

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Instituto de Química**

**Alana dos Reis Figueiredo**

**Estudo Teórico e Experimental de  
Proteômica Estrutural por  
Espectrometria de Massas Acoplada à  
Ligação Cruzada**

Dissertação apresentada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Química (Área de concentração: Química Orgânica).

**Orientador: Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo**

**Campinas – SP  
Fevereiro de 2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP**

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F469e | <p>Figueiredo, Alana dos Reis.<br/>Estudo teórico e experimental de proteômica estrutural por espectrometria de massas acoplada à ligação cruzada / Alana dos Reis Figueiredo. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Fabio Cesar Gozzo.</p> <p style="text-align: center;">Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. Espectrometria de massas. 2. Ligação cruzada. 3. Proteômica estrutural. 4. Dinâmica molecular.<br/>I. Gozzo, Fabio Cesar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p> |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Título em inglês:** Experimental and theoretical study of structural proteomics by mass spectrometry coupled to cross-linking

**Palavras-chaves em inglês:** Mass spectrometry, Cross-linking, Structural proteomics, Molecular dynamics

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo (orientador), Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Marcia Regina Soares da Silva (IQ-UFRJ)

**Data de defesa:** 25/02/2010

Dedico esta dissertação às  
mulheres da minha vida:  
minha mãe Maria, minha tia  
Sandra e minhas irmãs  
Thais e Marina.

Todos sabemos que cada dia que  
nasce é o primeiro para uns e será o  
último para outros e que, para a  
maioria, é só um dia mais.  
José Saramago

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Fabio, pelos ensinamentos, pela paciência e ótima convivência.

À minha querida mãe que é a minha fonte de inspiração para persistir e vencer em meus projetos.

À minha tia Sandra que me ensinou a ser uma pessoa forte e independente.

Às minhas irmãs, Thais e Marina, pela convivência e experiências únicas.

Aos meus primos Gustavo, Lucas e Barbara, para os quais eu desejo servir como exemplo de determinação e coragem.

Aos meus amigos do Grupo Dalton, Amadeu, Luiz, Carol, Pilau, Alexandre e Mariana, pela convivência, aprendizado, brincadeiras e aventuras.

Às minhas irmãs postças: Martha, Joana, Ana, Patrícia Aquino, Michelle, Tathiana, Sheila, Milena, Karen, Ângela, Patrícia Schonmann e Aline. Vocês estão em meu coração!

A todos os amigos de Campinas e São Paulo.

Ao Professor Munir e ao Paulo, pela colaboração, ajuda e paciência.

Ao Professor Marcos Eberlin pela assistência e disponibilidade.

Aos professores do Instituto de Química da UNICAMP pela contribuição única em minha formação acadêmica.

Ao Instituto de Química da UNICAMP e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela infraestrutura.

À Rede de Proteoma do Estado São Paulo.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## Curriculum Vitae

### Dados Pessoais

Alana dos Reis Figueiredo  
27/06/1983

### Formação Acadêmica

Bacharelado em Química  
Local: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas - SP.  
Período: março/2003 - dezembro/2007.

### Participação em Congressos Científicos

III Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas BrMass – Brasil (Dezembro/2009). *Evaluation of Cross-linker and Protein Dynamics in Cross-linking Coupled to Mass Spectrometry Experiments.*

Palavras-chaves: Simulação de Dinâmica Molecular e Espectrometria de Massas.

57th American Society for Mass Spectrometry – Philadelphia – PA - USA (Maio/2009). *Evaluation of Cross-linker and Protein Dynamics in Cross-linking Coupled to Mass Spectrometry Experiments.*

Palavras-chaves: Ligação cruzada, Espectrometria de Massas, Dinâmica Molecular e Biologia Estrutural.

18ª Reunião Anual de Usuários LNLS – Brasil (Fevereiro/2008). *Study of spatial constraints in the characterization of TIF34 protein.*

Palavras-chaves: Ligação Cruzada, Simulação de Dinâmica Molecular e Espectrometria de Massas.

II Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas BrMass – Brasil (Dezembro/2007). *Study of spatial constraints.*

Palavras-chaves: Simulação de Dinâmica Molecular e Espectrometria de Massas.

Congresso Interno de Iniciação Científica LNLS – Brasil (Julho/2007).  
Acoplamento de estruturas de afinidades em agentes de ligação cruzada.  
Palavras-chaves: Ligação Cruzada e Espectrometria de Massas.

II Workshop de Biologia Estrutural LNLS – Brasil (Fevereiro/2007).  
Palavras-chaves: Análise Estrutural de Proteínas, Cristalografia de Raios-X,  
Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas.

XI Disciplina Intersemestral UNICAMP – Métodos Modernos de Caracterização  
Estrutural e Dinâmica de Proteínas – Brasil (Janeiro/2007).  
Palavras-chaves: Análise Estrutural de Proteínas, CRX, RMN, MS.

### **Produção Bibliográfica**

FIGUEIREDO, A. R.; SOUZA, P. C. T.; SKAF, M. S.; GOZZO, F. C. *Evaluation of Cross-linker and Protein Dynamics in Cross-linking Coupled to Mass Spectrometry Experiments*. 3º Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, 2009, Campinas.

FIGUEIREDO, A. R.; SOUZA, P. C. T.; SKAF, M. S.; GOZZO, F. C. *Evaluation of Cross-linker and Protein Dynamics in Cross-linking Coupled to Mass Spectrometry Experiments*. 57th ASMS Conference on Mass spectrometry, 2009, Philadelphia.

FIGUEIREDO, A. R.; IGLESIAS, A. H.; GOZZO, F. C. *Study of spatial constrains of Tif34 protein for cross-linking experiments*. 2º Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, 2007, Campinas.

## Resumo

A espectrometria de massas (MS) desempenha um papel fundamental na proteômica, pois permite a identificação de proteínas, seqüenciamento de peptídeos, determinação de modificações pós-traducionais e análise quantitativa de expressão. Além das análises envolvendo a estrutura primária, há um grande interesse em se aplicar MS para análise de estruturas superiores (terciárias e quaternárias) de proteínas e uma das abordagens promissoras nesta área é a MS acoplada à ligação cruzada. Nesta abordagem, um reagente bifuncional liga covalentemente resíduos de aminoácidos espacialmente próximos e a distância máxima entre esses resíduos é dado pelo tamanho do agente de ligação cruzada (ALC). Nesse trabalho avaliou-se a extensão e exatidão das distâncias interresíduos tanto por simulações de dinâmica molecular quanto por experimentos de MS. As faixas de distâncias calculadas mostram que há sempre uma distância mínima entre resíduos ao qual o ALC pode se ligar, além de determinar o valor máximo para cada um dos ALC estudados (DSG, DSS e DSSeb). Os dados experimentais com proteínas modelo (Ubiquitina, Citocromo C e Mioglobina) mostraram ainda que todos dos peptídeos que apresentavam ligações cruzadas estavam dentro da faixa de alcance determinadas pelas simulações de dinâmica molecular, confirmando a exatidão do método. Os novos valores de tamanho das moléculas de ALC estudados podem agora ser utilizados para a determinação de estruturas superiores de proteínas através da técnica de MS acoplada a ligação cruzada



## **Abstract**

Mass spectrometry (MS) plays a key role in proteomics because it allows the identification of proteins, peptide sequencing, determination of post-translational modifications and quantitative expression analysis. There is a great interest in using MS to perform analysis beyond the primary structure, i. e. tertiary and quaternary structures, and one of the most promising approaches in this field is MS coupled to cross-linking technique. In this approach, a bifunctional reagent covalently binds amino acid residues that are close in space and the maximum distance between these residues is given by the arm length of the cross-linking agent. In this study we evaluated the extent and accuracy of the inter-residues distances by both molecular dynamics simulations and MS experiments. Simulated distance ranges showed that there is a minimum distance between residues to which the reagent can bind and a maximum value for each of the studied reagents (DSG, DSS and DSSEb). The experimental data from model proteins (Ubiquitin, Cytochrome C and Myoglobin) also showed that all the detected modified peptides were within the ranges determined by the molecular dynamics simulations, confirming the accuracy of the method. The new space arm length values of the reagent molecules can now be used for the determination of proteins higher structures by the MS coupled to cross-linking technique.

# Índice

|                                                                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Lista de Acrônimos e Abreviaturas.....                                                                                               | xiii |
| Lista de Tabelas.....                                                                                                                | xiv  |
| Lista de Figuras.....                                                                                                                | xv   |
| <br>                                                                                                                                 |      |
| 1. Introdução.....                                                                                                                   | 01   |
| 1.1. Espectrometria de Massas (MS).....                                                                                              | 01   |
| 1.2. Ligação Cruzada combinada à Espectrometria de Massas.....                                                                       | 03   |
| 1.3. Simulações de Dinâmica Molecular.....                                                                                           | 08   |
| 2. Objetivos.....                                                                                                                    | 11   |
| 2.1. Objetivo Geral.....                                                                                                             | 11   |
| 2.2. Objetivos Específicos.....                                                                                                      | 11   |
| 3. Parte Experimental.....                                                                                                           | 12   |
| 3.1. Experimentos de Ligação Cruzada.....                                                                                            | 12   |
| 3.1.1. Preparação das amostras para avaliação do número médio de modificações<br>por proteínas em função da concentração de ALC..... | 12   |
| 3.1.2. Preparação das amostras para identificação dos peptídeos<br>modificados.....                                                  | 12   |
| 3.2. Análise dos produtos de reação por MS.....                                                                                      | 13   |
| 3.2.1. Análise das proteínas intactas modificadas.....                                                                               | 13   |
| 3.2.2. Análise dos digestos.....                                                                                                     | 15   |
| 3.3. Cálculos <i>ab initio</i> .....                                                                                                 | 17   |
| 3.4. Simulações de Dinâmica Molecular (DM).....                                                                                      | 18   |
| 3.4.1. Simulação dos ALC.....                                                                                                        | 19   |
| 3.4.2. Simulação das Ubq modificadas.....                                                                                            | 19   |
| 4. Resultados e Discussão.....                                                                                                       | 20   |
| 4.1. Cálculo das Cargas Atômicas.....                                                                                                | 20   |
| 4.2. Simulações de Dinâmica Molecular.....                                                                                           | 27   |
| 4.2.1. Faixas de distância dos ALC solvatados.....                                                                                   | 27   |
| 4.2.3. Faixas de distância dos ALC parcialmente ligados.....                                                                         | 30   |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3. Experimentos ALC + MS.....                                                             | 36 |
| 4.3.1. Análise das proteínas intactas modificadas: Número de modificações por proteína..... | 36 |
| 4.3.2. Mapeamento dos resíduos de lisina da Ubq.....                                        | 46 |
| 4.3.3. Análise de LC-MS/MS: Identificação dos peptídeos ligados pelos ALC.....              | 50 |
| 5. Conclusões.....                                                                          | 61 |
| 6. Referências.....                                                                         | 63 |
| 7. Anexos.....                                                                              | 67 |
| 7.1. Arquivo Topologia.....                                                                 | 67 |
| 7.2. Arquivo Parâmetro.....                                                                 | 75 |

## Acrônimos e Abreviaturas

|                          |                                                                 |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| ACN.....                 | Acetonitrila                                                    |
| Cadeia Espaçadora.....   | CE                                                              |
| CID.....                 | Dissociação induzida por colisão                                |
| CitC.....                | Citocromo C                                                     |
| Da.....                  | Dalton                                                          |
| DDA.....                 | Análise dependente dos dados                                    |
| DMF.....                 | Dimetilformamida                                                |
| DRX.....                 | Difração de Raios-X                                             |
| DSG.....                 | Dissuccinimidil Glutarato                                       |
| DSS.....                 | Dissuccinimidil Suberato                                        |
| DSSeb.....               | Dissuccinimidil Sebacato                                        |
| ESI.....                 | Ionização por <i>Electrospray</i>                               |
| HF.....                  | Hartree-Fock                                                    |
| [M+H] <sup>+</sup> ..... | Molécula monocarregada                                          |
| MB.....                  | Mioglobina                                                      |
| MS.....                  | Espectrometria de Massas                                        |
| MS/MS.....               | Espectrometria de Massas Sequencial                             |
| m/z.....                 | Relação massa-carga                                             |
| NCBI.....                | <i>National Center for Biotechnology Information</i>            |
| NHS.....                 | N-hidróxisuccinimida                                            |
| RMN.....                 | Ressonância Magnética Nuclear                                   |
| RCSB.....                | <i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>     |
| SDS-PAGE.....            | Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecilsulfato de sódio |
| Tris-HCl.....            | Tris-Hidrocloreto                                               |
| Ubq.....                 | Ubiquitina                                                      |
| UPLC.....                | Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho                       |
| ALC.....                 | Agente(s) de Ligação Cruzada                                    |
| ALC + MS.....            | Ligação Cruzada combinada à Espectrometria de Massas            |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> Diferenças acrescidas pelas modificações nas massas das proteínas.....            | <b>14</b> |
| <b>Tabela 2:</b> Cargas atômicas do DSSeb.....                                                     | <b>22</b> |
| <b>Tabela 3:</b> Cargas atômicas do DSG.....                                                       | <b>23</b> |
| <b>Tabela 4:</b> Cargas atômicas do DSS.....                                                       | <b>24</b> |
| <b>Tabela 5:</b> Faixas de alcance dos ALC considerando uma frequência relativa mínima de 10%..... | <b>28</b> |
| <b>Tabela 6:</b> Pares de lisinas do CitC que podem formar ligações cruzadas.....                  | <b>49</b> |
| <b>Tabela 7:</b> Pares de lisinas da Mb que podem formar ligações cruzadas.....                    | <b>49</b> |
| <b>Tabela 8:</b> Peptídeos modificados da Ubq.....                                                 | <b>55</b> |
| <b>Tabela 9:</b> Peptídeos modificados do CitC.....                                                | <b>55</b> |
| <b>Tabela 10:</b> Peptídeos modificados da Mb.....                                                 | <b>55</b> |

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1:</b> Principais áreas de aplicação da Espectrometria de Massas. Dados obtidos da base de dados ISI Web of Knowledge no período de 1993 a 2004, considerando as 500 principais publicações do ano..... | <b>02</b> |
| <b>Figura 2:</b> Esquema da reação entre o ALC reativo a grupos amina ( $\sim$ = cadeia espaçadora).....                                                                                                          | <b>03</b> |
| <b>Figura 3:</b> Os ALC baseados em ésteres da NHS, empregados nesse estudo.....                                                                                                                                  | <b>04</b> |
| <b>Figura 4:</b> Tipos de produtos previstos na reação de ligação cruzada. Adaptado da referência [21].....                                                                                                       | <b>05</b> |
| <b>Figura 5:</b> Estratégia para detecção de peptídeos ligados pelos ALC por MS e a aquisição da informação estrutural [22].....                                                                                  | <b>06</b> |
| <b>Figura 6:</b> Perfil cromatográfico utilizado na eluição das proteínas intactas.....                                                                                                                           | <b>13</b> |
| <b>Figura 7:</b> Perfil cromatográfico utilizado na eluição dos digestos protéicos.....                                                                                                                           | <b>15</b> |
| <b>Figura 8:</b> Parâmetros empregados na identificação das proteínas.....                                                                                                                                        | <b>16</b> |
| <b>Figura 9:</b> As linhas coloridas destacam os diedros que foram mantidos fixos (em ambos as extremidades dos ALC) durante a otimização da estrutura para posterior cálculo das cargas atômicas.....            | <b>20</b> |
| <b>Figura 10:</b> Estrutura do agente de ligação cruzada DSSeb.....                                                                                                                                               | <b>22</b> |
| <b>Figura 11:</b> Estrutura do agente de ligação cruzada DSG.....                                                                                                                                                 | <b>23</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 12:</b> Estrutura do agente de ligação cruzada DSS.....                                                                                                                                                                                                                           | <b>24</b> |
| <b>Figura 13:</b> Varredura do diedro entre os átomos –(CNO)– do grupo NHS.....                                                                                                                                                                                                             | <b>25</b> |
| <b>Figura 14:</b> Histogramas das distâncias da cadeia espaçadora dos ALC livre em solução: A - DSG, B – DSS e C – DSSeb.....                                                                                                                                                               | <b>27</b> |
| <b>Figura 15:</b> A – Diferença na determinação das faixas de distância para o DSG e DSS, feitas em nosso estudo (1) e por Green et al [46] (2). B – Limites inferior e superior relatados por Green et al [46] não foram estatisticamente analisados.....                                  | <b>29</b> |
| <b>Figura 16:</b> Histogramas dos comprimentos das cadeias espaçadoras: A - DSG, B - DSS e C - DSSeb parcialmente ligados a lisina 33 da Ubq.....                                                                                                                                           | <b>30</b> |
| <b>Figura 17:</b> Histogramas dos comprimentos das cadeias espaçadoras: A - DSG, B -DSS e C - DSSeb parcialmente ligados a lisina 11 da Ubq.....                                                                                                                                            | <b>31</b> |
| <b>Figura 18:</b> Histogramas dos comprimentos das cadeias espaçadoras: A - DSG, B -DSS e C - DSSeb parcialmente ligados a lisina 29 da Ubq.....                                                                                                                                            | <b>31</b> |
| <b>Figura 19:</b> A – Interação entre o DSS e o resíduo treonina 12 relacionado à gaussiana em torno de 8,6 Å. B – Em destaque, a barreira estérica formada pelos resíduos ao redor da lisina 33 a qual o DSS está ligado, que impede um maior estiramento da cadeia espaçadora do ALC..... | <b>32</b> |
| <b>Figura 20:</b> Faixas de distâncias (medida em Å) do DSG livre e parcialmente ligado as lisinas 33, 11 e 29 da Ubq.....                                                                                                                                                                  | <b>33</b> |
| <b>Figura 21:</b> Faixas de distâncias (medida em Å) do DSS livre e parcialmente ligado as lisinas 33, 11 e 29 da Ubq.....                                                                                                                                                                  | <b>33</b> |

|                                                                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 22:</b> Faixas de distâncias (medida em Å) do DSSeb livre e parcialmente ligado as lisinas 33, 11 e 29 da Ubq.....                                                          | <b>34</b> |
| <b>Figura 23:</b> Espectros de Massa das proteínas intactas (não modificadas) A – Ubq, B – CitC e C – Mb.....                                                                         | <b>38</b> |
| <b>Figura 24:</b> Espectros de massa da Ubq após reação com ALC, nas proporções A – 1:10, B – 1:20 e C – 1:50 (CitC:DSS).....                                                         | <b>39</b> |
| <b>Figura 25:</b> Espécies detectadas pela análise por LC-MS da Ubq intacta – Controle, e dos produtos de reação de ligação cruzada com DSS nas proporções 1:10, 20 e 50 Ubq:DSS..... | <b>40</b> |
| <b>Figura 26:</b> Número de modificações observado para as proporções molares 1:05, 1:10, 1:20 e 1:50, Ubq:DSS.....                                                                   | <b>41</b> |
| <b>Figura 27:</b> Espécies detectadas pela análise por LC-MS da Ubq intacta – Controle, e dos produtos de reação de ligação cruzada na proporção molar 1:10, Ubq:ALC.....             | <b>42</b> |
| <b>Figura 28:</b> Espécies detectadas pela análise por LC-MS do CitC intacto – Controle, e dos produtos de reação de ligação cruzada na proporção molar 1:10, Ubq:ALC.....            | <b>43</b> |
| <b>Figura 29:</b> Espécies detectadas pela análise por LC-MS da Ubq intacta – Controle, e dos produtos de reação de ligação cruzada na proporção molar 1:10, Ubq:ALC.....             | <b>44</b> |
| <b>Figura 30:</b> Mapeamento das distâncias entre os pares de lisinas da Ubq pelos ALC.....                                                                                           | <b>46</b> |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 31:</b> Estrutura da Ubq obtida por DRX (1UBQ.pdb), destacando a proximidade dos resíduos de lisina 6 e 11.....                                                                                                                                                          | <b>47</b> |
| <b>Figura 32:</b> Cromatogramas dos digestos de Citocromo C após reação com os ALC e da amostra controle.....                                                                                                                                                                      | <b>51</b> |
| <b>Figura 33:</b> Espectro de massa dos peptídeos detectados em torno do tempo de retenção 19,5 min para as amostras de CitC controle, DSG, DSS e DSSeb.....                                                                                                                       | <b>52</b> |
| <b>Figura 34:</b> Nomenclatura utilizada na identificação dos fragmentos observados na dissociação de peptídeos em fase gasosa.....                                                                                                                                                | <b>57</b> |
| <b>Figura 35:</b> A – Espectro de MS/MS do peptídeo LIFAGKQLEDGR – TLSDYNIQKESTLHLVLR (m/z 723,8) da Ubq contendo uma modificação do tipo interpeptídeo e, B – Espectro de MS/MS do peptídeo EDLIAYLKKATNE (m/z 823,4) do CitC contendo uma modificação do tipo intrapeptídeo..... | <b>58</b> |
| <b>Figura 36:</b> Mapas de ligação das proteínas Ubq, Mb e CitC, construídos a partir dos peptídeos modificados listados nas Tabelas 6 – 7. As lisinas em vermelho são as com modificações do tipo <i>dead end</i> .....                                                           | <b>59</b> |

# 1. Introdução

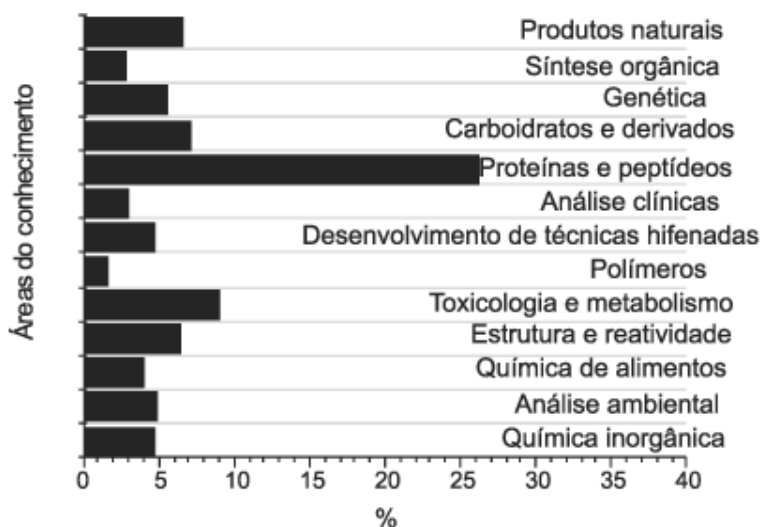
## 1.1. Espectrometria de Massas

Ao longo do seu desenvolvimento, a espectrometria de massas (MS) vivenciou uma acentuada difusão em diversas áreas da ciência em vista das vantagens intrínsecas da técnica, tais como: alta sensibilidade, rapidez, versatilidade, facilidade de operação e alta confiabilidade dos resultados. [1]

O interesse em se utilizar a MS para análise de proteínas e outras macromoléculas remonta a década de 60. Contudo, o uso da técnica para análise de proteínas só alcançou sucesso a partir da década de 80, com a utilização de FAB (*Fast Atom Bombardment*) como fonte de íons. No entanto, a aplicação restringia-se à análise de pequenos peptídeos derivatizados e que muitas vezes necessitavam de experimentos de Degradação de Edman para a confirmação dos resultados [1,2].

