



Grupo de
**Bioinformática
Estrutural**
Centro de Biotecnologia / UFRGS

Modelagem Molecular de Glicoproteínas

Hugo Verli

Grupo de Bioinformática Estrutural
Centro de Biotecnologia - UFRGS

20 de Agosto de 2014

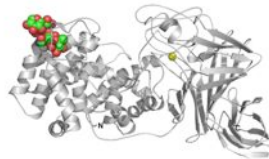
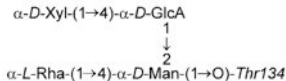
Conteúdo

1. O que são glicoproteínas?
2. Por que estudar glicoproteínas?
3. Modulação proteína-carboidrato
4. Em que glicoproteínas são diferentes de proteínas?
5. Desafios experimentais
6. Dificuldades na modelagem de glicoproteínas
7. Campos de força para glicoproteínas
8. Construção de glicoproteínas
9. Dinâmica molecular de glicoproteínas



1. O que são glicoproteínas?

- São moléculas formadas pela ligação de proteínas à oligossacarídeos.



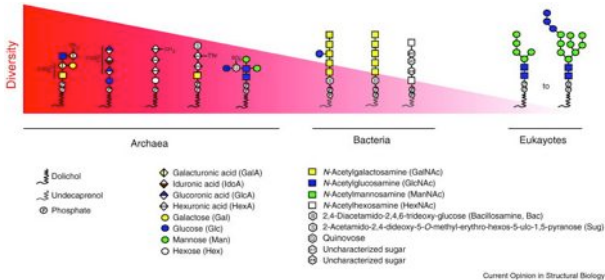
Heparinase II de *Pedobacter heparinus*¹.

¹C. L. Fernandes et al. Em: *J Biomol Struct Dyn* 7 (2014), pp. 1092–1102.



2. Por que estudar glicoproteínas?

- Todos os domínios da vida glicosilam proteínas².



Glicosilação nos diferentes domínios da vida.

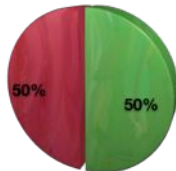
²F. Schwarz e M. Aebi. Em: *Curr Op Struct Biol* 21 (2011), pp. 576–582.



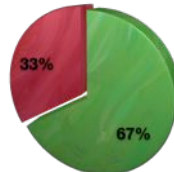
2. Por que estudar glicoproteínas?

- ▶ Em torno de **50 % de todas as proteínas** na natureza são glicosiladas³.
- ▶ **3/4 das proteínas de humanos** devem ser glicosiladas.

Glicoproteínas na natureza



Glicoproteínas em eucariotos



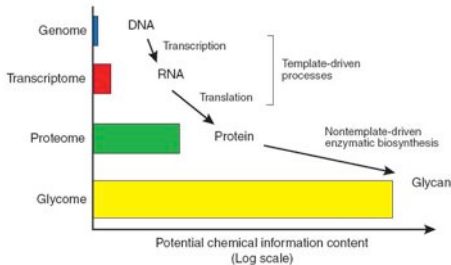
● Proteínas glicosiladas
● Proteínas não-glicosiladas

³R. Apweiler et al. Em: *Biochim Biophys Acta* 1473 (1999), pp. 4–8.



2. Por que estudar glicoproteínas?

- ▶ Estima-se que carboidratos carreguem ordens de grandeza de **informação química** potencial a mais que qualquer outro biopolímero⁴.



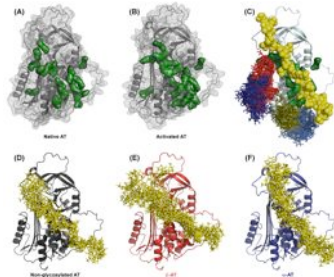
Informação química potencial associada a cada biopolímero.

⁴J. E. Turnbull e R. A. Field. Em: *Nat Chem Biol* 3 (2007), pp. 74–77.



2. Por que estudar glicoproteínas?

- A glicosilação de proteínas pode impactar **desde seu enovelamento até sua função**, ou ainda não provocar nenhum impacto observável (até o momento)⁵.



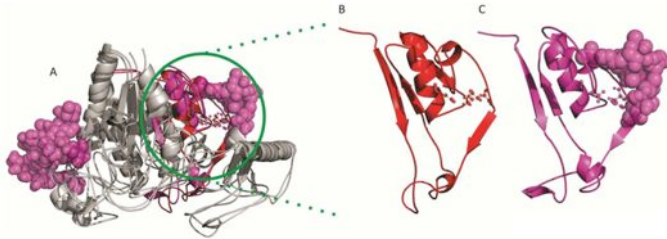
Antitrombina humana glicosilada e sua ligação à heparina.

