> Pilobello, K. T.; Mahal, L. K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>5</sup> Gahmberg, C. G.; Tolvanen, M. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 8, 308. [[PubMed](#)]
- <sup>6</sup> Ohtsuba, K.; Marth, J. D. *Cell* **2006**, 126, 855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>7</sup> Wormald, M. R.; Wooten, E. W.; Bazzo, R.; Edge, C. J.; Feinstein, A.; Rademacher, T. W.; Dwek, R. A. *Eur. J. Biochem.* **1991**, 198, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>8</sup> Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1473, 4. [[PubMed](#)]
- <sup>9</sup> Varki, A. *Glycobiology* **1993**, 3, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>10</sup> Sears, P.; Wong, C. -H. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 223. [[CrossRef](#)]
- <sup>11</sup> DeWitt, D. L.; Rollins, T. E.; Day, J. S.; Gauger, J. A.; Smith, W. L. *J. Biol. Chem.* **1881**, 256, 10375. [[PubMed](#)]
- <sup>12</sup> Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M. *Nature* **1994**, 367, 243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Miyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings, W. C. *Nature* **1996**, 384, 644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>14</sup> Otto, J. C.; DeWitt, D. L.; Smith, W. L. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 18234. [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Mutsaers, J. H. G. M.; van Halbeek, H.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. *Eur. J. Biochem.* **1985**, 147, 569. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Nemeth, J. F.; Hochesang, G. P.; Marnett, L. J.; Caprioli, R. M. *Biochemistry* **2001**, 40, 3109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>17</sup> Woods, R. J. *Glycoconjugate J.* **1998**, 15, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>18</sup> Lütteke, T.; Frank, M.; von der Lieth, C. -W. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 1015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> Crispin, M.; Stuart, D. I.; Jones, E. Y. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, 14, 354. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> Berman, H. M.; Henric, K.; Nakamura, H.; Markley, J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, 14, 354. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> McPherson, A. *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor: New York, **1999**.
- <sup>22</sup> Cumming, D. A.; Carver, J. P. *Biochemistry* **1987**, 26, 6664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>23</sup> Wormald, M.; Petrescu, A. -J.; Pao, Y. -L.; Glythero, A.; Elliot, T.; Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>24</sup> Pol-Fachin, L.; Fernandes, C. L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>25</sup> Pérez, S.; Mulloy, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15, 517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>26</sup> Sant'Anna, Carlos M. R. *Rev. Virtual Quim.* **2009**, 1, 49. [[Link](#)]
- <sup>27</sup> Verli, H.; Guimarães, J. A. *Strategies for the determination of carbohydrates structure and conformation.*, 1a. ed., Kerala: Transworld Research Network, **2010**.
- <sup>28</sup> Pol-Fachin, L.; Verli, H. *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2011**. (No prelo)
- <sup>29</sup> van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Huenenberger, P. H.; Krueger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G.; *Simulation, Biomolecular. The GROMOS96 Manual and User Guide*, Vdf Hochschulverlag: AG Zurich, Switzerland, 1996.
- <sup>30</sup> van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>31</sup> Lütteke, T.; Bohne-Lang, A.; Loss, A.; Goetz, T.; Frank, M.; von der Lieth, C. -W. *Glycobiology* **2006**, 16, 71R. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>32</sup> Schuettelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, 60, 1355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>33</sup> Fernandes, C. L.; Sachett, L. G.; Pol-Fachin, L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2010**, 345, 663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>34</sup> Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. *J. Mol. Biol.* **1963**, 7, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>35</sup> Perera, L.; Darden, T. A.; Pedersen, L. G. *J. Comput. Chem.* **2002**, 23, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]