A partir do fim da década de 80, a análise de peptídeos e proteínas por MS deu um grande salto devido ao desenvolvimento das técnicas de ionização ESI [3] e MALDI [4], que possibilitaram a ionização e volatilização dessas macromoléculas com alta eficiência e sem a necessidade de derivatização [5]. Com isso, houve nesse período o desenvolvimento de novos instrumentos comerciais altamente apropriados a análise proteômica, dos tipos *ion trap*, quadrupolo-tempo de voo (Q-Tof), tempo de voo-tempo de voo (Tof-Tof), *ion trap* linear-Orbitrap (LIT-Orbitrap) e *ion trap* linear-ressonância ciclotrônica de íons (LIT-ICR) [6].

Desde então, a utilização da MS para análise de proteínas e peptídeos tem se destacado como uma das principais aplicações da técnica, como pode ser observado na Figura 1 [7]. Dentre as aplicações mais comuns nesta área destacam-se a identificação de proteínas, a determinação da massa dessas macromoléculas, o seqüenciamento de peptídeos, a identificação e localização de modificações pós-traducionais e a quantificação relativa e absoluta de proteínas [8-14].



**Figura 1:** Principais áreas de aplicação da Espectrometria de Massas. Dados obtidos da base de dados ISI Web of Knowledge no período de 1993 a 2004, considerando as 500 principais publicações do ano. [7]

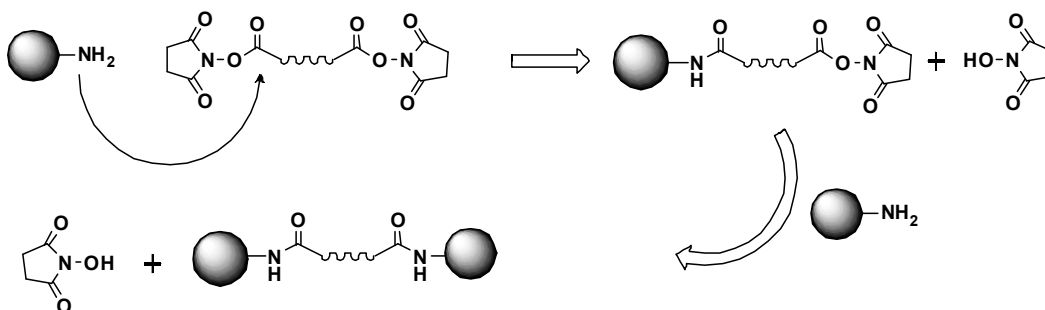
Hoje a MS é a principal ferramenta analítica para obtenção de dados relacionados à estrutura primária de proteínas. Devido às suas características atrativas, há recentemente um grande interesse em expandir suas aplicabilidades para o estudo de estruturas superiores de proteínas (terciárias e quaternárias), área denominada de proteômica estrutural. Nesse contexto, os principais métodos baseados em MS disponíveis para o estudo de estruturas superiores de proteínas são: troca H/D [15-16], *footprinting* [17], ligação cruzada [18] e mobilidade iônica [19].

## 1.2. Ligação Cruzada combinada à Espectrometria de Massas para obtenção de dados estruturais de proteínas e complexos protéicos

Em 2000, Young [19] e colaboradores propuseram o uso da técnica de Ligação Cruzada combinada à Espectrometria de Massas na aquisição de dados estruturais de proteínas e complexos protéicos. Estas informações seriam provenientes do tamanho da cadeia espaçadora do reagente utilizado para a formação da ligação cruzada.

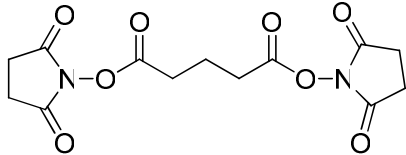
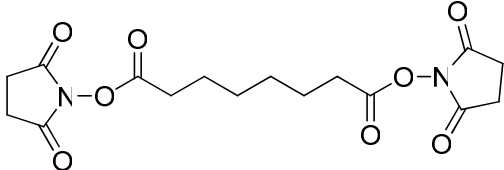
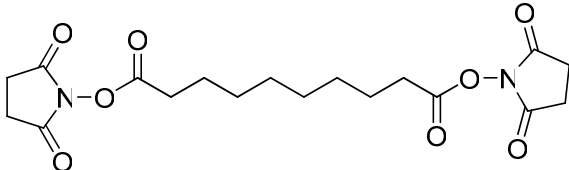
A ligação cruzada é uma modificação química onde as cadeias laterais de dois aminoácidos na superfície da proteína que estejam espacialmente próximas são ligadas covalentemente através de um agente de ligação cruzada (ALC). Os ALC são compostos orgânicos multifuncionais, contendo pelo menos dois grupos reativos derivados de agentes de modificação química clássicos, unidos por uma cadeia conhecida como cadeia espaçadora (CE) [20].

Estes compostos, na presença de proteínas, reagem com as cadeias laterais dos aminoácidos de acordo com suas especificidades. Os ALC mais utilizados consistem em compostos contendo dois grupos N-hidróxisuccinimida (NHS) nas extremidades da cadeia. Estes ALC reagem com os grupos amina de proteínas por meio de uma substituição nucleofílica, levando a formação de uma ligação amida (Figura 2). Portanto, utilizou-se neste trabalho essa classe de ALC.



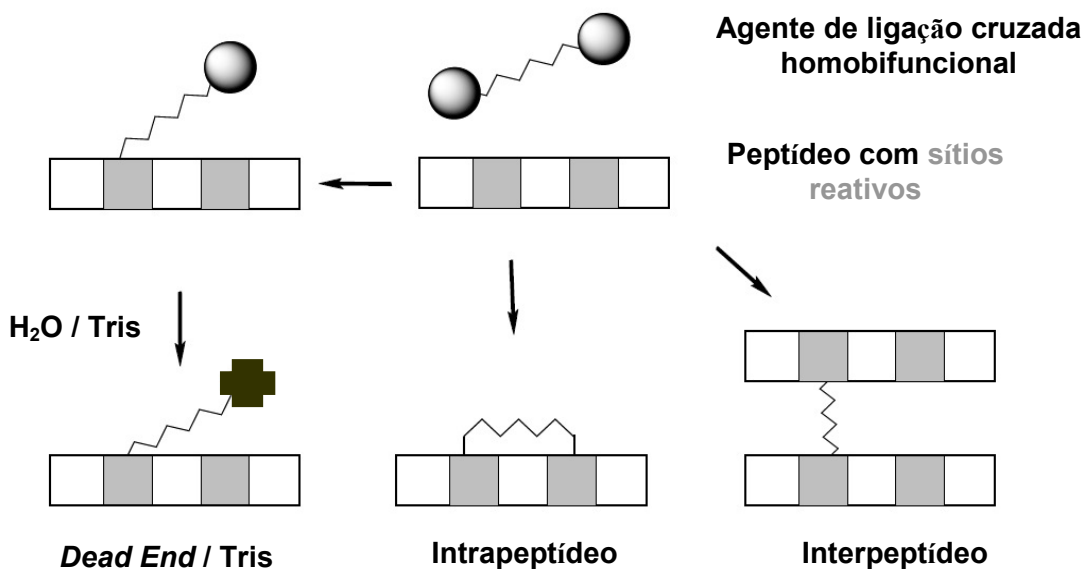
**Figura 2:** Esquema da reação entre o ALC reativo a grupos amina (~~~~~ = cadeia espaçadora).

Outra particularidade dos ALC utilizados nesse trabalho é que estes são homólogos, ou seja, apresentam mesma reatividade, porém, comprimentos das cadeias espaçadoras (CE) distintos (Figura 3), o que permite sondar diferentes distâncias inter-resíduos de aminoácidos, possibilitando a comparação dos resultados obtidos, refinando as informações estruturais obtidas.

|                                                                                    |                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|   | Bisuccinimidil Glutarato<br><b>DSG</b><br><b>5 carbonos na CE</b>   |
|   | Bisuccinimidil Suberato<br><b>DSS</b><br><b>8 carbonos na CE</b>    |
|  | Bisuccinimidil Sebacato<br><b>DSSeb</b><br><b>10 carbonos na CE</b> |

**Figura 3:** Os ALC baseados em ésteres da NHS empregados nesse estudo.

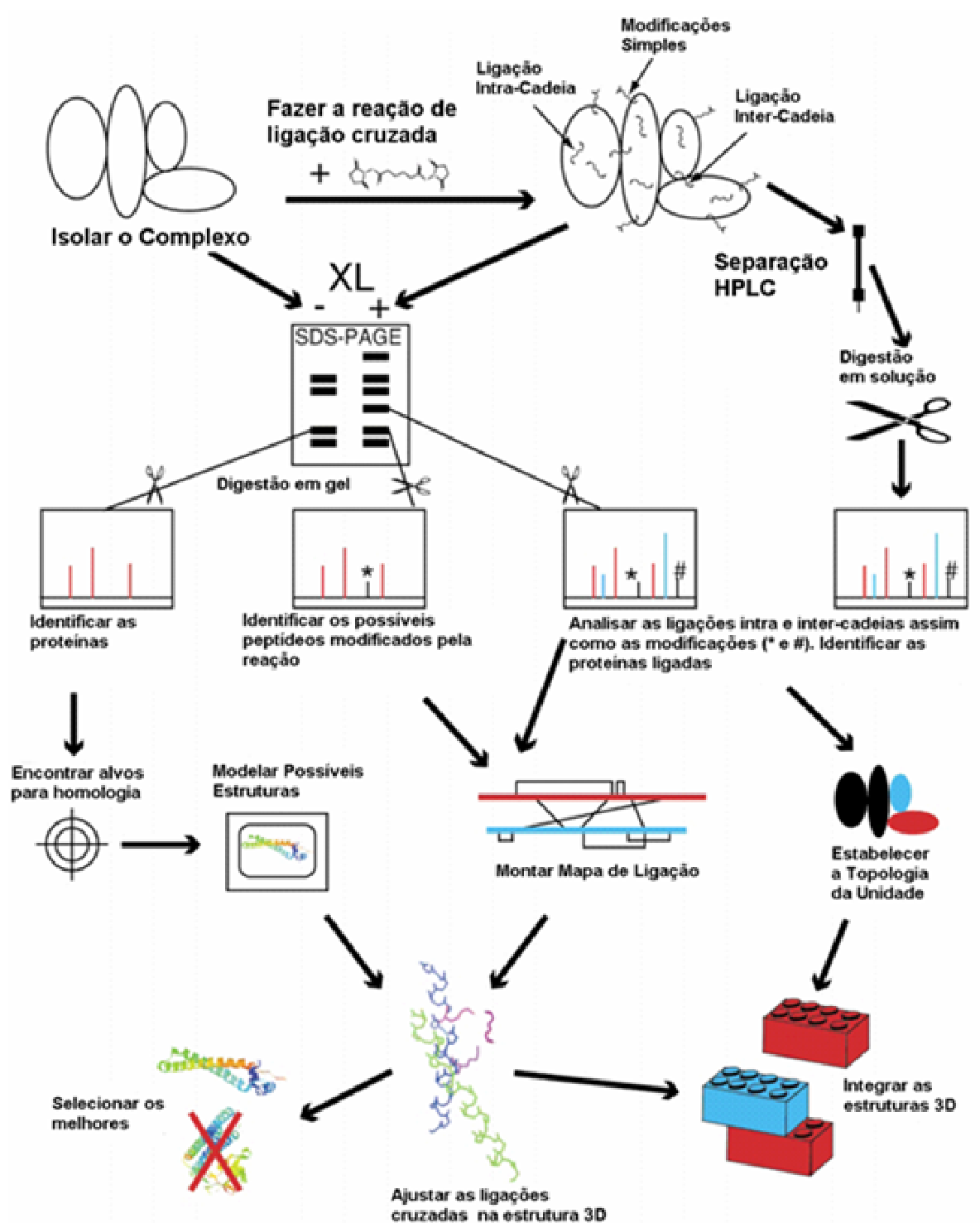
Em vista da alta labilidade do grupo NHS, os ALC estão suscetíveis à hidrólise, que compete com a formação da ligação amida com resíduos de lisina e o grupo amino-terminal. Dessa forma, durante a reação da proteína com os ALC são formados três principais produtos de reação: o interpeptídeo ou *cross-linking*, que ocorre quando o ALC reage com duas lisinas pertencentes a peptídeos distintos; o intrapeptídeo ou *loop-link*, que ocorre quando o ALC reage com duas lisinas pertencentes a um mesmo peptídeo, e o *dead end* quando o ALC reage com apenas uma lisina e tem a outra ponta hidrolisada, como mostrado na Figura 4 [21]. Além disso, também é possível a formação de uma quarta modificação, produto da reação entre uma das extremidades do ALC e o reagente Tris-HCl, que é adicionado ao final da reação para consumo do excedente de ALC.



**Figura 4:** Tipos de produtos previstos na reação de ligação cruzada.  
Adaptado da referência 21.

A utilização da MS para análise dos produtos de reação de ligação cruzada permite identificar os peptídeos contendo as modificações descritas anteriormente, o que é feito por meio da estratégia analítica mostrada na Figura 5 [22], que descreve um típico experimento de ligação cruzada combinado à análise dos produtos de reação por espectrometria de massas.

Após o complexo protéico ser submetido à reação com ALC, a análise deste por eletroforese em gel de poliácridamida em condições desnaturantes apresenta novas bandas em regiões de maior massa molar, correspondentes à união de duas ou mais cadeias polipeptídicas. Submetendo o conteúdo dessas bandas a identificação por MS revela-se a identidade das cadeias polipeptídicas unidas, permitindo assim, a construção de um modelo topológico. Outra possível análise consiste na identificação dos sítios específicos de interação, o que constitui um nível superior de informação, envolvendo dados de MS/MS. A distância das cadeias espaçadoras define as restrições espaciais entre os pares ligados, o que permite que, por meio de modelagem molecular, sejam obtidas estruturas que satisfaçam a lista de distâncias obtidas experimentalmente [24].



**Figura 5:** Estratégia para detecção de peptídeos ligados pelos ALC por MS e a aquisição da informação estrutural [22].

Por meio desta abordagem, vários sistemas de diferentes níveis de complexidade já foram modelados. Como exemplos, foram determinadas estruturas de proteínas até então não resolvidas por cristalografia de raios-X, como o caso da apolipoproteína A-I humana [23], além de estruturas de homodímeros (protease humana C1r) [24] e heterodímeros (gp43/gp45 da holoenzima DNA-polimerase do bacteriófago T4, Ffh/Fts Y de *Escherichia coli*) [25, 26].



### 1.3. Simulações de Dinâmica Molecular

Quando se deseja obter informações relacionadas à dinâmica de um dado sistema com resolução espacial e temporal recorre-se à técnica de dinâmica molecular, já a técnica pode fornecer tais informações, permitindo ainda correlacionar estrutura e dinâmica com alto grau de completeza e precisão, o que não pode ser realizado por nenhuma técnica experimental [27].

As análises de dinâmica molecular são feitas por meio de simulações computacionais dos movimentos moleculares, cujo ponto de partida é a determinação de um modelo para descrição de todas as interações moleculares, sejam elas inter- ou intra-moleculares [27].

Em geral, as simulações envolvendo proteínas são simulações clássicas, isto é, nenhum efeito quântico é considerado, o que significa dizer que, durante as simulações, não ocorre quebra ou formação de ligações, não são consideradas interações entre orbitais e efeitos de ressonância.

Nas simulações clássicas o potencial de interação é aproximado para potenciais harmônicos, que descreve adequadamente todas as ligações covalentes e interações das moléculas comuns, em especial biomoléculas, nas temperaturas e escalas de tempo usualmente encontradas em experimentos reais.

O potencial harmônico que representa as ligações nesta abordagem tem a seguinte forma:

$$V_{cov}(i, j) = K(r - r_{eq})^2,$$

onde  $r$  é a distância entre os dois núcleos,  $K$  e  $r_{eq}$  são a constante de força do oscilador harmônico e a distância de equilíbrio. Já as interações eletrostáticas ( $V_{elec}$ ) e interações dispersivas ( $V_{disp}$ ) têm as seguintes formas:

$$V_{elec}(i, j) = \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad e \quad V_{disp}(i, j) = 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

onde em  $V_{elec}$ ,  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas dos átomos  $i$  e  $j$  e  $r_{ij}$  é a distância entre eles, e em  $V_{disp}$ ,  $\epsilon_{ij}$  e  $\sigma_{ij}$  correspondem aproximadamente a soma dos raios de van der

Waals dos dois átomos envolvidos na interação e ao potencial associado à distância em que estes átomos envolvidos na interação dispersivamente da forma mais efetiva [27].

Para moléculas grandes, os átomos separados por mais de quatro ligações covalentes interagem como se fossem átomos não ligados e, portanto, por meio dos potenciais eletrostático e dispersivo, já descritos aqui. No entanto, nestes casos, outros parâmetros devem ser incluídos para representar as torções angulares (planar) e dos ângulos diedros (fora do plano). Estes potenciais também são tratados de maneira clássica, da seguinte forma:

$$V_{ang}(i, j, k) = K_{\theta}(\theta - \theta_{eq})^2$$

$$V_{die}(i, j, k, l) = K_{\psi}[1 + \cos(n\psi - \delta)].$$

onde  $K_{\theta}$  e  $K_{\psi}$  são as constantes de forças do oscilador harmônico e  $\delta$  e  $\theta_{eq}$  são o ângulo diedro e ângulo de equilíbrio [27].

Um dos maiores desafios na realização de simulações de dinâmica molecular é a parametrização dos campos de força, ou seja, a determinação de todas as constantes de forças e valores de equilíbrio necessários para descrição das interações moleculares de um dado sistema. No que se referem às proteínas, estas possuem campos de força consolidados para a descrição do potencial de interação entre os átomos que as constituem, destacando-se os campos de força CHARMM [28], GROMOS96 [29], AMBER [30], OPLS [31].

Já para os ALC, em especial, os utilizados neste estudo (Figura 3), cuja porção da molécula correspondente ao grupo NHS apresenta estrutura eletrônica bastante distinta, não há na literatura campos de forças que descrevam adequadamente o potencial de interação dos átomos constituintes destas espécies, o que dificultava, até então, o desenvolvimento de estudos de dinâmica molecular dessas espécies. Por conta disso, a maioria dos trabalhos publicados na literatura [32-34] fazia uso dos valores máximos do tamanho da cadeia espaçadora fornecidos pelos fabricantes, o que, definitivamente, não representa o real alcance desses compostos.

Em vista desse panorama, o presente projeto se propôs a investigar os valores de distância alcançados pelos ALC, tanto de forma teórica (através de simulações de dinâmica molecular) quanto experimentalmente, através da análise de dados de experimentos de ligação cruzada acoplados a espectrometria de massas.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a extensão e exatidão das informações estruturais obtidas pela técnica de Ligação Cruzada combinada à Espectrometria de Massas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1 – Realização de experimentos de ligação cruzada empregando os seguintes ALC: DSG, DSS e DSSeb, e as proteínas Ubiquitina (Ubq), Mioglobina (Mb) e Citocromo C (CytC);

2 – Mapeamento do número de potenciais pares de lisinas que podem ser ligados pelos ALC, a partir das estruturas experimentais de RMN das proteínas;

3 – Realização de cálculos *ab initio* para a determinação das cargas atômicas, distâncias e ângulos de equilíbrio das estruturas dos ALC;

4 – Realização de simulações de dinâmica molecular dos ALC para determinação das faixas de alcance e flexibilidade das cadeias espaçadoras tanto solvatados como ligados na superfície das proteínas;

5 – Comparação dos dados experimentais e teóricos das distâncias alcançadas pelos ALC.

### **3. Parte Experimental**

#### **3.1. Experimentos de Ligação Cruzada**

##### **3.1.1. Preparação das amostras para avaliação do número médio de modificações por proteínas em função da concentração de ALC**

As proteínas Ubiquitina (Ubq), Mioglobina (Mb) e Citocromo C (CytC), Sigma, foram solubilizadas em tampão fosfato de sódio ( $50 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  e pH 7,0), na concentração final de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Alíquotas de  $50 \text{ }\mu\text{L}$  de cada proteína foram separadas. Às alíquotas foram adicionados volumes da solução ALC (DSG, DSS e DSSeb) em dimetilformamida,  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ , para uma razão molar de 1:10, 20 e 50 (proteína:ALC), mantendo-se a concentração de DMF menor que 10%. Uma alíquota extra de cada proteína foi utilizada como controle da reação. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 2 horas, e ao final foi adicionado o tampão Tris-HCl ( $1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6) para consumo do excesso de ALC. Essas amostras foram centrifugadas a 10 krpm (rotações por minuto) durante 10 minutos, diluídas a concentração final de  $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  e submetidas à análise por MS.