⁵L. Pol-Fachin et al. Em: *Proteins* 79 (2011), pp. 2735–2745.



3. Modulação proteína-carboidrato

- ▶ Carboidratos podem modular o **acesso a regiões** específicas de proteínas, influenciando o atracamento proteína-proteína ou proteína-ligante⁶.



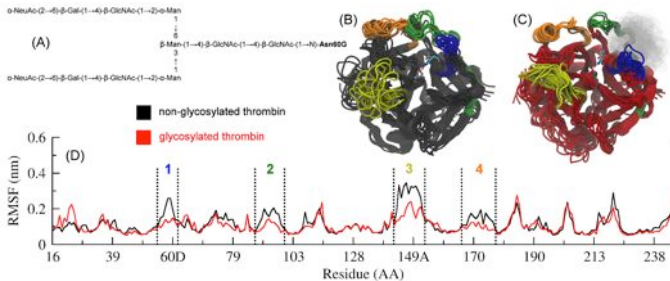
Arilsulfatase A humana glicosilada e o efeito da glicosilação no resíduo Asn350 sob sua resistência contra proteólise.

⁶M. Y. F. Virgens et al. Em: *J Biomol Struct Dyn* 32 (2014), pp. 567–579.



3. Modulação proteína-carboidrato

- Carboidratos podem alterar a **flexibilidade e perfil conformacional** de regiões próximas ou distantes de seu ponto de inserção em proteínas⁷.



Glicosilação interferindo na flexibilidade do esqueleto peptídico.

⁷L. Pol-Fachin e H. Verli. Em: *Glycobiology* 24 (2013), pp. 97–105.



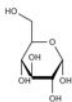
4. Em quê glicoproteínas são diferentes de proteínas?

- ▶ Há muito mais monossacarídeos que aminoácidos.
 - ▶ 20 aminoácidos no genoma;
 - ▶ >100 monossacarídeos na natureza.
- ▶ Há diversos tipos de ligação entre carboidratos, enquanto entre aminoácidos há somente uma.
 - ▶ α -D-(1 $\rightarrow$ 2) ou α -L-(1 $\rightarrow$ 2) ou β -D-(1 $\rightarrow$ 2) ou β -L-(1 $\rightarrow$ 2)
 - ▶ α -D-(1 $\rightarrow$ 3) ou α -L-(1 $\rightarrow$ 3) ou β -D-(1 $\rightarrow$ 3) ou β -L-(1 $\rightarrow$ 3)
 - ▶ α -D-(1 $\rightarrow$ 4) ou α -L-(1 $\rightarrow$ 4) ou β -D-(1 $\rightarrow$ 4) ou β -L-(1 $\rightarrow$ 4)

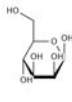


4. Em quê glicoproteínas são diferentes de proteínas?

- ▶ Alguns exemplos de carboidratos:



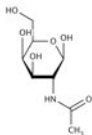
α -D-glucose



α -D-mannose



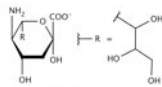
α -D-fucose



α -D-N-acetylgalactosamina



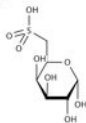
α -L-iduronato



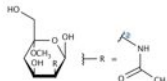
ácido α -L-neurâmico



α -D-bactosamina



6-C-sulfo- α -D-fucose

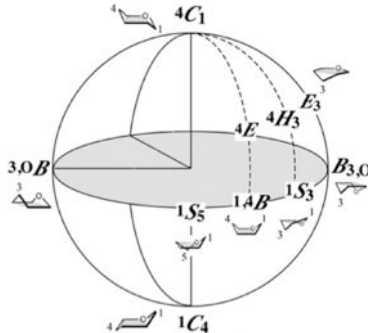


2NAc-2,4-dideoxi-hex-5-ulose



4. Em quê glicoproteínas são diferentes de proteínas?

- Carboidratos apresentam ainda **aspectos conformacionais únicos**, como o equilíbrio pseudo-rotacional.

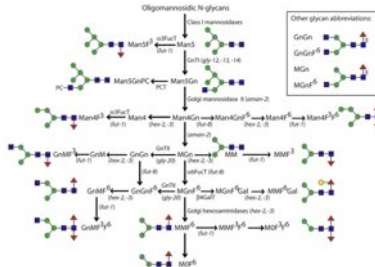


Representação dos diferentes estados conformacionais que podem ser adotados por hexopiranoses.



4. Em quê glicoproteínas são diferentes de proteínas?

- ▶ As sequências de carboidratos que compõem uma glicoproteína não são únicas, mas variáveis, gerando **diversas glicoformas**⁸.



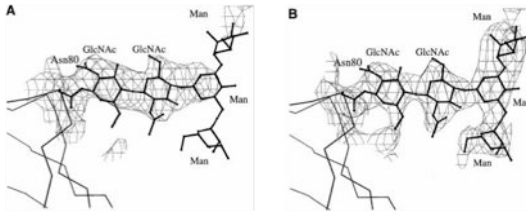
Estruturas de glicosilação em *Caenorhabditis elegans*.

⁸K. Paschinger et al. Em: *Carbohydr Res* 343 (2008), pp. 2041–2049.



5. Desafios experimentais

- ▶ Elevada flexibilidade e polaridade dificulta a cristalização...
- ▶ ... e acarreta em **densidade eletrônica difusa**, gerando por conseguinte estruturas de baixa qualidade⁹.



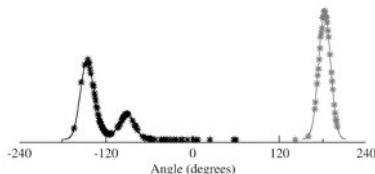
Mapa de densidade eletrônica da glicana N-ligada à Asn80 do domínio SCR2 da proteína CD46 humana.

⁹J. M. Casanovas et al. Em: *EMBO J* 18 (1999), pp. 2911–2922.



5. Desafios experimentais

- ▶ A alta flexibilidade também provoca **conformações médias** oriundas de RMN distantes de estados conformacionais biológicos¹⁰.



Distribuição conformacional obtida de simulações por DM e geometrias experimentais obtidas por RMN.

¹⁰ A. Imberty e S. Perez. Em: *Chem Rev* 100 (2000), pp. 4567–4588.



6. Dificuldades na modelagem de glicoproteínas

- ▶ O grande número de unidades monossacarídicas e de ligações glicosídicas exige um grande esforço de parametrização.
 - ▶ Gigantesco **número de blocos** a serem construídos.
 - ▶ Ausência da percepção da complexidade biológica destas biomoléculas.
- ▶ A carência de dados experimentais dificulta a **validação dos parâmetros** obtidos para campos de força, principalmente em fase condensada.
 - ▶ É ainda inviável caracterizar experimentalmente grande parte das unidades monossacarídicas observáveis na natureza.



6. Dificuldades na modelagem de glicoproteínas

- ▶ Ocorrência de **eventos conformacionais** específicos, como o efeito anomérico e deformação pseudo-rotacional.
- ▶ Alta **coordenação a metais**, com poucas informações experimentais.
- ▶ Harmonia dos parâmetros obtidos (e forma funcional) com aqueles de proteínas.
 - ▶ Esse problema é contornado através do uso das versões mais novas de AMBER, GROMOS e CHARMM.
 - ▶ Contudo, campos de força antigos como a família MM3, embora sejam bastante precisos, não permitem a integração eficiente com o arcabouço protéico.



7. Campos de força para glicoproteínas

- ▶ Os parâmetros mais modernos para descrição de glicoproteínas estão incluídos nos campos de força CHARMM, AMBER e GROMOS.
 - ▶ AMBER, GLYCAM06¹¹
 - ▶ CHARMM¹²
 - ▶ GROMOS, versões 56A6CARBO¹³ e 53A6GLYC^{14,15}

¹¹K. N. Kirschner et al. Em: *J Comput Chem* 29 (2008), pp. 622–655.

¹²O. Guvench et al. Em: *J Chem Theory Comput* 7 (2011), pp. 3162–3180.

¹³H. S. Hansen e P. H. Hunenberger. Em: *J Comput Chem* 32 (2011), pp. 998–1032.

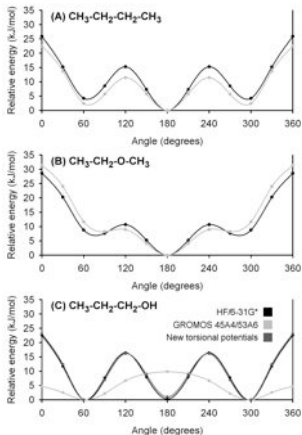
¹⁴L. Pol-Fachin et al. Em: *J Chem Theor Comp* 8 (2012), pp. 4681–4690.

¹⁵L. Pol-Fachin et al. Em: *J Comput Chem* (2014), in press.