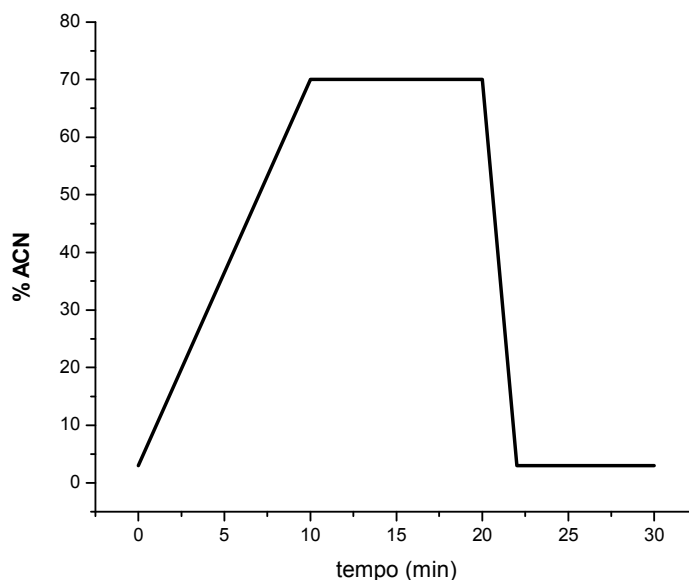
##### **3.1.2. Preparação das amostras para identificação dos peptídeos modificados**

A preparação das amostras foi feita como descrito em 3.1.1., mantendo-se a proporção de 1:10 (proteína:ALC). Ao final da reação, foi feita a digestão enzimática das proteínas utilizando tripsina (Sigma), na razão de 1:50 (m/m) tripsina:proteína, durante 24 h a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após isso, essas amostras foram centrifugadas a 10 krpm durante 10 minutos, diluídas a concentração final de  $10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  e submetidas à análise por MS e MS/MS.

## 3.2. Análise dos produtos de reação por MS

### 3.2.1. Análise das proteínas intactas modificadas

As análises foram feitas por UPLC-ESI-MS no equipamento Waters Synapt HDMS (Waters Corp., Manchester, UK). As proteínas foram dessalinizadas na coluna *trapping*, e então direcionadas à coluna C18 onde foram eluídas aumentando-se a concentração de acetonitrila (ACN), de acordo com perfil cromatográfico mostrado na Figura 6. Os espectros foram adquiridos no modo V+, de  $m/z$  300 – 3000, durante 30 min.



**Figura 6:** Perfil cromatográfico utilizado na eluição das proteínas intactas.

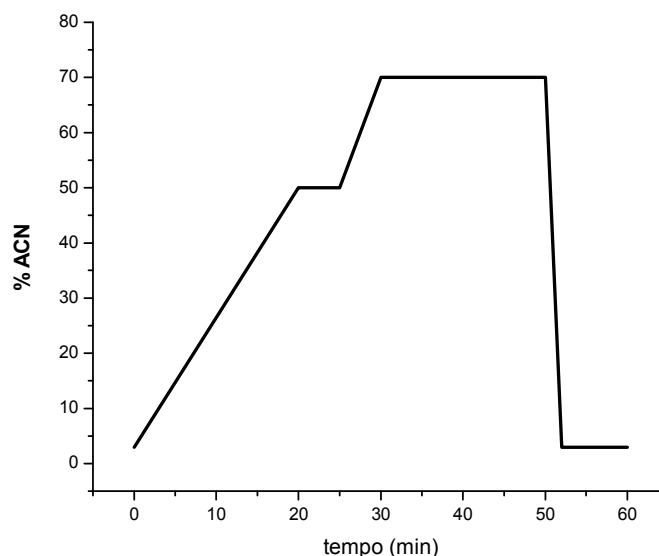
A determinação do número de modificações por proteína foi feita a partir da deconvolução dos espectros das espécies multicarregadas para espectros de massa neutra utilizando o programa MAXent1 [35]. Nos espectros de massa das espécies o número e tipo de modificação foram atribuídos de acordo com as variações em massa, descritos na tabela 1.

**Tabela 1:** Diferenças acrescidas pelas modificações nas massas das proteínas

| ALC   | Modificação     | $\Delta m$ (u) |
|-------|-----------------|----------------|
| DSG   | Intra/Inter     | 96,02          |
|       | <i>Dead End</i> | 114,03         |
|       | Tris            | 217,10         |
| DSS   | Intra/Inter     | 138,07         |
|       | <i>Dead End</i> | 156,08         |
|       | Tris            | 259,14         |
| DSSeb | Intra/Inter     | 166,10         |
|       | <i>Dead End</i> | 184,11         |
|       | Tris            | 287,17         |

### 3.2.2. Análise dos digestos

As análises foram feitas por UPLC-ESI-MS e MS/MS no equipamento Waters Synapt HDMS (Waters Corp., Manchester, UK). Os peptídeos foram dessalinizados por cerca de 5 minutos, e então direcionados para coluna de separação (C18) onde foram eluídos aumentando-se a concentração de ACN, de acordo com o perfil cromatográfico mostrado na Figura 7.



**Figura 7:** Perfil cromatográfico utilizado na eluição dos digestos protéicos.

A aquisição dos espectros de MS e MS/MS foi feita através de uma análise do tipo DDA (análise dependente dos dados), onde a cada segundo o equipamento adquire um espectro de massa. No caso da presença de espécies multicarregadas, as 3 mais intensas são selecionadas e então fragmentadas na câmara de colisão, contendo gás argônio, (energia de colisão definida pela  $m/z$  e carga do precursor).

Os espectros de massa (.raw) foram processados utilizando o programa Proteinlynx (Waters Co.), onde foi feita a deconvolução, deisotopização e correção dos sinais utilizando o ácido fosfórico como referência. Os espectros corrigidos



foram salvos no formato *.pkl*. Esses arquivos foram carregados no programa Mascot (Matrix Science) para a confirmação da identidade das proteínas e determinação das sequências primárias. As buscas foram feitas de acordo com os parâmetros mostrados na Figura 8.

|                            |                                                                                                            |    |                               |                                                                                    |                     |        |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------|
| <b>Your name</b>           | Alana dos Reis Figueiredo                                                                                  |    | <b>Email</b>                  | alanarf@gmail.com                                                                  |                     |        |
| <b>Search title</b>        | Ubiquitina - Controle                                                                                      |    |                               |                                                                                    |                     |        |
| <b>Database</b>            | MSDB                                                                                                       |    |                               |                                                                                    |                     |        |
| <b>Taxonomy</b>            | All entries                                                                                                |    |                               |                                                                                    |                     |        |
| <b>Enzyme</b>              | Trypsin                                                                                                    |    | <b>Allow up to</b>            | 1 missed cleavages                                                                 |                     |        |
| <b>Fixed modifications</b> | Acetyl (K)<br>Acetyl (N-term)<br>Acetyl (Protein N-term)<br>Amidated (C-term)<br>Amidated (Protein C-term) |    | <b>Variable modifications</b> | Oxidation (F)<br>Oxidation (HW)<br>Oxidation (K)<br>Oxidation (M)<br>Oxidation (N) |                     |        |
| <b>Quantitation</b>        | None                                                                                                       |    |                               |                                                                                    |                     |        |
| <b>Peptide tol. ±</b>      | 0.1                                                                                                        | Da | # <sup>13</sup> C             | 0                                                                                  | <b>MS/MS tol. ±</b> | 0.1 Da |
| <b>Peptide charge</b>      | 2+ and 3+                                                                                                  |    | <b>Monoisotopic</b>           | <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>                     |                     |        |
| <b>Data file</b>           | C:\PKL\180309 Ubq Controle.pk Browse...                                                                    |    |                               |                                                                                    |                     |        |
| <b>Data format</b>         | Micromass (.PKL)                                                                                           |    | <b>Precursor</b>              | m/z                                                                                |                     |        |
| <b>Instrument</b>          | ESI-QUAD-TOF                                                                                               |    | <b>Error tolerant</b>         | <input type="checkbox"/>                                                           |                     |        |
| <b>Decoy</b>               | <input type="checkbox"/>                                                                                   |    | <b>Report top</b>             | AUTO hits                                                                          |                     |        |
| <b>Start Search ...</b>    |                                                                                                            |    | <b>Reset Form</b>             |                                                                                    |                     |        |

**Figura 8:** Parâmetros empregados na identificação das proteínas.

Usando o programa MassExtract, desenvolvido em nosso laboratório, a partir dos arquivos .pkl foram obtidos os valores  $MH^+$ , correspondentes às espécies monocarregadas. Esses valores foram convertidos em valores de massa neutra ( $M_r$ ) e salvos no formato .txt, e então carregados no programa xBobcat [34], juntamente com a sequência primária da proteína, onde foram feitas as identificações dos sítios de modificação.

### 3.3. Cálculos *ab initio*

Os cálculos das estruturas eletrônicas dos três agentes de ligação cruzada foram realizados usando o programa Gaussian 03 [35]. A função de base usada para a descrição dos orbitais atômicos foi a 6-31g(d,p) empregando o método Hartree-Fock (HF) [36].

As estruturas dos ALC foram construídas com auxílio do programa Molden [37] e foram pré-otimizadas usando métodos semi-empíricos AM1 e PM3 [38–40]. As estruturas otimizadas obtidas pelos métodos semi-empíricos foram então otimizadas usando o nível HF/6-31g(d,p).

A partir das estruturas otimizadas foram determinadas as distâncias e os ângulos de equilíbrio, bem como a carga atômica, que foi computada usando o esquema de Merz-Singh-Kollman (MK) [41].

### 3.4. Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular são executadas partindo-se dos seguintes arquivos:

- PDB, o qual descreve as coordenadas dos átomos constituintes do sistema, obtidos a partir de banco de proteínas como *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (RCSB).
- Arquivo Topologia, no qual estão definidos os nomes e tipos dos átomos do sistema, ligações e as cargas atômicas.
- Arquivo Parâmetro, o qual descreve os comprimentos e ângulos de equilíbrios, constantes de estiramento, de deformação e diedros
- PSF, o qual reorganiza as informações descritas nos arquivos parâmetro e topologia, tornando-as legíveis ao programa que executará a simulação.
- Arquivo Configuração, o qual define todas as condições e parâmetros que serão usadas durante a simulação.

O desenvolvimento e preparação dos arquivos para a realização das simulações de dinâmica molecular dos ALC e da ubiquitina modificada foram desenvolvidos em colaboração com Professor Munir Salomão Skaf do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química – UNICAMP e seu aluno de mestrado, Paulo Cesar Telles de Souza.

O programa NAMD [42] foi utilizado para execução das simulações e o programa VMD [43] para visualização das estruturas e análise dos sistemas simulados. Os arquivos de parâmetro e topologia (Campo de Força) desenvolvidos estão apresentados nos Anexos 7.1 e 7.2.

### 3.4.1. Simulação dos ALC

As dinâmicas moleculares dos ALC foram executadas a 298,15 K e 1 atm, em caixa de água de 42x42x42 Å, empregando condições periódicas de contorno, PME (*Particle Mesh Ewald*) e controle de temperatura e pressão [44]. Em um primeiro momento foi feita a minimização por 500 passos seguido da equilibração por 500.000 passos. O sistema equilibrado foi então simulado durante 1.500.000 passos. O tempo total de simulação foi de 4 ns.

### 3.4.2. Simulação das Ubq modificadas

O arquivo PDB da ubiquitina (Ubq), 1UBQ.pdb, caracterizada por DRX com resolução de 1,8 Å, foi obtido a partir do banco de proteínas NCBI. A partir dessa estrutura foram criadas três novas Ubq, modificadas nas lisinas 33, 11 e 29, pela substituição dos resíduos de lisina por resíduos de lisinas ligadas aos ALC. As dinâmicas moleculares das Ubq mutantes foram executadas a 298,15 K e 1 atm, em caixa de água de 70x70x70 Å, empregando condições periódicas de contorno, PME e controle de temperatura e pressão [44]. As simulações foram divididas em 4 etapas. Na primeira etapa, foram feitos 700 passos de minimização do solvente e do resíduo modificado, o restante do sistema foi mantido fixo. Na segunda etapa, foram feitos 500 passos de minimização do solvente e das cadeias laterais dos resíduos, mantendo-se a cadeia principal da proteína (*backbone*) fixa. Na terceira etapa, foram feitos 300 passos de minimização de todo o sistema, seguidos de 1.000.000 passos de equilibração e termalização do sistema. Por fim, o sistema foi simulado durante 1.500.000 passos. O tempo total de simulação foi de 4,5 ns.

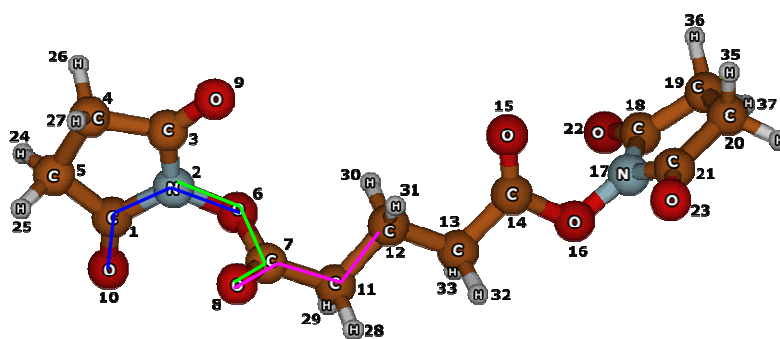
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Cálculo das Cargas Atômicas e determinação da constante da barreira rotacional do grupo NHS

As cargas atômicas dos ALC foram calculadas por três diferentes métodos, a partir das estruturas otimizadas livremente, otimizadas com diedros fixos e otimizadas por blocos.

Durante a otimização da estrutura livre, as moléculas assumiram conformações que apresentavam várias interações intramoleculares, o que resultou em um conjunto de cargas não representativas das cargas atômicas reais, mas sim da carga amenizada resultante dessas interações. Essas cargas amenizadas não refletem as cargas individuais de cada átomo e por isso partiu-se para outra abordagem para a obtenção das cargas atômicas.

Na segunda abordagem, realizou-se a otimização das moléculas dos ALC fixando-se os diedros das cadeias espaçadoras dos ALC (Figura 9), de maneira a restringir a torção das cadeias que resultaria no estabelecimento das interações intramoleculares, permitindo apenas a otimização das distâncias e ângulos interatômicos.



**Figura 9:** As linhas coloridas destacam os diedros que foram mantidos fixos (em ambos as extremidades dos ALC) durante a otimização da estrutura para posterior cálculo das cargas atômicas.

Outra abordagem realizada consistiu em separar as moléculas dos ALC em duas porções distintas, consistindo na cadeia espaçadora, contendo apenas átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio, e no grupo NHS nas extremidades da cadeia, representada pela molécula de acetato de NHS. Estas porções foram independentemente otimizadas, garantindo-se a ausência de interações intramoleculares. As cargas atômicas correspondentes ao grupo NHS foram obtidas a partir do acetato de NHS enquanto que as cargas correspondentes aos átomos de carbono e hidrogênio no centro da cadeia foram obtidas da literatura [26] para hidrocarbonetos simples.

As cargas atômicas calculadas sobre as estruturas otimizadas pelos três métodos estão mostradas nas Tabelas 2, 3 e 4. Como pode ser observado, as cargas calculadas pela otimização livre apresentam uma alta assimetria entre átomos equivalentes do ALC, causadas pelas interações intramoleculares, além de apresentarem valores absolutos menores do que os calculados pelos dois outros métodos. Na otimização livre, a molécula do ALC assume uma conformação de forma a aproximar sítios de cargas opostas, minimizando a energia do sistema, o que gera a assimetria de cargas entre os átomos equivalentes e diminui a carga atômica calculada para os átomos individuais. Além disso, esse método de otimização resultou em uma maior discrepância das cargas atômicas de átomos equivalentes entre os 3 ALC estudados.

Para o método de otimização com diedros fixos, ainda foram observadas assimetrias causadas por pequenas interações intramoleculares. Já no método de otimização por blocos foi obtida boa uniformidade das cargas atômicas entre átomos equivalentes em um mesmo e em diferentes ALC, assim como um valor absoluto em geral maior, indicando a ausência de interferências causadas pelas interações intramoleculares. Essas características de simetria e valores absolutos mostraram que esse método resulta em estruturas eletrônicas mais adequadas para o cálculo das cargas atômicas dos ALC. De fato, os valores aqui obtidos possuem uma boa correspondência com os valores relatados na literatura para funções químicas semelhantes [45]. Por todas estas considerações, as cargas atômicas obtidas por esta abordagem foram utilizadas no desenvolvimento dos campos de força dos ALC.

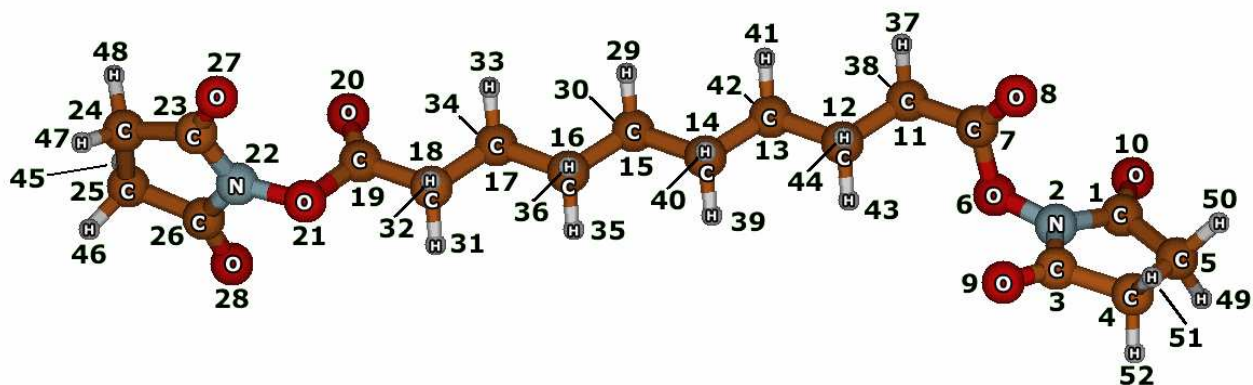
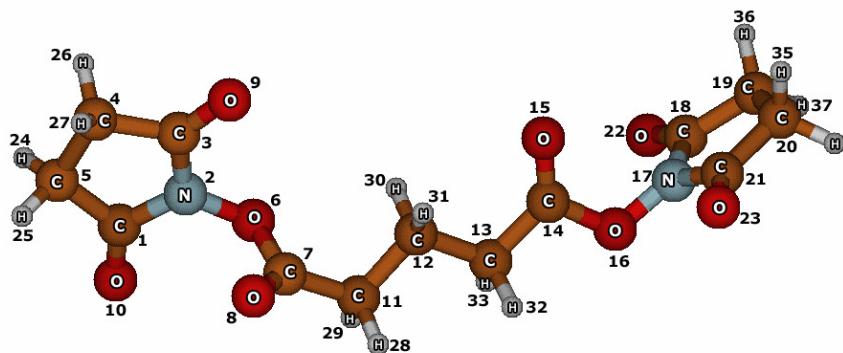


Figura 10: Estrutura do agente de ligação cruzada DSSeb.

Tabela 2: Cargas atômicas do DSSeb.

| DSSeb |                  |                              |                       |       |                  |                              |                       |
|-------|------------------|------------------------------|-----------------------|-------|------------------|------------------------------|-----------------------|
| Átomo | Otimização Livre | Otimização com Diedros Fixos | Otimização por Blocos | Átomo | Otimização Livre | Otimização com Diedros Fixos | Otimização por Blocos |
| C1    | 0.503148         | 0.508838                     | 0.53105550            | O27   | -0.512526        | -0.519284                    | -0.52012100           |
| N2    | 0.112181         | 0.151928                     | 0.07123800            | O28   | -0.518212        | -0.519230                    | -0.52012100           |
| C3    | 0.523435         | 0.508833                     | 0.53105550            | H29   | 0.007240         | 0.137318                     | 0.09000000            |
| C4    | -0.217422        | -0.258348                    | -0.21382450           | H30   | 0.008755         | 0.134849                     | 0.09000000            |
| C5    | -0.216727        | -0.258042                    | -0.21382450           | H31   | 0.127207         | 0.134637                     | 0.17815100            |
| O6    | -0.421803        | -0.500317                    | -0.43501900           | H32   | 0.127489         | 0.131265                     | 0.17815100            |
| C7    | 0.888006         | 1.001328                     | 0.94587700            | H33   | 0.022174         | 0.120422                     | 0.09000000            |
| O8    | -0.563055        | -0.595136                    | -0.57224600           | H34   | 0.023196         | 0.120540                     | 0.09000000            |
| O9    | -0.540360        | -0.518011                    | -0.52012100           | H35   | 0.002625         | 0.131352                     | 0.09000000            |
| O10   | -0.524312        | -0.518036                    | -0.52012100           | H36   | 0.005432         | 0.137244                     | 0.09000000            |
| C11   | -0.483507        | -0.430698                    | -0.41396100           | H37   | 0.130595         | 0.127171                     | 0.17815100            |
| C12   | 0.142462         | 0.033129                     | -0.18000000           | H38   | 0.153755         | 0.012306                     | 0.17815100            |
| C13   | 0.017072         | 0.126945                     | -0.18000000           | H39   | 0.027230         | 0.012360                     | 0.09000000            |
| C14   | -0.101286        | -0.098046                    | -0.18000000           | H40   | 0.023648         | -0.020898                    | 0.09000000            |
| C15   | -0.009139        | -0.081270                    | -0.18000000           | H41   | 0.017624         | -0.020738                    | 0.09000000            |
| C16   | 0.042881         | 0.149057                     | -0.18000000           | H42   | 0.013362         | 0.018811                     | 0.09000000            |
| C17   | 0.015048         | 0.023254                     | -0.18000000           | H43   | 0.009397         | 0.018769                     | 0.09000000            |
| C18   | -0.355593        | -0.431966                    | -0.41396100           | H44   | 0.012015         | 0.023416                     | 0.09000000            |
| C19   | 0.937261         | 1.001328                     | 0.94587700            | H45   | 0.138491         | 0.023255                     | 0.11339725            |
| O20   | -0.587735        | -0.600042                    | -0.57224600           | H46   | 0.135626         | -0.013881                    | 0.11339725            |
| O21   | -0.517611        | -0.501422                    | -0.43501900           | H47   | 0.133271         | -0.014003                    | 0.11339725            |
| N22   | 0.233999         | 0.147972                     | 0.07123800            | H48   | 0.139034         | 0.011626                     | 0.11339725            |
| C23   | 0.461869         | 0.508581                     | 0.53105550            | H49   | 0.115574         | 0.011704                     | 0.11339725            |
| C24   | -0.253982        | -0.242109                    | -0.21382450           | H50   | 0.122267         | 0.134981                     | 0.11339725            |
| C25   | -0.263326        | -0.242512                    | -0.21382450           | H51   | 0.121305         | 0.135223                     | 0.11339725            |
| C26   | 0.476515         | 0.508619                     | 0.53105550            | H52   | 0.115407         | 0.127270                     | 0.11339725            |

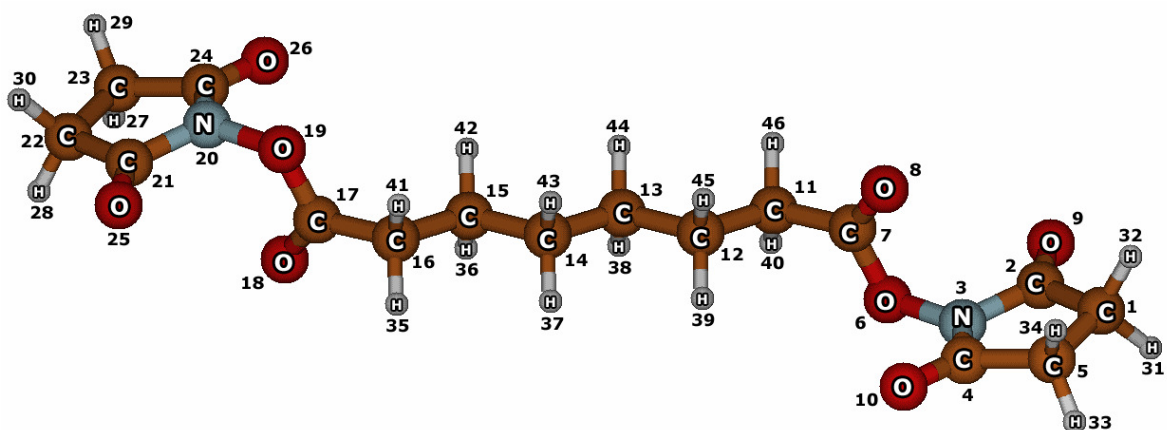


**Figura 11:** Estrutura do agente de ligação cruzada DSG.

**Tabela 3:** Cargas atômicas do DSG.

| DSG   |                  |                              |                       |       |                  |                              |                       |
|-------|------------------|------------------------------|-----------------------|-------|------------------|------------------------------|-----------------------|
| Átomo | Otimização Livre | Otimização com Diedros Fixos | Otimização por Blocos | Átomo | Otimização Livre | Otimização com Diedros Fixos | Otimização por Blocos |
| C1    | 0.494668         | 0.505195                     | 0.53105550            | C20   | -0.254543        | -0.234765                    | -0.21382450           |
| N2    | 0.181340         | 0.135295                     | 0.07123800            | C21   | 0.503615         | 0.469670                     | 0.53105550            |
| C3    | 0.494870         | 0.508014                     | 0.53105550            | O22   | -0.578393        | -0.515786                    | -0.52012100           |
| C4    | -0.236776        | -0.213382                    | -0.21382450           | O23   | -0.572594        | -0.515302                    | -0.52012100           |
| C5    | -0.237311        | -0.239508                    | -0.21382450           | H24   | 0.130966         | 0.122485                     | 0.11339725            |
| O6    | -0.514447        | -0.430148                    | -0.43501900           | H25   | 0.130881         | 0.128823                     | 0.11339725            |
| C7    | 0.942597         | 0.849285                     | 0.94587700            | H26   | 0.119053         | 0.117469                     | 0.11339725            |
| O8    | -0.514368        | -0.553647                    | -0.57224600           | H27   | 0.118984         | 0.122961                     | 0.11339725            |
| O9    | -0.514126        | -0.527825                    | -0.52012100           | H28   | 0.113855         | 0.114583                     | 0.17815100            |
| O10   | -0.508307        | -0.524467                    | -0.52012100           | H29   | 0.113771         | 0.141327                     | 0.17815100            |
| C11   | -0.295527        | -0.393247                    | -0.41396100           | H30   | 0.024327         | 0.021184                     | 0.09000000            |
| C12   | 0.046822         | 0.182439                     | -0.18000000           | H31   | 0.024282         | 0.026946                     | 0.09000000            |
| C13   | -0.289639        | -0.384505                    | -0.41396100           | H32   | 0.114535         | 0.148195                     | 0.17815100            |
| C14   | 0.932028         | 0.903013                     | 0.94587700            | H33   | 0.114598         | 0.145859                     | 0.17815100            |
| O15   | -0.515152        | -0.574982                    | -0.57224600           | H34   | 0.136869         | 0.126052                     | 0.11339725            |
| O16   | -0.515373        | -0.512193                    | -0.43501900           | H35   | 0.125139         | 0.132314                     | 0.11339725            |
| N17   | 0.171546         | 0.228200                     | 0.07123800            | H36   | 0.136591         | 0.135755                     | 0.11339725            |
| C18   | 0.502722         | 0.477095                     | 0.53105550            | H37   | 0.125445         | 0.127883                     | 0.11339725            |
| C19   | -0.252949        | -0.250285                    | -0.21382450           |       |                  |                              |                       |



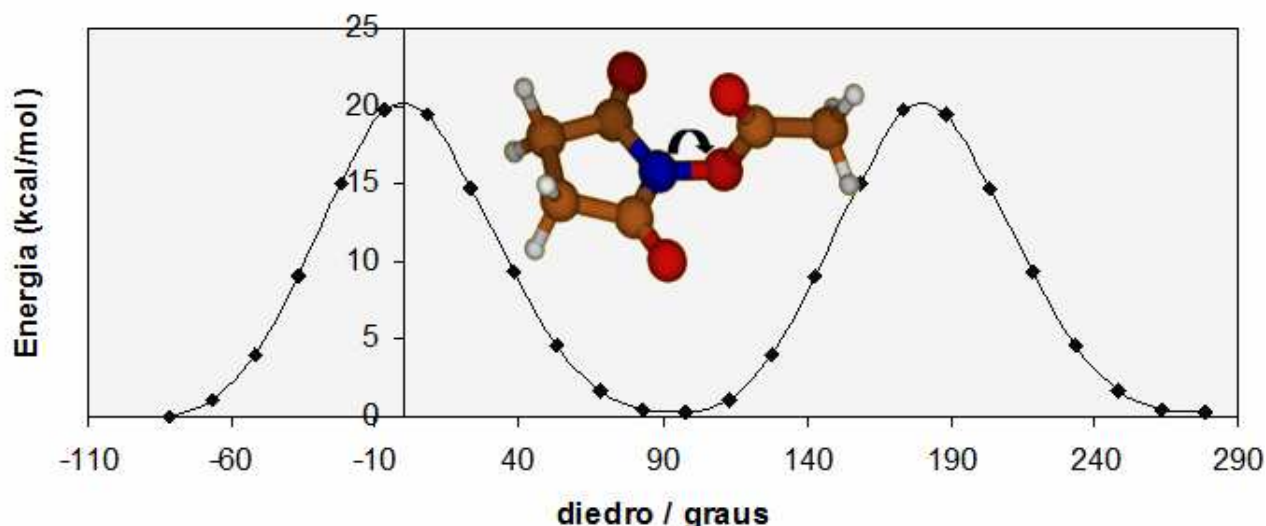


**Figura 12:** Estrutura do agente de ligação cruzada DSS.

**Tabela 4:** Cargas atômicas do DSS.

| DSS   |                  |                              |                       |       |                  |                              |                       |
|-------|------------------|------------------------------|-----------------------|-------|------------------|------------------------------|-----------------------|
| Átomo | Otimização Livre | Otimização com Diedros Fixos | Otimização por Blocos | Átomo | Otimização Livre | Otimização com Diedros Fixos | Otimização por Blocos |
| C1    | -0.126923        | -0.351874                    | -0.21382450           | C24   | 0.601722         | 0.782320                     | 0.53105550            |
| C2    | 0.597028         | 0.782272                     | 0.53105550            | O25   | -0.518147        | -0.546276                    | -0.52012100           |
| N3    | 0.158070         | 0.182584                     | 0.07123800            | O26   | -0.531079        | -0.546276                    | -0.52012100           |
| C4    | 0.597034         | 0.782272                     | 0.53105550            | H27   | 0.125354         | 0.188800                     | 0.11339725            |
| C5    | -0.207694        | -0.351874                    | -0.21382450           | H28   | 0.117141         | 0.188800                     | 0.11339725            |
| O6    | -0.351847        | -0.485405                    | -0.43501900           | H29   | 0.109462         | 0.188800                     | 0.11339725            |
| C7    | 0.934460         | 0.817094                     | 0.94587700            | H30   | 0.099004         | 0.188800                     | 0.11339725            |
| O8    | -0.574887        | -0.538232                    | -0.57224600           | H31   | 0.086424         | 0.188800                     | 0.11339725            |
| O9    | -0.515255        | -0.548484                    | -0.52012100           | H32   | 0.105387         | 0.188800                     | 0.11339725            |
| O10   | -0.528782        | -0.548389                    | -0.52012100           | H33   | 0.104286         | 0.188800                     | 0.11339725            |
| C11   | -0.545924        | -0.328380                    | -0.41396100           | H34   | 0.119537         | 0.188800                     | 0.11339725            |
| C12   | -0.140269        | -0.216210                    | -0.18000000           | H35   | 0.159332         | 0.172319                     | 0.17815100            |
| C13   | -0.078070        | -0.221640                    | -0.18000000           | H36   | 0.001044         | 0.127453                     | 0.09000000            |
| C14   | -0.091156        | -0.217205                    | -0.18000000           | H37   | 0.046237         | 0.127453                     | 0.09000000            |
| C15   | 0.149193         | -0.238572                    | -0.18000000           | H38   | 0.047173         | 0.127453                     | 0.09000000            |
| C16   | -0.549119        | -0.328380                    | -0.41396100           | H39   | 0.023842         | 0.127453                     | 0.09000000            |
| C17   | 0.936944         | 0.790502                     | 0.94587700            | H40   | 0.160771         | 0.172319                     | 0.17815100            |
| O18   | -0.356667        | -0.551456                    | -0.57224600           | H41   | 0.162359         | 0.172319                     | 0.17815100            |
| O19   | -0.149254        | -0.474285                    | -0.43501900           | H42   | 0.025400         | 0.127453                     | 0.09000000            |
| N20   | 0.172500         | 0.182748                     | 0.07123800            | H43   | 0.047589         | 0.127453                     | 0.09000000            |
| C21   | 0.601724         | 0.782320                     | 0.53105550            | H44   | 0.040979         | 0.127453                     | 0.09000000            |
| C22   | -0.169104        | -0.352375                    | -0.21382450           | H45   | 0.005772         | 0.127453                     | 0.09000000            |
| C23   | -0.574354        | -0.352375                    | -0.21382450           | H46   | 0.159441         | 0.172319                     | 0.17815100            |

As constantes da barreira rotacional do grupo NHS foram obtidas varrendo o ângulo diedro correspondente (Figura 13) e computando a energia eletrônica em cada passo. Obteve-se um perfil simétrico, com fase de  $180^\circ$ , como esperado, e com uma barreira de rotação de 20 kcal/mol.



**Figura 13:** Varredura do diedro entre os átomos C-N-O-C do grupo NHS.

A energia térmica de um sistema a temperatura ambiente é da ordem de 0,6 kcal ( $\sim kT$ ) [25], dessa forma, uma barreira rotacional de 20 kcal/mol representa uma energia intransponível a 298,15 K. Portanto, nestas condições, a rotação do grupo NHS em torno da ligação N—O é praticamente nula, e pouco influencia na propriedade que se deseja medir, isto é, as distâncias cobertas pelas cadeias espaçadoras dos ALC em solução.

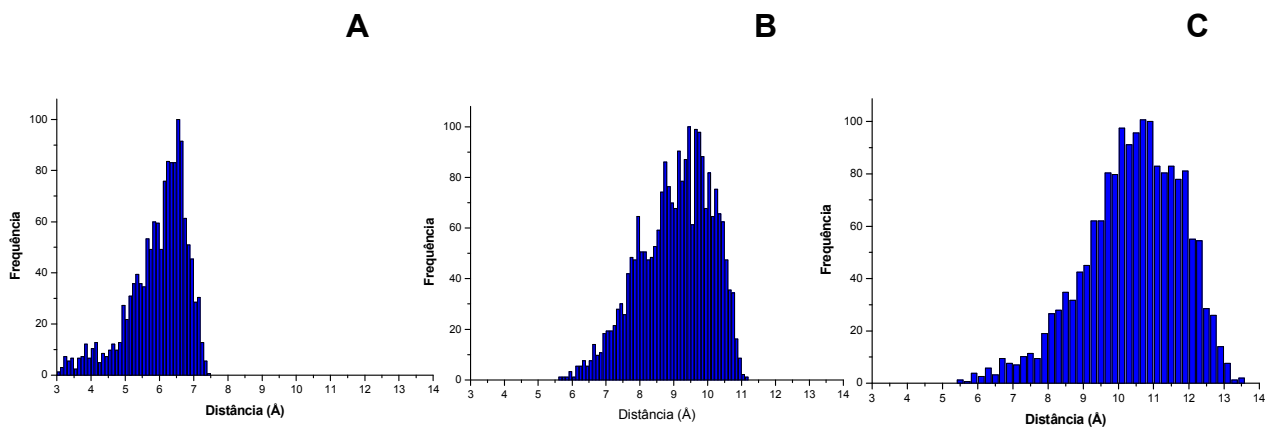
Assim, a partir dos cálculos das cargas atômicas realizados, da otimização das estruturas dos ALC, das quais se obteve as distâncias e os ângulos de equilíbrio, e da determinação da energia da barreira rotacional, foram obtidos os parâmetros fundamentais para os estudos de dinâmica molecular, a partir dos quais foram construídos os arquivos de parâmetro e topologia, mostrados nos Anexos 7.1 e 7.2. Estes arquivos contêm todas as informações estruturais

pertinentes relacionadas às propriedades físicas dos ALC. Uma vez estabelecidos a parametrização dessas moléculas, foram iniciados os estudos de dinâmica molecular.

## 4.2. Simulações de Dinâmica Molecular

### 4.2.1 Determinação das faixas de distância dos ALC solvatados

As simulações dos ALC foram executadas em duas etapas conforme descrito no item 2.4.1. Ao final das simulações, mediu-se as distâncias acessadas pelas cadeias espaçadoras dos ALC em função do tempo, que estão mostrados na Figura 14, na forma de histogramas. Estas distâncias foram medidas entre os oxigênios do grupo éster do NHS, uma vez que estes serão substituídos pelo nitrogênio das lisinas quando se proceder a ligação cruzada.



**Figura 14:** Histogramas das distâncias da cadeia espaçadora dos ALC livre em solução:  
A - DSG, B – DSS e C – DSSeb.

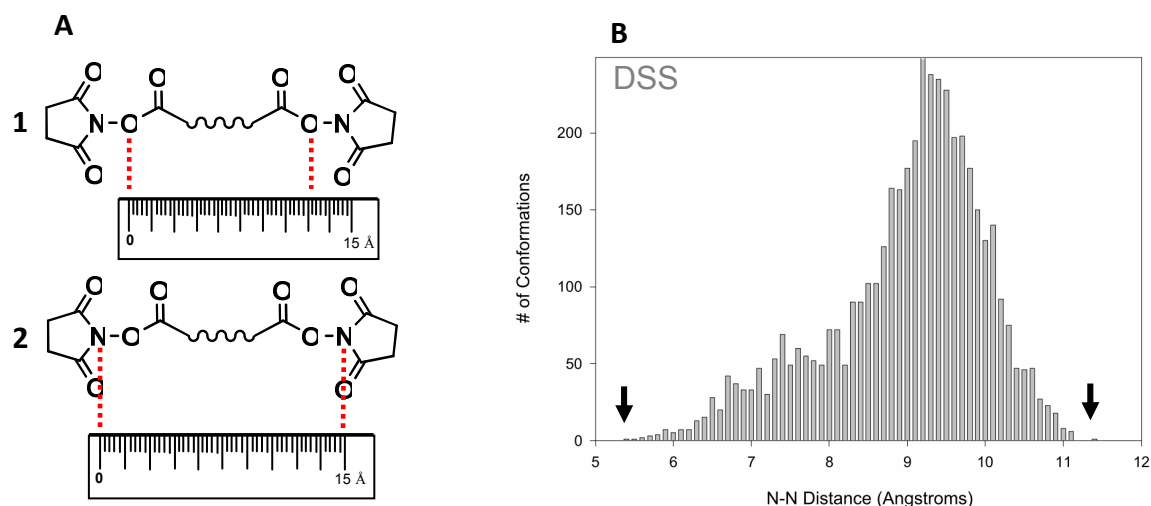
Os limites inferiores e superiores das faixas de distâncias dos ALC foram determinados considerando-se uma frequência relativa mínima em relação à moda (distância de maior contagem) de 10%. A comparação entre as faixas de distâncias obtidas, bem como as demais informações disponíveis na literatura para estes reagentes, está mostrada na Tabela 5.

**Tabela 5:** Faixas de alcance dos ALC considerando uma frequência relativa mínima de 10% .

| ALC   | Método                  | Faixa de Distância (Å) | Moda (Å) |
|-------|-------------------------|------------------------|----------|
| DSG   | Dinâmica                | 4,3 - 7,4              | 6,6      |
|       | Literatura              | 7,7                    | 7,7      |
|       | <i>Green et al</i> [46] | 3,1 - 7,6              | 6,4      |
| DSS   | Dinâmica                | 6,8 - 10,9             | 9,5      |
|       | Literatura              | 11,4                   | 11,4     |
|       | <i>Green et al</i> [46] | 5,6 - 11,4             | 9,2      |
| DSSeb | Dinâmica                | 6,8 - 12,8             | 10,8     |
|       | Literatura              | 13,0                   | 13,0     |

A tabela 5 também mostra as faixas de distâncias obtidas por *Green et al* [46]. Comparando estas faixas com as obtidas nestes estudos, constata-se que as faixas de distância propostas por *Green et al* são significativamente maiores do que as calculadas aqui (cerca de 40%). Esta diferença é atribuída a dois fatores:

- No trabalho de Green, os valores extremos foram obtidos sem nenhuma análise estatística, sendo relatados apenas o maior e menor valores amostrados (Figura 15B). Se não considerarmos uma frequência mínima para os nossos dados, os valores obtidos seriam de 3,3 – 7,4 e 5,9 – 11,0 Å, para o DSG e o DSS, respectivamente.
- As distâncias medidas no trabalho de Green foram obtidas entre os nitrogênios no anel da NHS e não do oxigênio do éster de NHS, levando à obtenção de distâncias não condizentes com o mecanismo de reação dos ALC (Figura 15A).



**Figura 15:** A – Diferença na determinação das faixas de distância para o DSG e DSS, feitas em nosso estudo (1) e por Green et al [46] (2). B – Limites inferior e superior relatados por Green et al [46] não foram estatisticamente analisados.

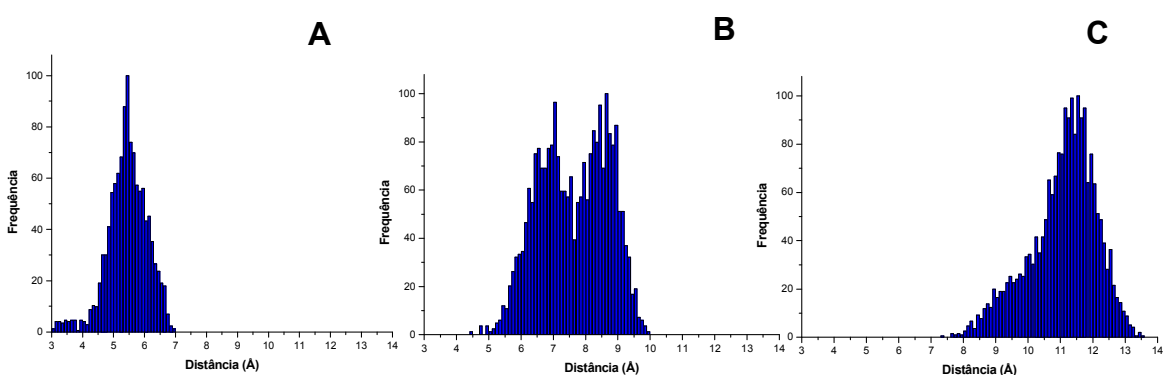
Comparando-se também as faixas de distâncias e modas aqui apresentadas, com os valores relatados pela literatura [47-48] (DSG=7,7 Å, DSS=11,4 Å e DSSeb=13,0 Å), fica claro que valores únicos não descrevem adequadamente o alcance e flexibilidade associados aos ALC. Além disso, tais valores superestimam o alcance dos ALC, pois são medidos considerando a conformação totalmente estendida da cadeia, que é uma das conformações de menor probabilidade de ocorrência. Além disso, há valores mínimos de distância que podem ser alcançados pelos ALC, valores estes não considerados em todos os trabalhos da literatura.