7. Campos de força para glicoproteínas

► GROMOS 53A6GLYC:

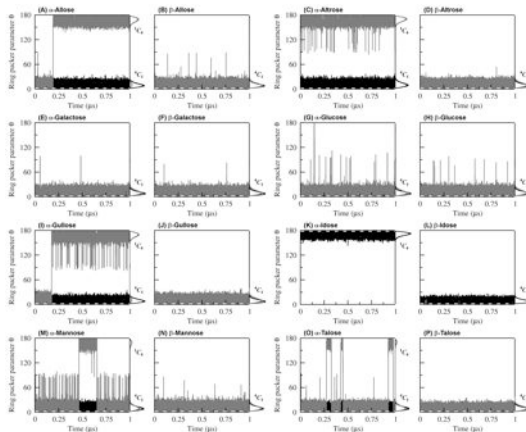


Novos potenciais propostos para aldohexopiranoses no GROMOS 53A6GLYC.



7. Campos de força para glicoproteínas

► GROMOS 53A6GLYC:



Equilíbrio pseudorotacional no GLYCAM06 (cinza) e no GROMOS 53A6GLYC (preto).



7. Campos de força para glicoproteínas

► GROMOS 53A6GLYC:

- N-glicosilação (resíduos de Asn ou Arg)
- O-glicosilação (resíduos de Ser, Thr, HyPro, HyLys ou Tyr)
- C-glicosilação (resíduos de Trp)
- S-glicosilação (resíduos de Cys)
- P-glicosilação ou glipiação (ligação à GPI).



8. Construção de glicoproteínas

- ▶ Por não haver praticamente dado experimental sobre esses sistemas, sua construção depende de **resultados computacionais**.
- ▶ Todavia, glicanas **não passam por enovelamento**, logo seus espaços conformacionais não são tão complexos quanto os de proteínas, facilitando sua amostragem em simulações relativamente curtas.



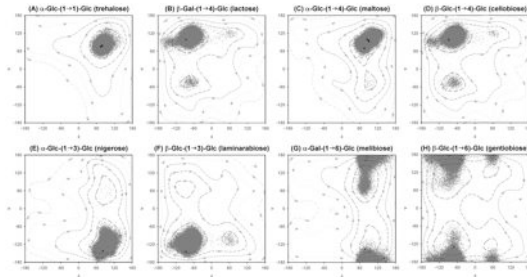
8. Construção de glicoproteínas

- ▶ Há dois conjuntos de abordagens distintas para obtenção de geometrias de partida para ligações entre carboidratos e entre aminoácidos e carboidratos:
 - ▶ Baseada em **mínimos de energia**;
 - ▶ Baseada em **geometrias mais abundantes** no meio de interesse.



8. Construção de glicoproteínas

- ▶ Emprega-se geometrias de menor energia originadas no vácuo ou solvente (implícito ou explícito);
 - ▶ Mas nem todos os mínimos são populados em solução, e nem toda diferença de energia é significativa em meio biológico.

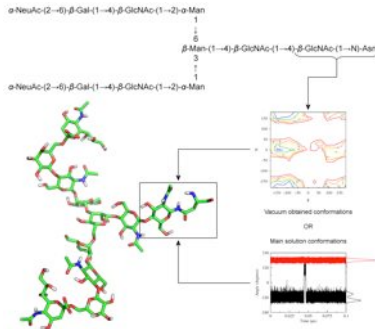


Perfil conformacional de dissacarídeos no GROMOS 53A6GLYC por metadinâmica (mapa de contorno), DM (pontos cinza) e dados experimentais (pontos pretos)¹⁴.



8. Construção de glicoproteínas

- ▶ Geometrias mais abundantes se aproximam ao comportamento conformacional esperado em soluções biológicas¹⁶.
 - ▶ Construção de glicanas:

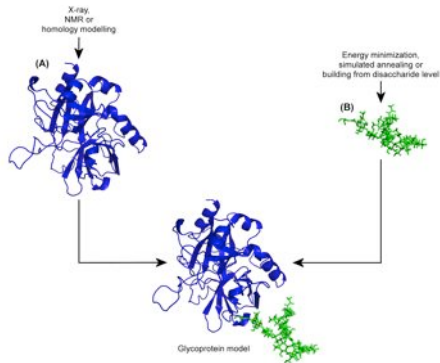


¹⁶L. Pol-Fachin e H. Verli. Em: *Mini-Rev Org Chem* 8 (2011), pp. 229–238.