### 4.2.3. Faixas de distância dos ALC parcialmente ligados

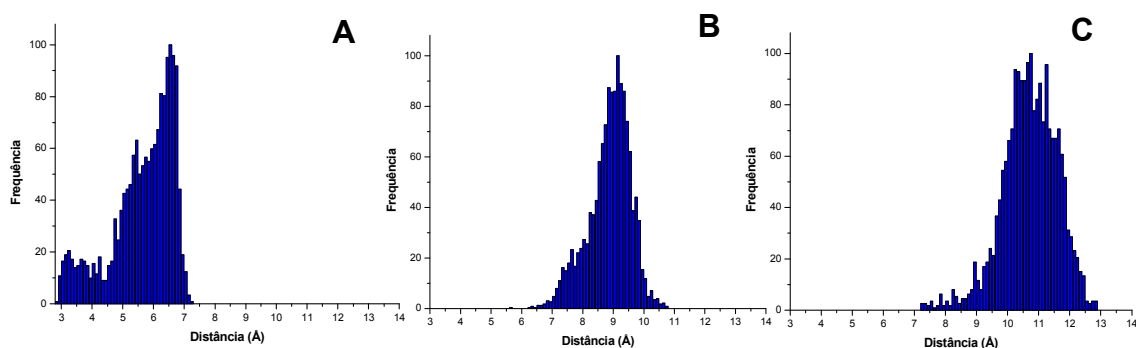
Uma vez que a reação de ligação cruzada ocorre em duas etapas, ligação da primeira lisina seguida da ligação da segunda, é importante avaliar o comportamento do ALC após o primeiro passo, quando o ALC está ligado a somente uma lisina na superfície da proteína. Esta é a condição mais próxima da situação experimental para avaliação da dinâmica do ALC. Neste ambiente, os vários resíduos de aminoácidos nas vizinhanças do ALC irão interagir com sua cadeia alterando a dinâmica do ALC.

Com o objetivo de avaliar o comportamento do ALC parcialmente ligado a uma proteína, foi selecionada a Ubq para o ancoramento desses ALC já que esta proteína é um bom modelo para estudos de dinâmica, por ser pequena e estruturalmente bem caracterizada. Para tanto foram adicionados aos arquivos de parâmetro e topologia resíduos de lisina ligados a DSG, DSS e DSSeb com um éster de NHS na outra ponta da molécula, simulando a primeira etapa da reação de ligação cruzada.

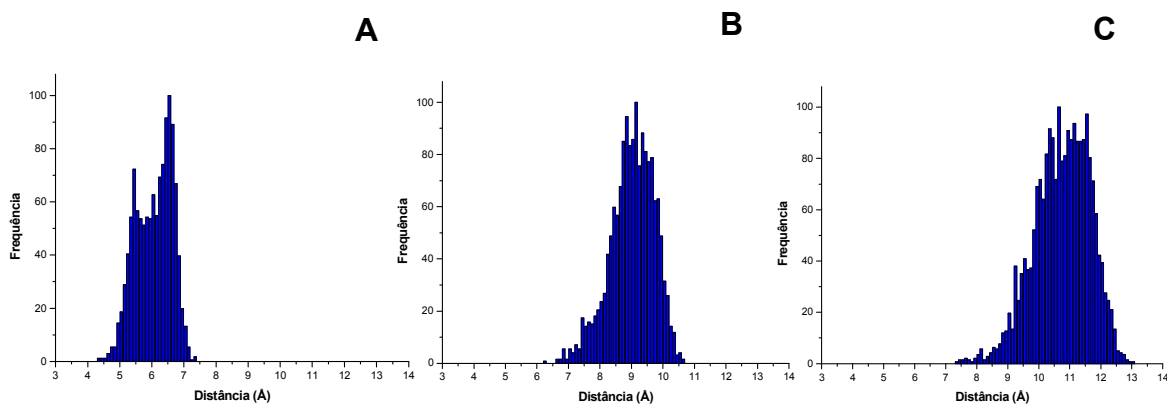
Utilizando o programa VMD foram criadas novas Ubq's contendo a substituição das lisinas 33, 11 e 29 (lisinas passíveis de sofrerem ligação cruzada, veja item 4.3.2.) pelas lisinas modificadas com ALC. Estas Ubq's foram então simuladas como descrito no item 2.4.2. Ao final, foram determinadas as distâncias acessadas pelas cadeias espaçadoras dos ALC (Figuras 16-18).



**Figura 16:** Histogramas dos comprimentos das cadeias espaçadoras: A - DSG, B -DSS e C - DSSeb parcialmente ligados a lisina 33 da Ubq.



**Figura 17:** Histogramas dos comprimentos das cadeias espaçadoras: A - DSG, B -DSS e C - DSSe parcialmente ligados a lisina 11 da Ubq.



**Figura 18:** Histogramas dos comprimentos das cadeias espaçadoras: A - DSG, B -DSS e C - DSSe parcialmente ligados a lisina 29 da Ubq.

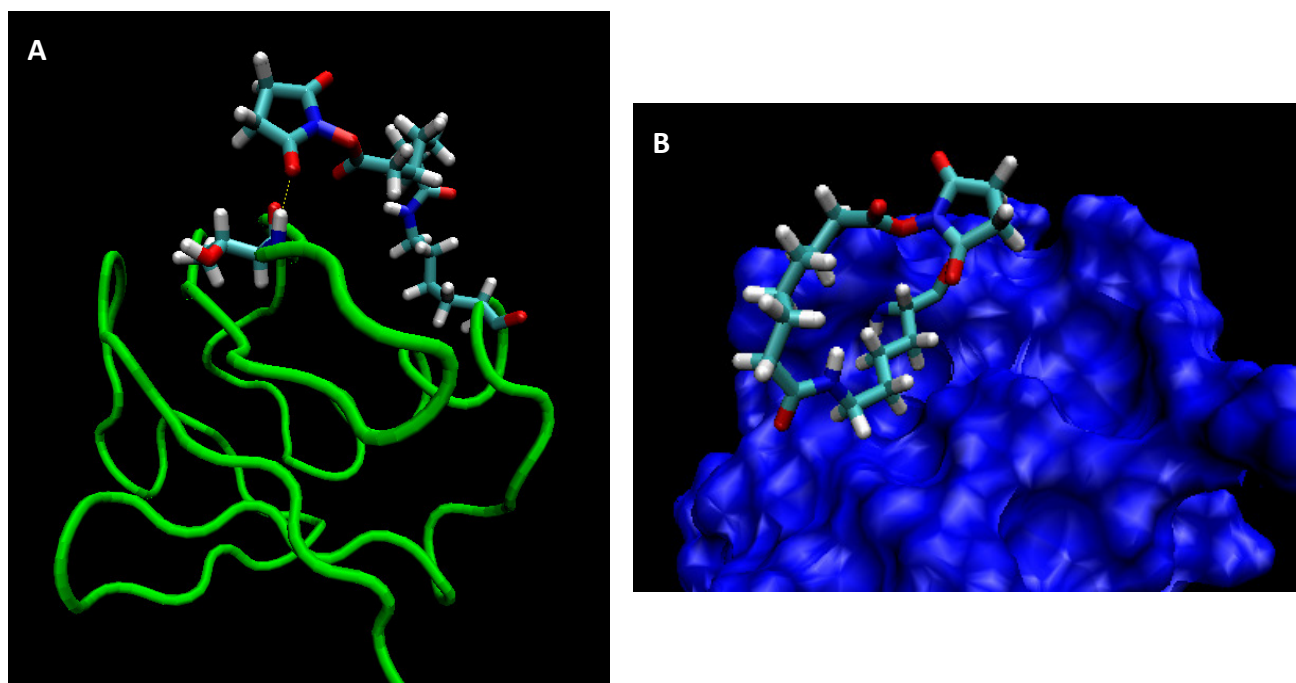
Estes resultados mostram que, quando ligado à superfície da proteína, o comportamento do ALC é alterado pelo ambiente químico ao qual está submetido, devido a interações estabelecidas entre o ALC e resíduos de aminoácidos vizinhos.

Com relação aos perfis dos histogramas, a principal diferença observada foi quanto ao DSS ligado a lisina 33, que apresentou um claro perfil bimodal quando ligado à lisina 33. Uma análise mais cuidadosa da simulação revelou que a formação da gaussiana centrada em 8,6 Å é devido a uma ligação de hidrogênio



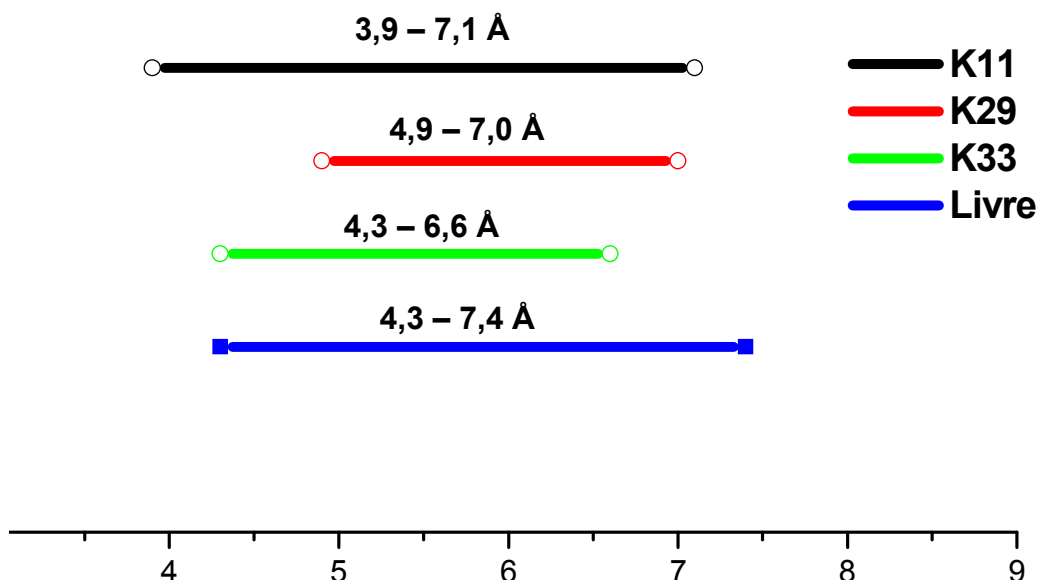
entre a carbonila do NHS e o hidrogênio do grupo amina do resíduo treonina (THR) 12 (Figura 19-A). Esta interação fixa a cadeia do DSS em conformações relacionada à distância da CE em torno de 8,6 Å durante grande parte da simulação. Já a moda relacionada à gaussiana centrada em torno de 7,0 Å está relacionada a uma barreira estérica promovida pelos resíduos vizinhos à lisina 33, que impedem o estiramento total da CE do DSS, fazendo com que esta permaneça dobrada durante grande parte da simulação (Figura 19-B).

Ainda com relação ao perfil dos histogramas, para o DSG ligado a lisina 29, observa-se um perfil bimodal mais acentuado, no entanto, a análise da simulação não permitiu definir interações específicas únicas que fossem responsáveis por este comportamento.

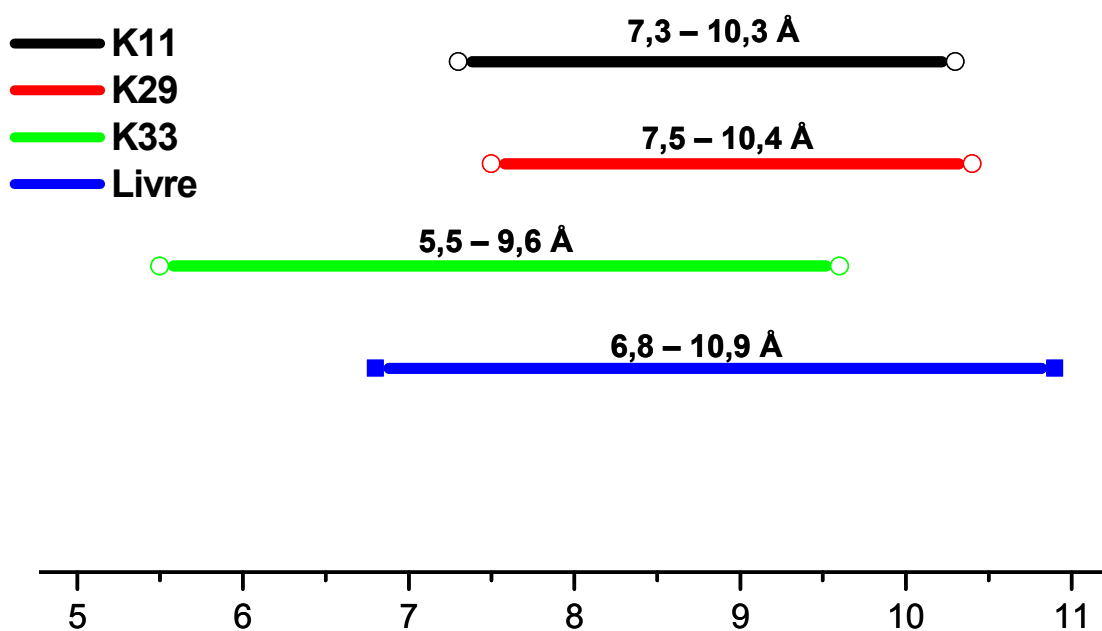


**Figura 19:** **A** – Interação entre o DSS e o resíduo treonina 12 relacionado à gaussiana em torno de 8,6 Å. **B** – Em destaque, a barreira estérica formada pelos resíduos ao redor da lisina 33 a qual o DSS está ligado, que impede um maior estiramento da cadeia espaçadora do ALC.

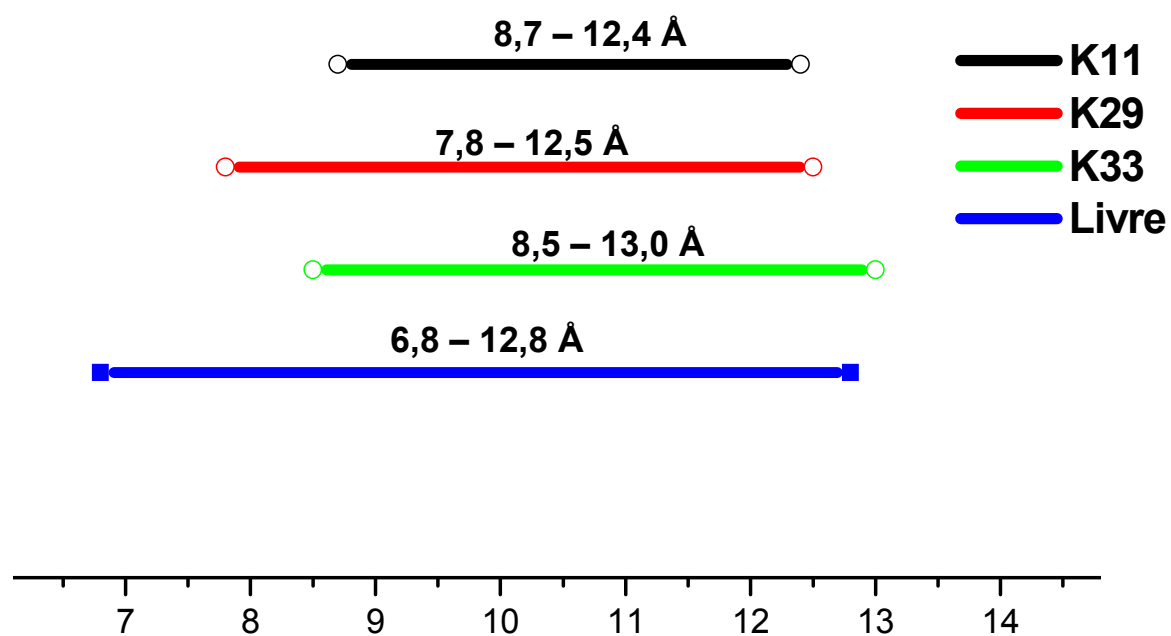
Já com relação às faixas de distâncias dos ALC livres e parcialmente ligados, os resultados obtidos para cada ALC estão mostrados nas Figuras 20-22.



**Figura 20:** Faixas de distâncias (medida em Å) do DSG livre e parcialmente ligado as lisinas 33, 11 e 29 da Ubq.



**Figura 21:** Faixas de distâncias (medida em Å) do DSS livre e parcialmente ligado as lisinas 33, 11 e 29 da Ubq.



**Figura 22:** Faixas de distâncias (medida em Å) do DSSeb livre e parcialmente ligado as lisinas 33, 11 e 29 da Ubq.

De acordo com estes resultados, constata-se que o ambiente químico ao qual o ALC está submetido quando parcialmente ligado a uma lisina altera tanto a dinâmica do ALC quanto as faixas de distância amostradas pelas CE. Para as faixas de distância do DSG, as principais mudanças observadas ocorreram quando o agente foi ligado às lisinas 29 e 33. Em ambos os casos, ocorreu uma diminuição na cobertura das faixas com relação ao ALC livre. Já quando ligado a lisina 11, não foi observada mudança significativa da faixa de distância. Para o DSS, quando ligado as lisinas 11 e 29, o agente apresentou comportamentos semelhantes e faixas de distâncias muito parecidas. Em ambos os casos, a principal diferença com relação ao agente livre ocorreu nos limites inferiores, que foram deslocados para maiores valores, diminuindo a cobertura das faixas nestes casos. Já quando ligado a lisina 33, a faixa de distância do DSS foi deslocada para menores valores, diminuindo a probabilidades de formação de ligações cruzadas entre lisinas cujas distâncias entre si são maiores que 9 Å.

Por fim, para o DSSeb, em todos os casos, quando parcialmente ligado foi observado o deslocamento dos limites inferiores para maiores valores de distância, resultando em um encurtamento das faixas nas três posições.

De maneira geral, verificou-se que as faixas de distâncias amostradas pelas CE dos ALC tornam-se mais restritas quando estes se ligam a uma lisina posicionada na superfície da proteína devido às interações estabelecidas entre os ALC e os resíduos vizinhos.

### **4.3. Experimentos ALC + MS**

#### **4.3.1. Análise das proteínas intactas modificadas: Número de modificações/proteína**

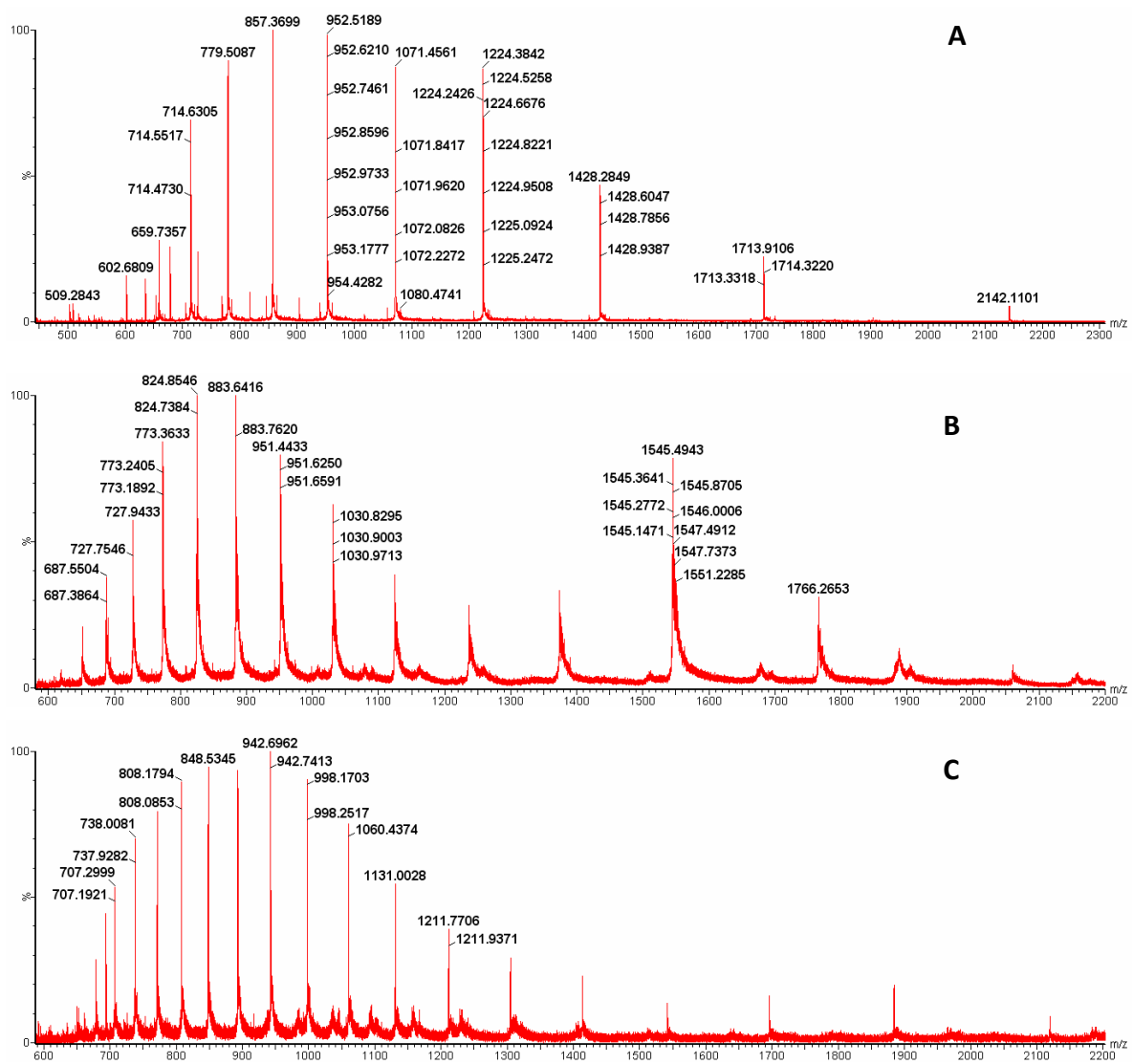
Esta etapa do projeto foi iniciada com estudos para a determinação do número aproximado de modificações nas proteínas, como função da concentração dos ALC empregada nos experimentos de ligação cruzada.

Há a hipótese de que um número excessivo de modificações poderia causar distorções na geometria da estrutura nativa das proteínas, alterando as distâncias entre os resíduos na estrutura nativa. Por outro lado, há vários relatos que mostram que a presença de algumas ligações cruzadas não só mantém a atividade de enzimas como também aumentam sua estabilidade [49].

Há, portanto, a necessidade de se controlar a quantidade de moléculas de ALC ligadas à proteína para evitar artefatos na técnica. Por outro lado, um dos maiores desafios relacionados à metodologia ALC+MS, consiste na detecção dos peptídeos modificados, já que estes estão em concentrações subestequiométricas em relação aos peptídeos não modificados.

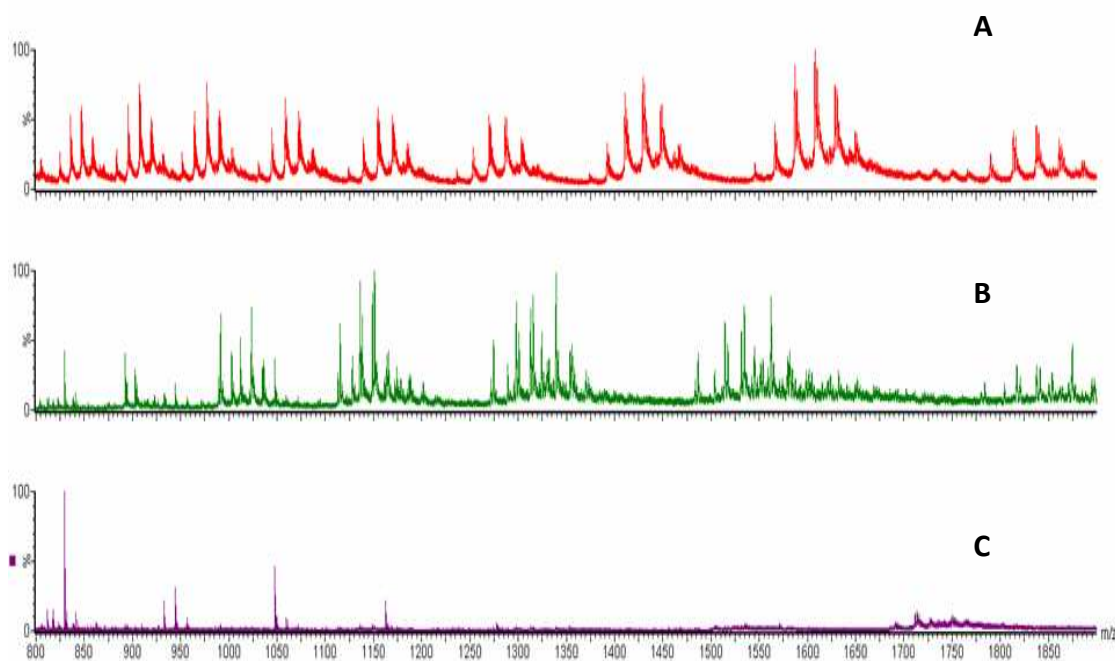
Um levantamento bibliográfico realizado durante o desenvolvimento dos experimentos de ligação cruzada, revelou que, de maneira geral, a proporção molar de 1:10 (proteína:ALC) é comumente utilizada nos experimentos de ligação cruzada e análise dos peptídeos por MS. Em casos nos quais se pretende estudar proteínas muito grandes (>30 kDa) ou complexos protéicos, são usadas proporções da ordem de 1:50-100 (proteína:ALC). Com base nesses dados, foram realizados experimentos de ligação cruzada empregando a Ubq e o ALC, DSS, nas proporções 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50 (Ubq:DSS), com o objetivo de se avaliar a proporção mais adequada para a execução dos demais experimentos de ligação cruzada.

A Figura 23 mostra os espectros de massa das proteínas Ubq, CytC e Mb intactas, seleccionadas para a otimização dos experimentos de ligação cruzada. Estes espectros apresentam um conjunto de sinais característicos de proteínas, em torno da  $m/z$  1000. Cada um destes sinais representa a mesma espécie com diferentes estados de carga, sendo que as espécies com maior número de cargas estão à esquerda da  $m/z$  1000 e as de menor número de carga à direita.



**Figura 23:** Espectros de Massa das proteínas intactas (não modificadas) A – Ubq, B – CytC e C – Mb.

Após a reação com os ALC observa-se uma alteração bastante significativa na intensidade e variedade destes sinais, como pode ser observado na Figura 24, onde estão mostrados os sinais do CytC após reação com DSS, nas proporções A - 1:10, B - 1:20 e C - 1:50 (CytC:DSS).

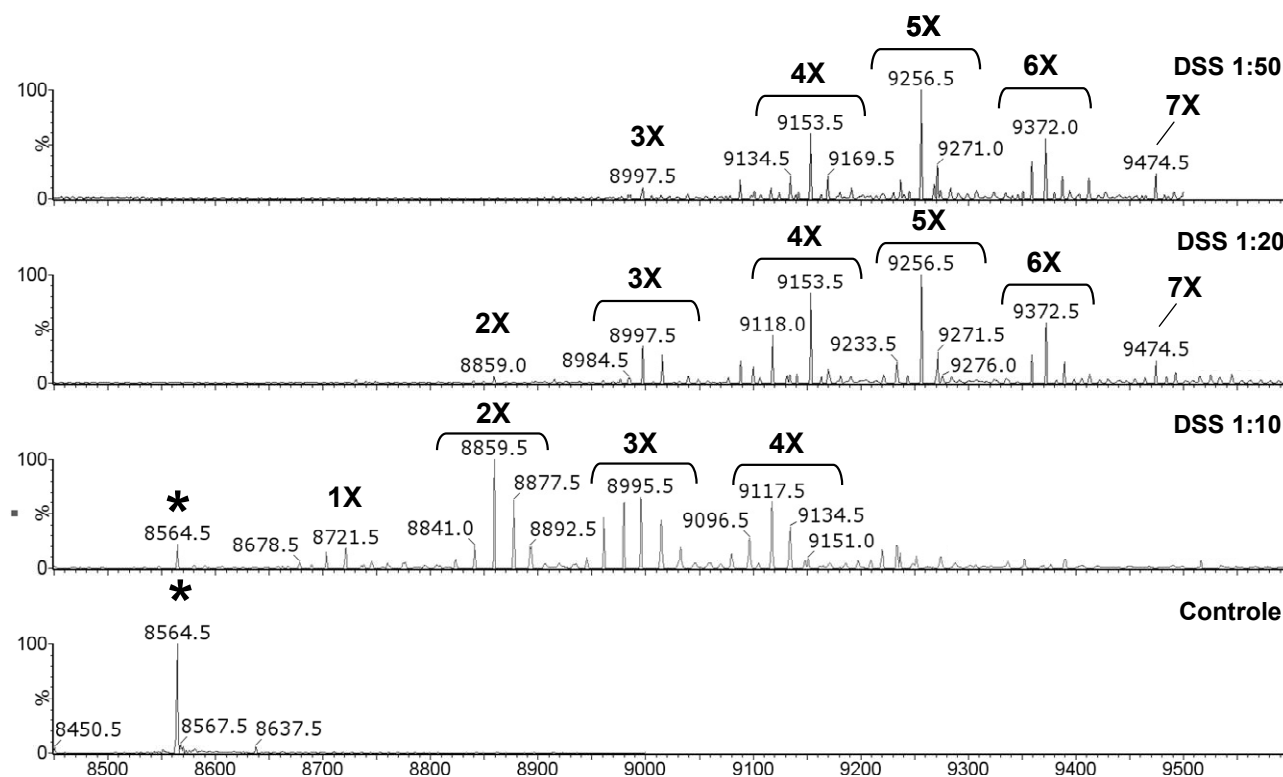


**Figura 24:** Espectros de massa da Ubq após reação com ALC, nas proporções A - 1:10, B - 1:20 e C - 1:50 (CytC:DSS).

De fato, o que se observa é uma queda acentuada na intensidade dos sinais com relação às proteínas intactas. Isto ocorre, pois cada espécie gera um sinal distinto, e, dessa forma, o sinal total da proteína é diluído entre muitas espécies, ocorrendo uma grande diminuição da intensidade absoluta de cada sinal. Essa baixa relação sinal/ruído dificulta a interpretação dos espectros obtidos e suas respectivas deconvoluções, fato que restringe o uso de altas concentrações de ALC para experimentos envolvendo proteína de baixa massa molecular.



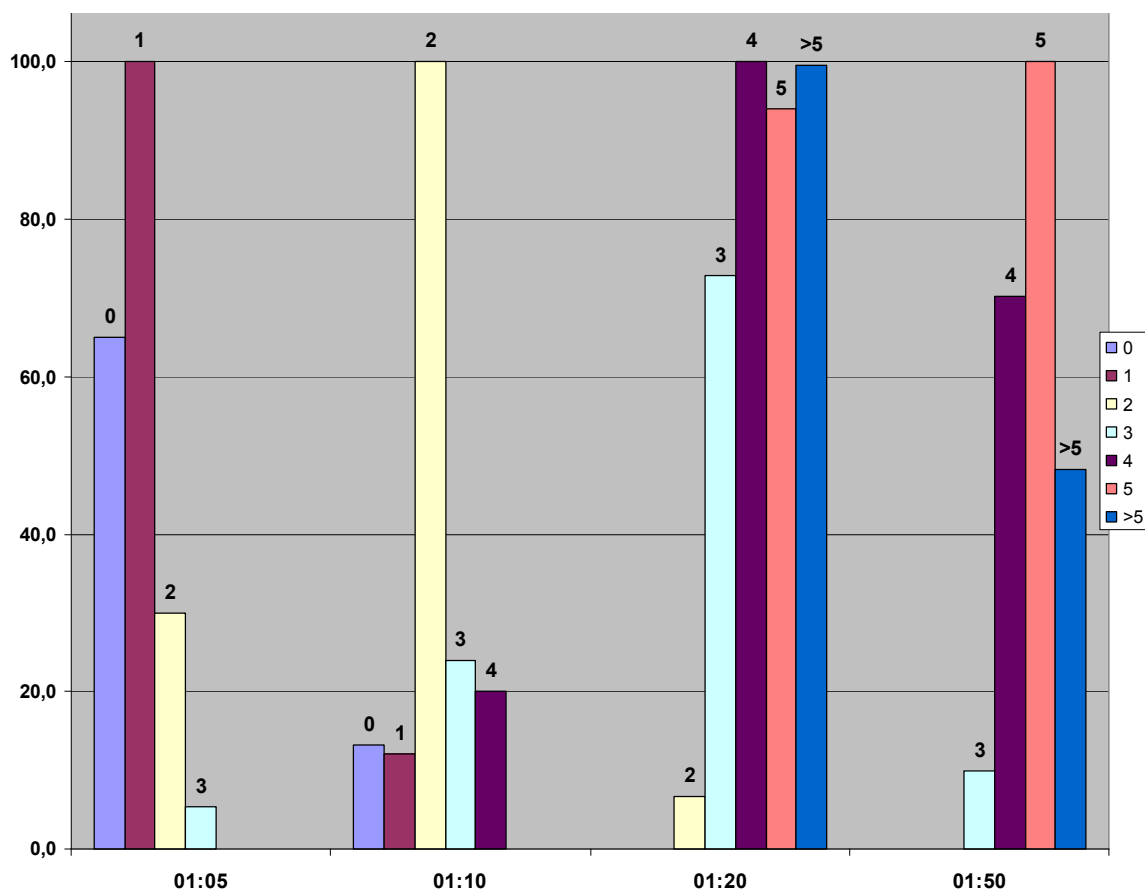
A partir da deconvolução dos espectros de massa da Ubq intacta e modificadas com DSS, utilizando o programa MAXent1, as massas da proteínas contendo diferentes número de modificações foram determinadas (Figura 25). A partir das variações de massa ( $\Delta m$ ) associadas a cada modificação (Tabela 1), foi feita atribuição do número de modificações para cada proporção de DSS testada.



**Figura 25:** Espécies detectadas pela análise por LC-MS da Ubq intacta – Controle, e dos produtos de reação de ligação cruzada com DSS nas proporções 1:10 , 20 e 50 Ubq:DSS.

De acordo com a Figura 25, para as proporções 1:20 e 1:50 não há diferenças significativas no números de modificações. A principal diferença observada está na intensidade absoluta dos sinais, sendo que a proporção 1:50 resultou em sinais menos intensos, em termos absolutos, do que a proporção 1:20.

A Figura 26 apresenta o número de modificações detectadas para cada proporção testada.

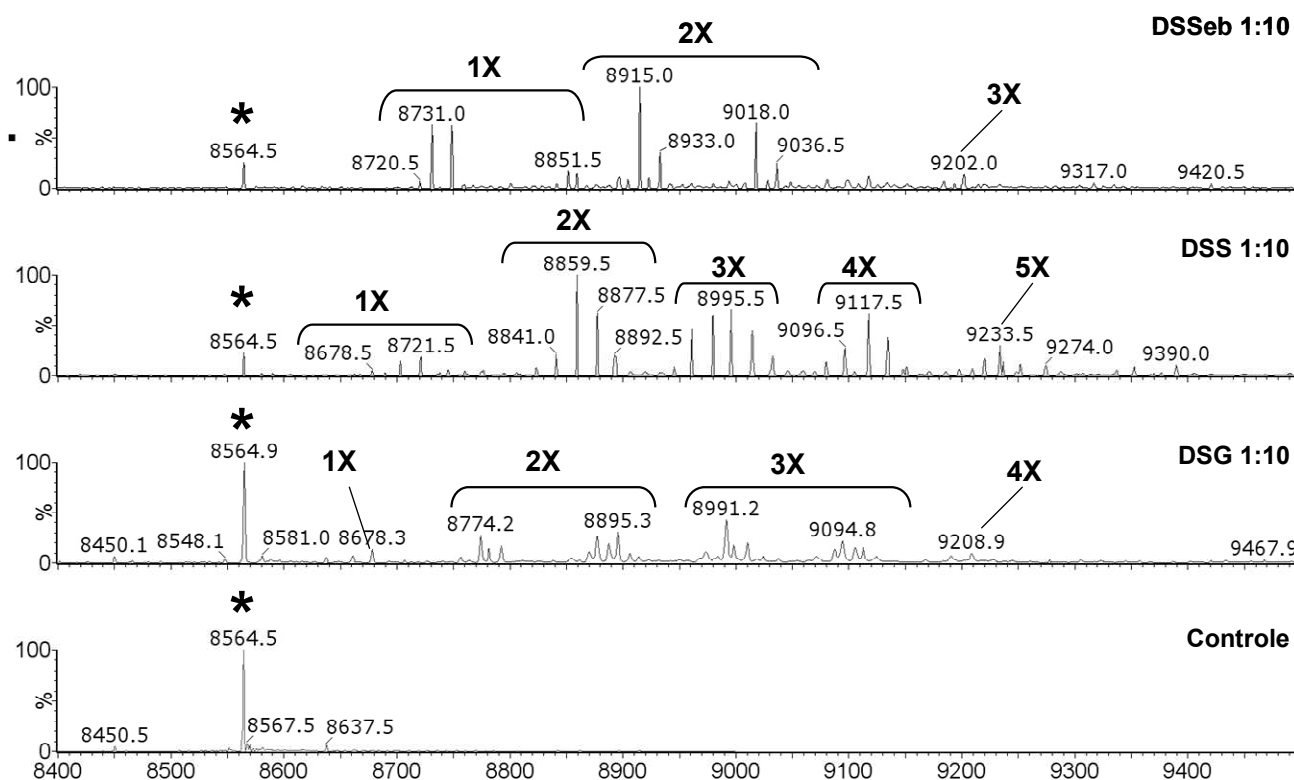


**Figura 26:** Número de modificações observado para as proporções molares 1:05, 1:10, 1:20 e 1:50, Ubq:DSS.

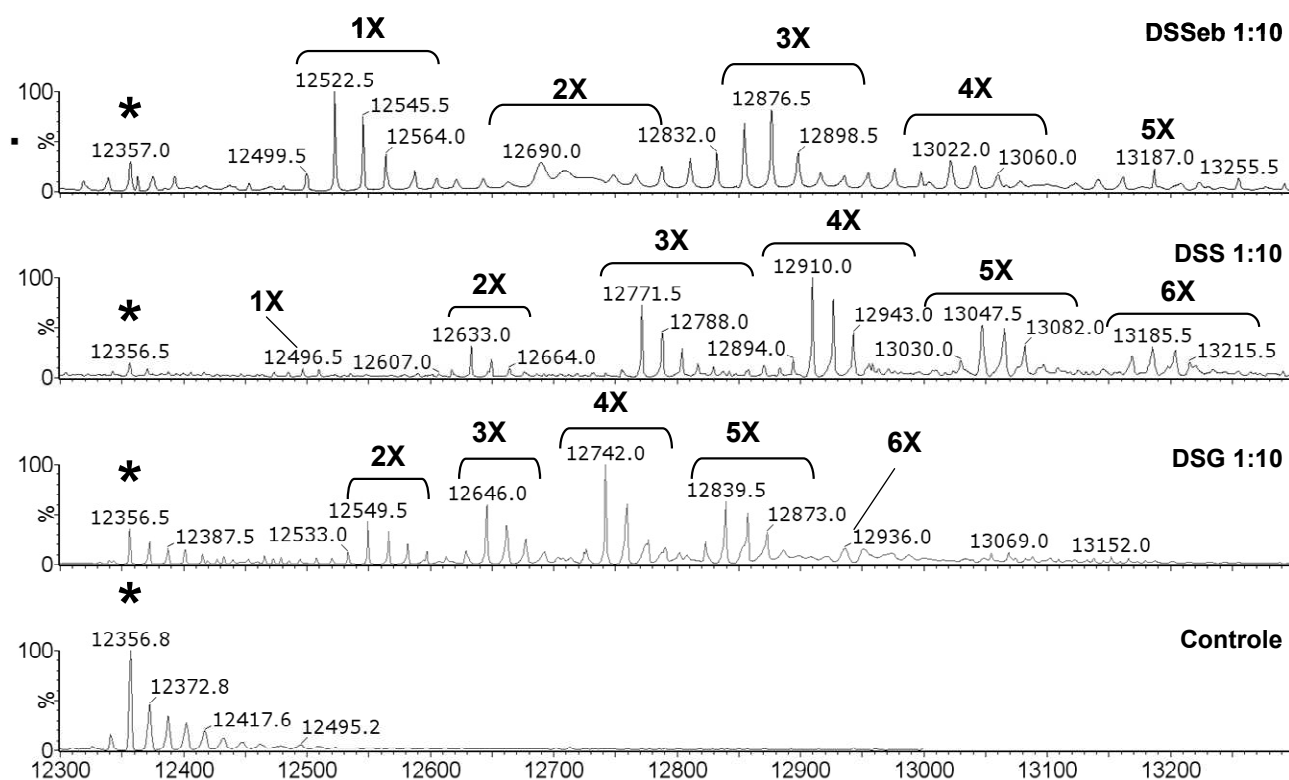
A partir da Figura 26, observa-se que as razões 1:20 e 1:50 levam a formação de cinco modificações por proteínas, em média, enquanto que as proporções 1:5 e 1:10 levam a formação de uma e duas modificações por proteína, em média, respectivamente. Considerando as dificuldades aqui relatadas para análise das espécies reagidas com altas concentrações de ALC e o fato de que poucas modificações dificultam a identificação dos resíduos modificados, optou-se pela proporção 1:10 para a realização dos demais experimentos de

ligação cruzada propostos neste estudo, já que esta condição apresenta o melhor compromisso entre detectabilidade e um número excessivo de modificações por proteínas.

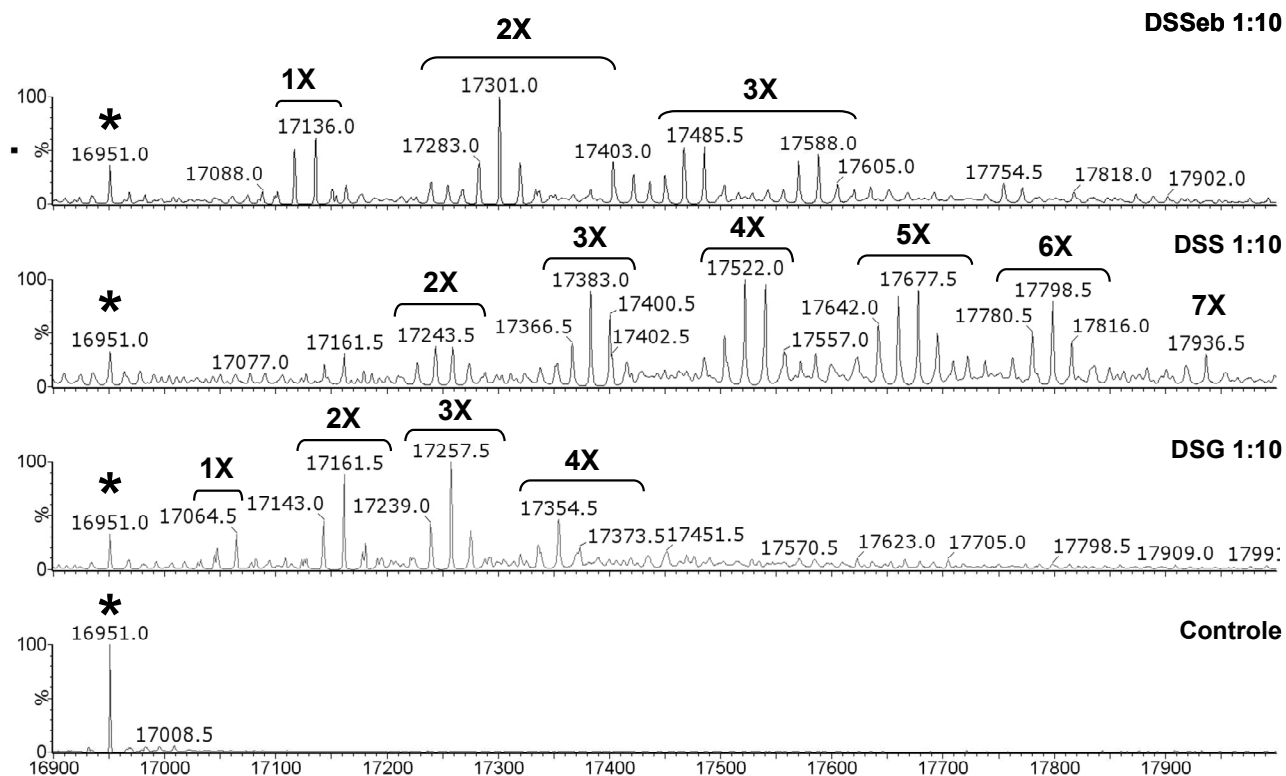
A seguir são mostrados os espectros dos produtos de reação de ligação cruzada dos ALC, DSG, DSS e DSSeb na proporção 1:10 com a Ubq, CytC e Mb (Figuras 27-29). Nesses estão atribuídos o número de modificações detectadas para cada ALC.