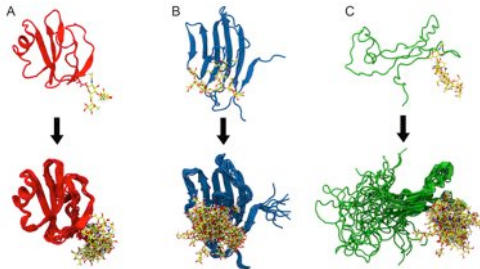
8. Construção de glicoproteínas

- ▶ Geometrias mais abundantes se aproximam ao comportamento conformacional esperado em soluções biológicas.
 - ▶ Montagem da glicoproteína:



8. Construção de glicoproteínas

- ▶ Dada a natureza flexível de carboidratos, um modelo estático é pouco informativo.
- ▶ Em contrapartida, essa flexibilidade facilita a busca conformacional.

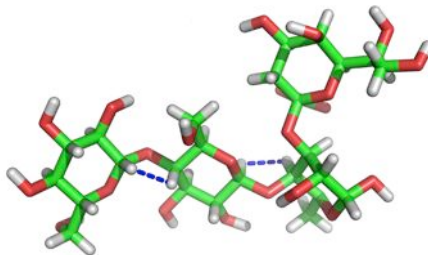


Sobreposição de modelos obtidos por RMN para glicoproteínas.



9. Dinâmica molecular de glicoproteínas

- ▶ Reprodução de dados experimentais em solução, como sinais de NOE^{17,18,19}:



Exopolissacarídeo da bactéria *Burkholderia caribensis*.

¹⁷L. Pol-Fachin et al. Em: *Carbohydr Res* 345 (2010), pp. 1922–1931.

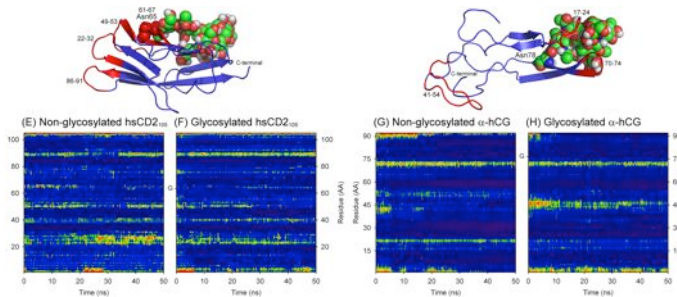
¹⁸M. O. Castro et al. Em: *J Biol Chem* 284 (2009), pp. 18790–18800.

¹⁹C. Pedebos et al. Em: *J Nat Prod* 75 (2012), pp. 1196–1200.



9. Dinâmica molecular de glicoproteínas

- Observação da influência de glicanas na dinâmica protéica²⁰:



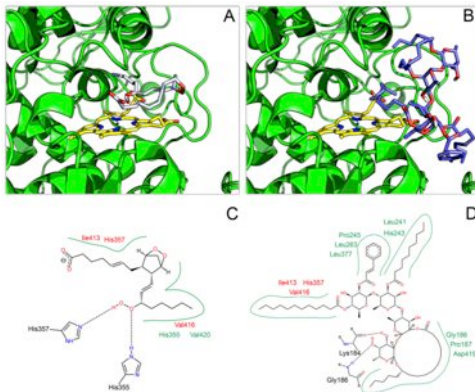
Heat map baseado em RMSF (janelas de tempo de 100ps) para proteínas glicosiladas e não glicosiladas.

²⁰Laercio Pol-Fachin et al. Em: *Carbohydr Res* 344 (2009), pp. 491–500.



9. Dinâmica molecular de glicoproteínas

- Construção de moléculas complexas e elucidação de aspectos funcionais²¹:

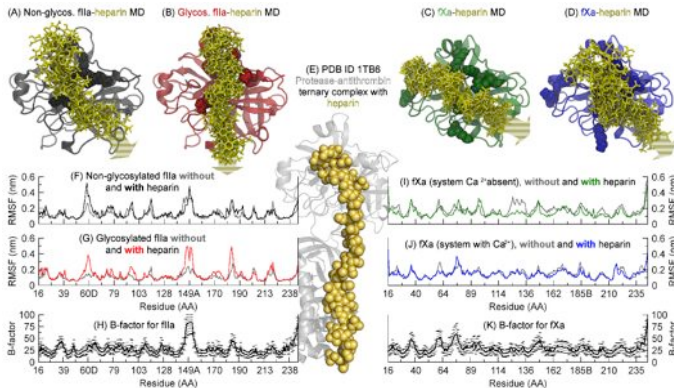


²¹P. Arantes et al. Em: *Molecules* 19 (2014), pp. 5421–5433.



9. Dinâmica molecular de glicoproteínas

► Influência de glicanas na orientação de ligantes⁷:



Complexo ternário trombina-antitrombina-heparina, na presença e ausência de glicosilação.