**Figura 27:** Espécies detectadas pela análise por LC-MS da Ubq intacta – Controle, e dos produtos de reação de ligação cruzada na proporção molar 1:10, Ubq:ALC.



**Figura 28:** Espécies detectadas pela análise por LC-MS do CytC intacto – Controle, e dos produtos de reação de ligação cruzada na proporção molar 1:10, CytC:ALC.



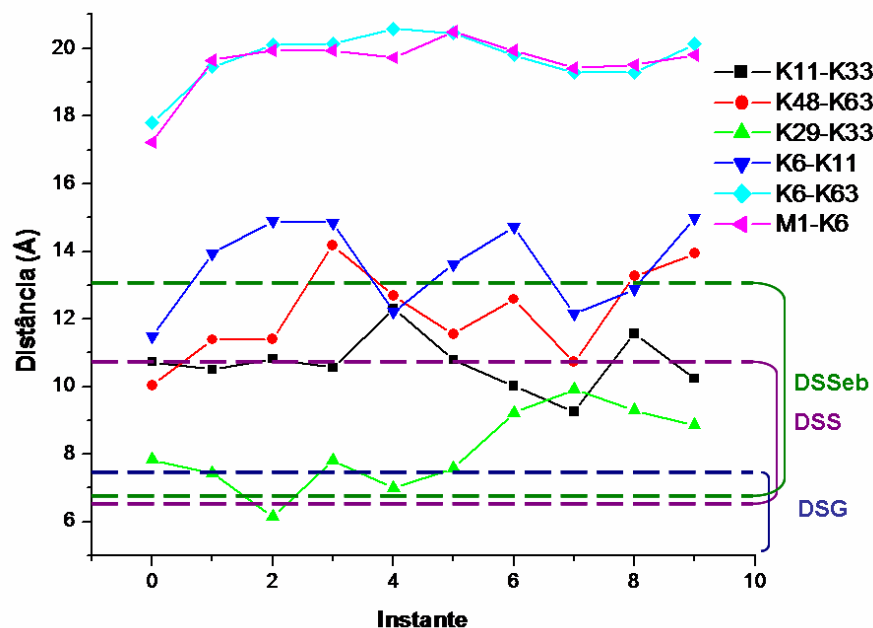
**Figura 29:** Espécies detectadas pela análise por LC-MS da q intacta – Controle, e dos Mbprodutos de reação de ligação cruzada na proporção molar 1:10, Mb:ALC.

A análise dos espectros revela que a proporção 1:10 foi adequada para todos os ALC e proteínas. Além disso, observa-se que, de maneira geral, o DSS apresentou melhor rendimento de reação do que os demais ALC utilizados, o que significa dizer que, para o DSS, houve maior número de modificações por proteína e sinais absolutos mais intensos. Em um primeiro momento, este resultado é inesperado já que o DSSeb cobre uma faixa de distância maior do que o DSS, ou seja, seria esperado que o DSSeb ligasse os mesmos pares que o DSS além de pares mais distantes entre si, não ligáveis pelo DSS. No entanto, devido a menor polaridade do DSSeb (maior número de grupos metil na CE) em relação ao DSS, o DSSeb apresenta menor solubilidade, o que pode ter diminuído a quantidade de DSSeb livre em solução para a reação, diminuindo o rendimento de reação.

### 4.3.2. Mapeamento dos resíduos de lisina da Ubq

O mapeamento das distâncias dos resíduos de lisina da Ubq foi realizado a partir de dados estruturais de RMN. Ao contrário dos dados de cristalografia, os modelos de RMN permitem inferir a dinâmica da proteína e, por isso apresentam um retrato potencialmente mais fiel das distâncias dos resíduos, permitindo avaliar os movimentos das cadeias laterais dos resíduos, em especial dos resíduos de lisina, principais alvos desse estudo. O arquivo contendo as estruturas experimentais de RMN da Ubq foi obtido do banco de estruturas de proteínas NCBI (1D3Z.pdb).

Comparando-se as faixas de distâncias dos ALC obtidas através de dinâmica molecular com as distâncias das aminas das lisinas obtidas pelo modelo de RMN foi possível estimar o número de ligações cruzadas passíveis de serem formadas em um experimento de ligação cruzada, levando em conta apenas as distâncias entre os pares de lisina (Figura 30).

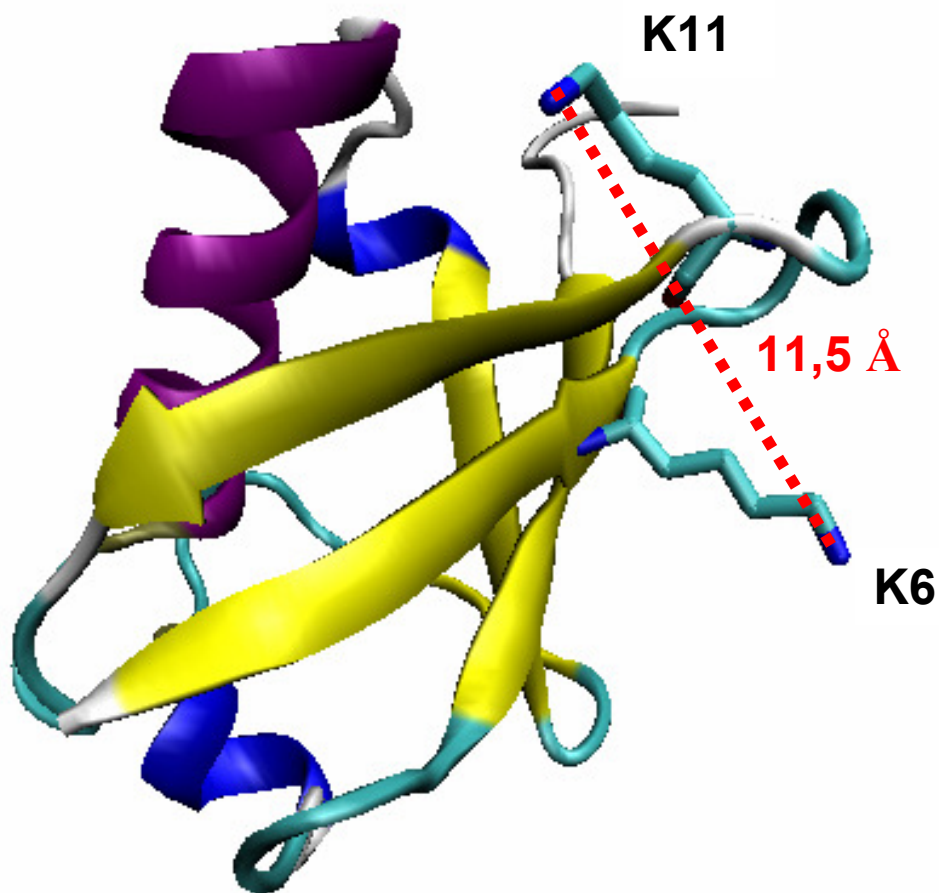


**Figura 30:** Mapeamento das distâncias entre os pares de lisinas da Ubq pelos ALC.

De acordo com o mapeamento das lisinas são possíveis a formação das ligações cruzadas entre as lisinas 29-33 para o DSG, 48-63, 29-33 e 11-33 para o DSS e 29-33, 11-33, 48-63 e 6-11 para o DSSeb.

Vale destacar que o mapeamento foi utilizado apenas com uma referência para estimar o número máximo de ligações cruzadas a serem formadas, e que desvios experimentais deste mapeamento não devem ser tratados como falsos positivos. Um claro exemplo disto foi observado na reação da Ubq com DSS, onde, experimentalmente se observa a formação de uma quarta modificação do tipo interpeptídeo, sendo que neste caso, eram previstas apenas três modificações deste tipo. A formação desta quarta ligação pode ser explicada devido a dois fatores: i) Flexibilidade da proteína além daquela obtida pela análise dos dados de RMN; ii) reação do DSS com outros resíduos de aminoácidos, tais como tirosina [19]. Se considerarmos apenas as reações com as lisinas, as candidatas mais prováveis à formação da quarta modificação do tipo interpeptídeo são as lisinas 6 e 11, que na estrutura de DRX (1UBQ.pdb) estão separados por apenas 11.5 Å (Figura 31), sendo que a lisina 6 encontra-se próxima a porção N-terminal, região onde de alta flexibilidade, o que viabiliza a aproximação entre estes resíduos para a formação de outra a ligação cruzada entre eles.





**Figura 31:** Estrutura da Ubq obtida por DRX (1UBQ.pdb), destacando a proximidade dos resíduos de lisina 6 e 11.

Além disso, como o mapeamento leva em conta apenas a distância entre os pares de lisina na superfície da proteína, para avaliar a formação de ligações cruzadas, é provável que a estimativa realizada seja superestimada, já que a acessibilidade ao resíduo e a reatividade específica [50] destes resíduos (dependente do ambiente químico) são simplesmente ignorados. Isso significa dizer que, na realidade, o número de ligações cruzadas experimentalmente formadas deve ser menor do que o previsto pelo mapeamento.

O mapeamento dos pares de lisina das proteínas CytC e Mb, foi feito a partir das estruturas de RMN, 1MYF.pdb e 1LC2.pdb, respectivamente, e os resultados obtidos estão apresentadas a seguir nas Tabelas 6 e 7.

**Tabela 6:** Pares de lisinas do CytC que podem formar ligações cruzadas.

| Lisinas | 39-53 | 72-79 | 72-86 | 05-07 | 55-53 | 53-79 | 55-73 | 39-60 | 99-100 | 87-88 | 13-86 | 07-08 | 05-08 | 22-25 | 25-27 | 80-86 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DSG     |       | X     |       |       |       |       |       |       | X      | X     |       | X     |       | X     | X     |       |
| DSS     | X     | X     |       | X     |       |       |       |       | X      | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     |
| DSSeb   | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X      | X     | X     | X     | X     | X     | X     | X     |

**Tabela 7:** Pares de lisinas da Mb que podem formar ligações cruzadas.

| Lisinas | 42-98 | 79-87 | 87-147 | 42-47 | 145-147 | 56-62 | 62-63 |
|---------|-------|-------|--------|-------|---------|-------|-------|
| DSG     | X     |       |        |       | X       | X     | X     |
| DSS     | X     | X     |        | X     | X       | X     | X     |
| DSSeb   | X     | X     | X      | X     | X       | X     | X     |

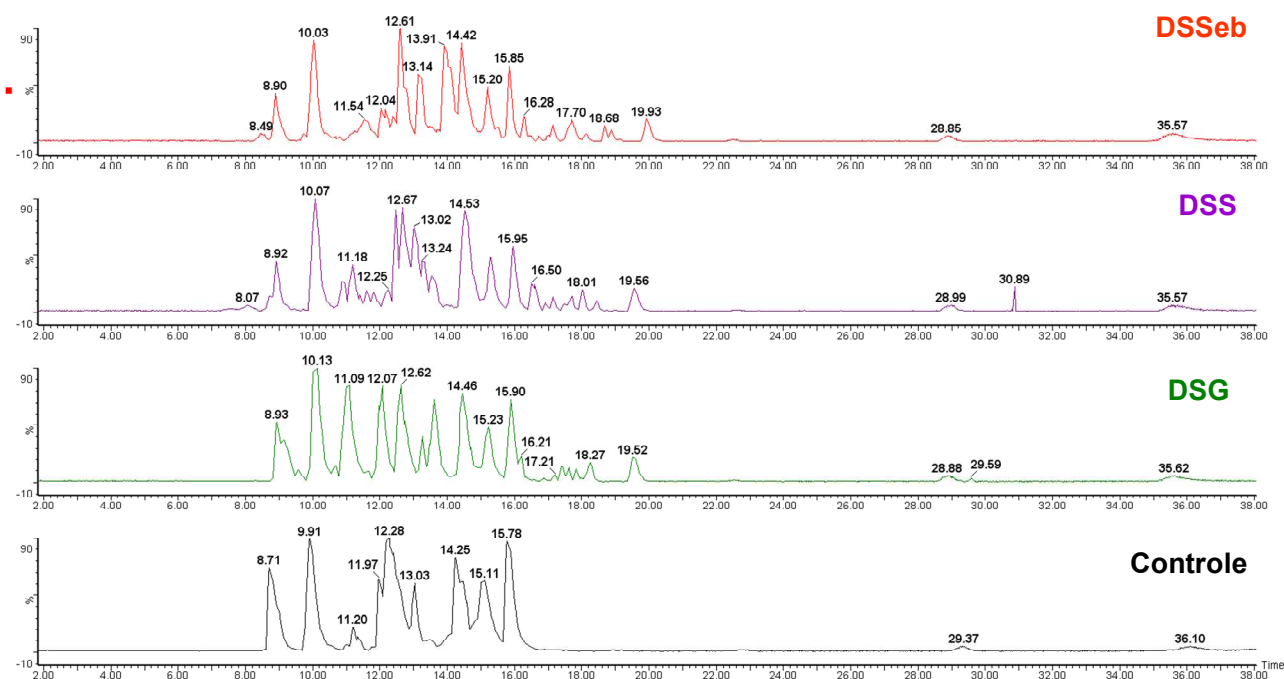
Para o CytC, a partir do mapeamento, foram previstas 6, 11 e 16 ligações cruzadas para o DSG, DSS e DSSeb, respectivamente, enquanto que para a Mb, foram previstas 4, 6 e 8 ligações cruzadas para o DSG, DSS e DSSeb. Experimentalmente, pela análise das proteínas intactas, foram detectadas até 4, 7 e 3 ligações cruzadas para o CytC, já para a Mb, foram detectadas 4, 6 e 5, para o DSG, DSS e DSSeb, respectivamente, o que representa um bom rendimento da reação de ligação cruzada.

#### **4.3.3. Análise de LC-MS/MS: Identificação dos peptídeos ligados pelos ALC**

A próxima etapa para a obtenção da informação estrutural a partir da metodologia ALC+MS consistiu na análise dos peptídeos gerado a partir da digestão das proteínas modificadas para a identificação dos resíduos de lisina modificados nos peptídeos ligados pelos ALC. Como discutido anteriormente, essa etapa consiste no maior gargalo experimental da técnica, já que a detectabilidade dos peptídeos modificados é baixa devido à baixa concentração dessas espécies na mistura final.

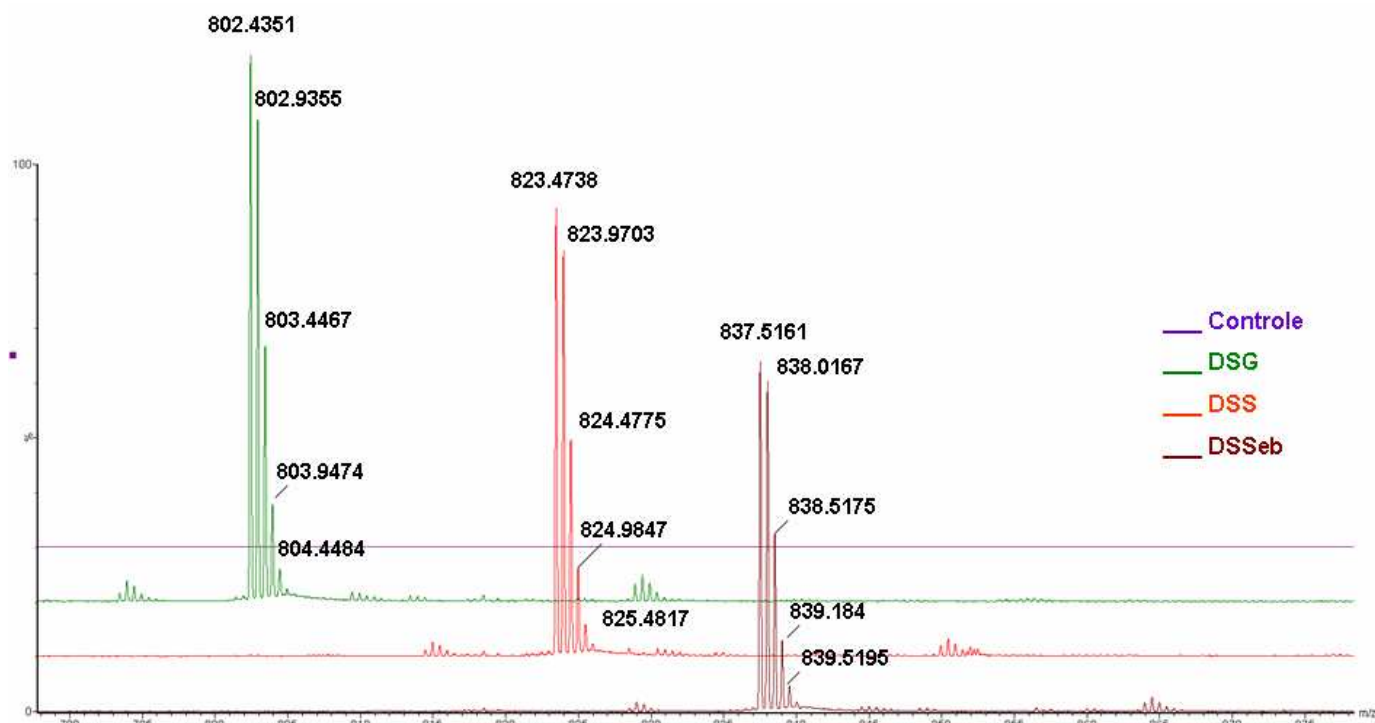
A identificação dos peptídeos modificados inicia-se com a comparação dos peptídeos das amostras das proteínas controle (sem ALC) e das proteínas modificadas com ALC. Os potenciais peptídeos contendo ligações cruzadas devem estar ausentes das amostras controle.

Como pode ser observado nos cromatogramas alinhados das amostras de CytC controle, contendo DSG, DSS e DSSeb 1:10 (Figura 32), picos cromatográficos únicos estão presentes nas amostras modificadas, indicando a presença dos peptídeos modificados pelos ALC.



**Figura 32:** Cromatogramas dos digestos de Citocromo C após reação com os ALC e da amostra controle.

Como exemplo, a análise dos peptídeos correspondentes ao tempo de retenção em torno 19.5 min, revelou a presença de íons de  $m/z$  802,4, 823,4 e 837,5, na amostras DSG, DSS e DSSeb, respectivamente, todos duplamente carregados (Figura 33).



**Figura 33:** Espectro de massa dos peptídeos detectados em torno do tempo de retenção 19,5 min para as amostras de CytC controle, DSG, DSS e DSSeb.

Como é possível observar, a diferença entre sinais do padrão isotópico é de  $m/z$  0,5, mostrando que estes peptídeos estão duplamente carregados. Dessa forma, a determinação das massas neutras ( $M_r$ ) dos peptídeos contendo as modificações pelos três ALC é feita multiplicando-se o valor de  $m/z$  medido pelo número de cargas (+2) e descontando-se a massa correspondente aos prótons (2,0156 u):

$$M_r + M_{\text{DSG}} = [(m/z \ 802,4351 \times 2) - 2] = 1602,8546 \text{ Da}$$

$$M_r + M_{\text{DSS}} = [(m/z \ 823,4738 \times 2) - 2] = 1644,932 \text{ Da}$$

$$M_r + M_{\text{DSSeb}} = [(m/z \ 837,5161 \times 2) - 2] = 1673,0166 \text{ Da}$$

Comparando-se os estes valores verifica-se que a diferença entre eles é, de 42 e 28 u, correspondentes a 3 e 2 grupos metil ( $\text{CH}_2$ ), respectivamente, conforme esperado para os três ALC homólogos. Subtraindo as massas correspondentes às

modificações para cada um dos ALC, DSG (96,0211 u), DSS (138,068 u) e DSSeb (166,0994 u):

$$Mr_{\text{peptídeo}} = 1602,9 - 96 = 1506,8335 \text{ Da}$$

$$Mr_{\text{peptídeo}} = 1644,9 - 138 = 1506,864 \text{ Da}$$

$$Mr_{\text{peptídeo}} = 1673,0 - 166 = 1506,9172 \text{ Da}$$

Os sinais mostrados no espectro referem-se, portanto, ao mesmo peptídeo de massa 1507,0 Da contendo uma cadeia de ALC. Como mostrado mais adiante (Figura 35B), esses peptídeos específicos correspondem a uma modificação do tipo intrapeptídeo para os três ALC.

A análise de todos os peptídeos detectados por LC-MS e MS/MS foi feita como descrito em 3.2.2. Após o processamento dos espectros de massa pelo programa Proteinlynx (Waters Co.), os dados processados foram analisados pelo programa Mascot (*Matrix Science*) para confirmação da identidade e determinação da sequência primária das proteínas. A identidade e a sequência primária identificadas foram:

- **Ubiquitina – Ubiquitin – Ovis Áries (Sheep)**

|              |              |              |              |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 01MQIFVKLTG  | 11KTITLEVEPS | 21DTIENVKAKI | 31QDKEGIPPDQ |
| 41QRLIFAGKQL | 51EDGRTLSDYN | 61IQKESTLHLV | 71LRLRGG     |

- **Citocromo C – Cytochrome C CCHO (Horse)**

|              |              |               |              |
|--------------|--------------|---------------|--------------|
| 01GDVEKGKKIF | 11VQKCAQCHTV | 21EKGGKHKHTGP | 31NLHGLFGRKT |
| 41GQAPGFYTD  | 51ANKNKGITWK | 61ANTLMEYLEN  | 71PKKYIPGTM  |
| 81IFAGIKKKTE | 91REDLIAYLKK | 101ATNE       |              |

- **Mioglobina – Myoglobin MYG\_EQUBU (Equus quagga)**

|               |               |               |               |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 01GLSDGEWQQV  | 11LNVWGKVEAD  | 21IAGHGQEVLI  | 31RLFTGHPETL  |
| 41EKFDKFKHLK  | 51TEAEMKASED  | 61LKKHGTVVLT  | 71ALGGILKKKG  |
| 81HHEAELKPLA  | 91QSHATKHKIP  | 101IKYLEFISDA | 111IIHVLHSHKP |
| 121GDFGADAQGA | 131MTKALELFRN | 141DIAAKYKELG | 151FQG        |

As informações quanto a sequências primárias das proteínas, a enzima utilizada na digestão (tripsina), a lista dos peptídeos detectados, bem como os valores das modificações previstos para cada ALC (Tabela 1), foram utilizados pelo programa xBobcat [34] para a identificação dos possíveis peptídeos contendo modificados pelos ALC.

Este programa baseia-se em um algoritmo que gera uma lista teórica de peptídeos modificados pelos ALC, combinando as massas dos peptídeos gerados por digestão teórica da sequência primária fornecida e as massas das modificações. Essa lista teórica é comparada com a lista de peptídeos obtida pela análise por LC-MS dos digestos, considerando um erro de  $\pm m/z$  0,1.

Dessa forma, foram identificados os potenciais peptídeos modificados. Os resultados obtidos estão mostrados nas Tabelas 6-8, onde + significa detectado e – não detectado.

**Tabela 8:** Peptídeos modificados da Ubq.

| <b>Sequência</b>                         | <b>Lisina(s)</b> | <b>DSG</b> | <b>DSS</b> | <b>DSSeb</b> | <b>Modificação</b> |
|------------------------------------------|------------------|------------|------------|--------------|--------------------|
| LIFAGKQLEDGR                             | 48               | +          | +          | +            | <i>dead end</i>    |
| IQDKEGIPPDQQR                            | 33               | -          | +          | +            | <i>dead end</i>    |
| LIFAGKQLEDGR -<br>TLDYNIQKESTLHLVLR      | 48-63            | -          | +          | +            | inter              |
| IQDKEGIPPDQQR -<br>TLTGKTITLEVEPSDTIENVK | 11-33            | -          | +          | +            | inter              |
| MQIFVKLTGK                               | M1-6             | -          | +          | +            | intra              |
| AKIQDKEGIPPDQQR                          | 29-33            | -          | +          | +            | intra              |

**Tabela 9:** Peptídeos modificados do CytC.

| <b>Sequência</b>       | <b>Lisina(s)</b> | <b>DSG</b> | <b>DSS</b> | <b>DSSeb</b> | <b>Modificação</b> |
|------------------------|------------------|------------|------------|--------------|--------------------|
| MIFAGIKK               | M80-86           | -          | +          | +            | intra              |
| EDLIAYLKKATNE          | 99-100           | +          | +          | +            | intra              |
| KTGQAPGFTYTDANKNK      | 39-53            | -          | +          | +            | intra              |
| EETLMEYLENPKK-MIFAGIKK | 72-86            | -          | -          | +            | inter              |
| MIFAGIKKKTER           | 86/87            | +          | +          | -            | <i>dead end</i>    |
| GGKHKTGPNLHGLFGR       | 25/27            | +          | +          | -            | <i>dead end</i>    |
| KTEREDLIAYLKK          | 88/99            | -          | +          | -            | <i>dead end</i>    |

**Tabela 10:** Peptídeos modificados da Mb.

| <b>Sequência</b>        | <b>Lisina(s)</b> | <b>DSG</b> | <b>DSS</b> | <b>DSSeb</b> | <b>Modificação</b> |
|-------------------------|------------------|------------|------------|--------------|--------------------|
| ASEDLKKHGTVVLTALGGILK   | 62-63            | +          | +          | +            | intra              |
| LFTGHPETLEKFDK - HKIPIK | 42-98            | -          | +          | +            | inter              |
| FKHLK - LFTGHPETLEKFDK  | 47-42            | -          | -          | +            | inter              |
| NDIAAKYKELGFQG          | 145-147          | -          | +          | +            | intra              |
| LFTGHPETLEKFDK          | 42               | +          | +          | +            | <i>dead end</i>    |
| HLKTEAEMK               | 50               | +          | +          | +            | <i>dead end</i>    |
| HGTVVLTALGGILKK         | 77               | +          | +          | +            | <i>dead end</i>    |



Comparando o número de ligações cruzadas identificadas com o número de modificações previstas pelo mapeamento teórico dos pares de lisinas posicionados na superfície da proteína, observa-se que, de fato, a detectabilidade dos peptídeos modificados é ainda o maior gargalo desta técnica. Ao mesmo tempo, é importante destacar que o mapeamento fornece um número superestimado de ligações cruzadas a serem formadas, como foi discutido anteriormente. Como exemplo, para a Mb foram previstas até 7 ligações cruzadas com DSS. Na análise da proteína intacta, foram detectadas 4 ligações cruzadas, valores iguais aos identificados pela análise dos peptídeos da Mb.

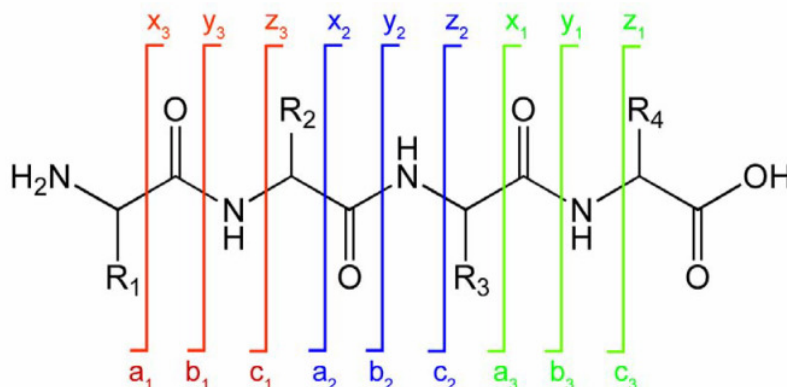
Analogamente, para o CytC, segundo o mapeamento, foram previstas até 12 ligações cruzadas com o DSS. Pela análise da proteína intacta foram formadas até 7 ligações cruzadas diferentes, das quais 3 foram identificadas pela análise dos peptídeos.

Como a identificação dos peptídeos modificados pelos ALC, feita com auxílio do programa xBobcat está baseada apenas na combinação das massas de peptídeos e dos ALC, podem ocorrer falsos positivos em função de coincidências de massas. Além disso, o programa também não leva em consideração o fato de que as lisinas modificadas pelos ALC não são cliváveis pela enzima tripsina. Dessa forma, para que um peptídeo tríptico (obtido por digestão usando tripsina) possa estar modificado por um ALC, esse deve conter no mínimo 2 lisinas ou 1 lisina e 1 arginina em sua sequência, um sítio contendo a modificação (lisina) e outro sítio clivado pela tripsina (argina). Portanto, a confirmação dos peptídeos identificados como contendo alguma modificação não pode ser feita sem uma cuidadosa inspeção manual dos espectros dos seus respectivos fragmentos (MS/MS).

Os peptídeos modificados pelos ALC comportam-se de maneira semelhante aos contendo modificações pós-traducionais no que diz respeito à fragmentação em fase gasosa. Dessa forma, é possível utilizar a mesma nomenclatura e as regras de fragmentação desses peptídeos para os peptídeos contendo ALC [1].

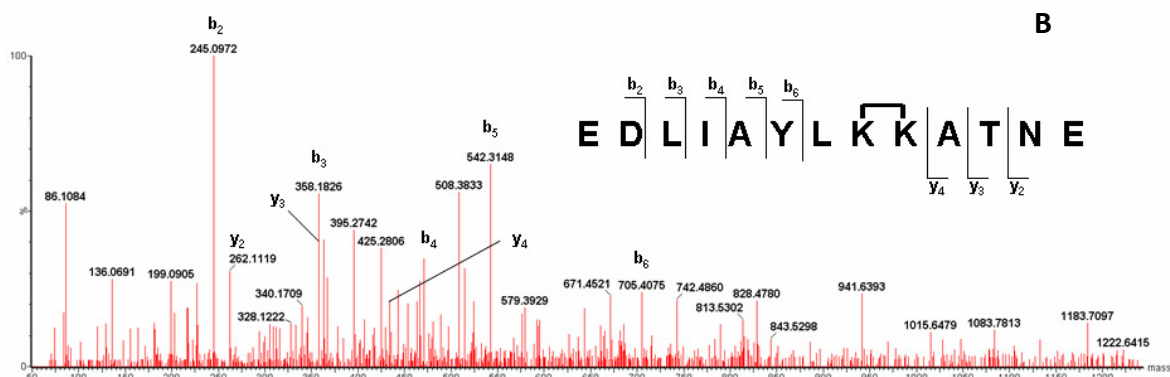
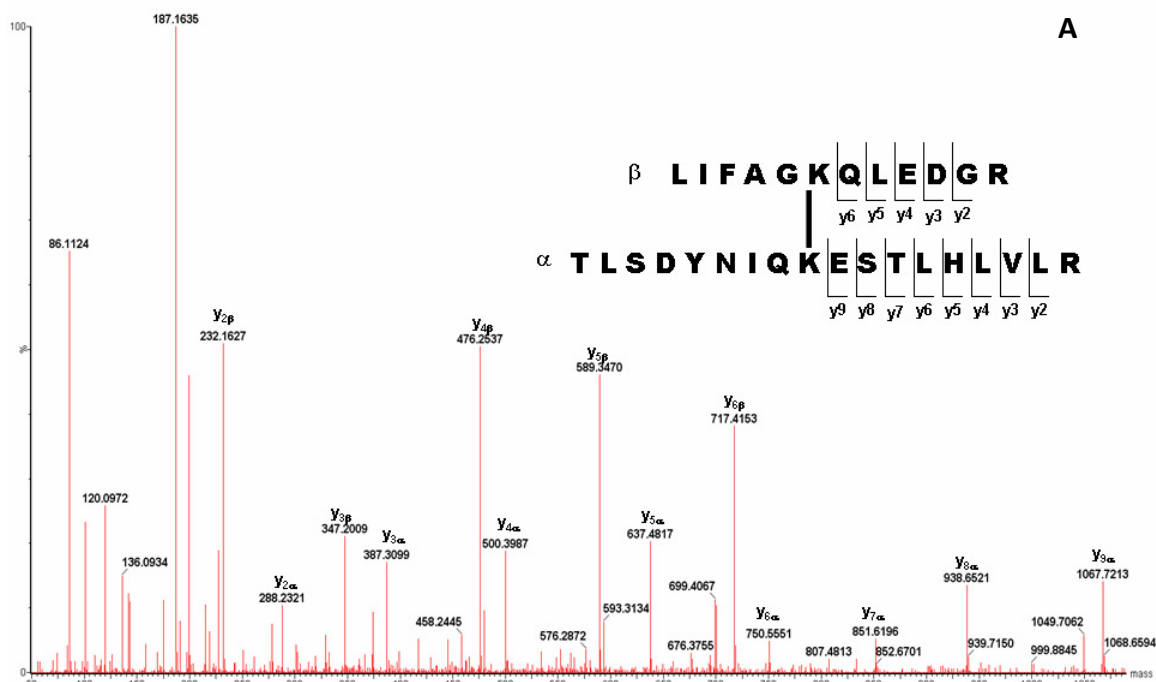
Segundo a nomenclatura utilizada, na fragmentação de peptídeos são formados íons *a*, *b*, e *c*, que são aqueles que retêm a carga na porção N-terminal do peptídeo original, e os íons *x*, *y* e *z* que apresentam a carga na porção C-

terminal (Figura 34) [51]. Os íons comumente formados na fragmentação de peptídeos nas condições nas quais operam o instrumento utilizado nesse estudo são os íons *b* e *y*, que são formados pela clivagem da ligação C(O)–NH da ligação amida.



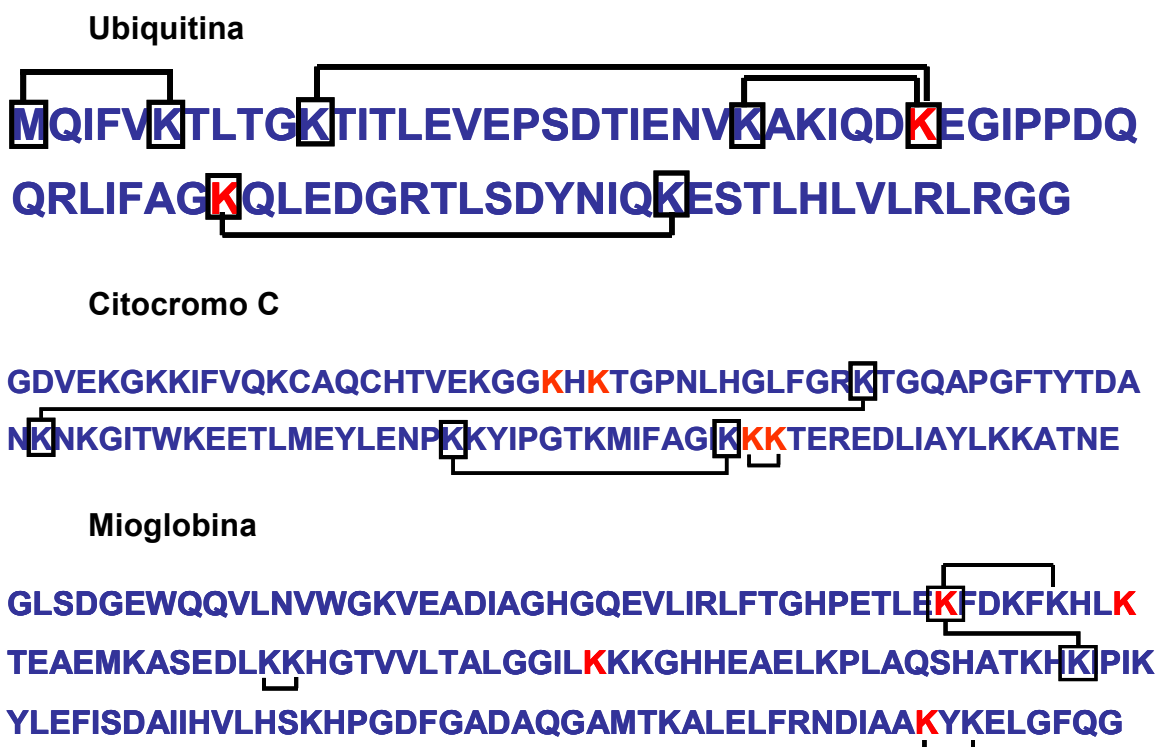
**Figura 34:** Nomenclatura utilizada na identificação dos fragmentos observados na dissociação de peptídeos em fase gasosa.

Dessa forma, foi feita interpretação dos espectros de MS/MS dos peptídeos modificados, como está exemplificado para os peptídeos LIFAGKQLEDGR – TLSDYNIQKESTLHLVLR da Ubq e EDLIAYLKATNE do CytC, na Figura 35.



**Figura 35:** A - Espectro de MS/MS do peptídeo LIFAGKQLEDGR – TLSDYNIQKESTLHLVLR (m/z 723,8) da Ubq contendo uma modificação do tipo interpeptídeo e, B - Espectro de MS/MS do peptídeo EDLIAYLKKATNE (m/z 823,4) do CytC contendo uma modificação do tipo intrapeptídeo.

A partir destes resultados foram construídos mapas de ligação para cada ALC, (Figura 36). Nestes mapas, as lisinas em vermelho são as que apresentaram modificações do tipo *dead end*.



**Figura 36:** Mapas de ligação das proteínas Ubq, Mb e CytC, construídos a partir dos peptídeos modificados listados nas Tabelas 6 – 7. As lisinas em vermelho são as com modificações do tipo *dead end*.

Após a comparação dos dados experimentais e teóricos, fica claro que **todas** as ligações cruzadas identificadas experimentalmente estão dentro daquelas previstas teoricamente, demonstrando que as restrições de distância obtidas pela técnica de ALC+MS são confiáveis.

Cabe destacar que a aquisição de bons espectros de MS/MS requer a re-injeção das amostras para uma análise direcionada, uma vez que a análise automatizada é otimizada para a obtenção do maior número possível de espectros, e não para melhor qualidade destes. Para se obter espectros com a

qualidade desejada, uma segunda análise de MS/MS dirigida especificamente aos peptídeos contendo ligação cruzada é necessária.

Uma abordagem baseada em fragmentos típicos de peptídeos contendo alguma modificação pelos ALC, desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa tem auxiliado na identificação desses peptídeos [52,53]. Foi observado que a fragmentação de peptídeos modificados pelos ALC gera alguns fragmentos recorrentes. A partir de experimentos do tipo varredura de íons precursores, nos quais o primeiro analisador transmite continuamente os íons, enquanto o segundo analisador adquire espectros alternados com e sem fragmentação, pela variação da energia de colisão na câmara de colisão, é possível identificar o precursor que deu origem a determinado fragmento.

## 5. Conclusões

Os parâmetros do campo de força aqui determinados permitiram o uso da dinâmica molecular na simulação de eventos de ligação cruzada e podem ser facilmente estendidos a outros estudos futuros que utilizem estruturas baseadas em ésteres de N-hidróxisuccinimida.

As faixas de distâncias obtidas mostraram-se mais adequadas para descrição do alcance real dos ALC do que os valores únicos frequentemente relatados na literatura, além de fornecerem dados sobre distâncias mínimas para formação das ligações cruzadas. Além disso, para o DSSeb, os resultados alcançados representam os primeiros dados disponíveis para este ALC.

Para os demais ALC, o DSG e o DSS, foi mostrado que os dados disponíveis na literatura apresentam imprecisões significativas, que, certamente, afetam os dados estruturais obtidos a partir destes resultados.

Nos estudos de dinâmica molecular com os ALC parcialmente ligados a resíduos de lisina, foi observada que o ambiente químico ao qual o ALC está submetido, quando parcialmente ligado a uma proteína, afeta a sua dinâmica e faixas de distâncias. De maneira geral, foi observada um estreitamento das faixas de distância dos ALC.

Com relação aos mapeamentos teóricos realizados, considerando apenas as distâncias amostradas entre as lisinas obtidas a partir da técnica de RMN e as faixas de distâncias determinadas para os ALC, foram identificados os prováveis pares de lisinas envolvidos na formação das ligações cruzadas, resultado que apresentou excelente correspondência para os dados experimentais obtidos pela metodologia ALC+MS. Um ponto importante foi a detecção de uma ligação cruzada não prevista pela estrutura de RMN, entre as lisinas 6 e 11. Esse dado revela a grande flexibilidade da região N-terminal, na qual se encontra a lisina 6, o que possibilita a aproximação desta a lisina. A detecção desta espécie mostra também que a estrutura de RMN não descreve com total amplitude a dinâmica da proteína em solução e que cuidados devem ser tomados na utilização do mapeamento para análise das ligações cruzadas detectadas por MS.

Com relação às proporções testadas nos experimentos de ligação cruzada, a proporção molar 1:10 (proteína:ALC) escolhida, resultou em rendimentos de reação adequados para todas as proteínas e ALC empregados.

Por fim, tomando como base o mapeamento teórico, constatou-se que, de fato, o número de modificações experimentalmente formadas é menor do que o previsto teoricamente, o que pode ser explicado por aspectos de reatividade e acessibilidade dos resíduos, assim como pela dificuldade em se detectar os peptídeos contendo ligação cruzada.

A análise dos espectros de MS/MS dos peptídeos modificados permitiu a identificação dos resíduos de lisina ligados ao ALC e verificou-se que todas as modificações experimentalmente detectadas estavam dentro das previstas pelo mapeamento teórico de distâncias, demonstrando a validade dos resultados experimentais e a ausência de falsos positivos.

Por fim, o uso da técnica de ligação cruzada acoplada a espectrometria de massas é uma abordagem atrativa e confiável para obtenção de dados estruturais de proteínas, que requer pequenas quantidades de amostras, demanda relativamente pouco tempo de análise e pode ser executado em qualquer instrumento apropriado para análises proteômicas.

## 6. Referências

- [1] Iglesias A. H. Tese de Doutorado IQ-UNICAMP, 2009.
- [2] James P.; Quadroni M.; Carafoli E.; Gonnet G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 195, 58-64, 1993.
- [3] Yamashita M.; Fenn J. B. J. Phys. Chem., 84, 4451-4459, 1984.
- [4] Karas M.; Bachmann D.; Bahr U.; Hillenkamp F. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 78, 53-68, 1987.
- [5] Fenn J. B.; Mann M.; Meng C. K.; Wong S. F.; Whitehouse C. F. Science, 246, 64-71, 1989.
- [6] Kinter M.; Sherman N. E. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry, New York, John Wiley & Sons, 2000.
- [7] Lopes, N. P.; Crotti, E. M.; Vessechi, R.; Lopes, J. L. C.; Quim. Nova 29, 2, 2006.
- [8] Aebersold R.; Goodlett D. R. Chem. Rev., 101, 269-295, 2001.
- [9] Aebersold R.; Mann M. Nature, 422, 198-207, 2003.
- [10] Patterson S. D.; Aebersold R. Nature Genet., 33, 311-323, 2003.
- [11] Steen H.; Mann M. Nature Rev. Mol. Cell Biol., 5, 699-711, 2004.
- [12] Yates III J. R. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 33, 297-316, 2004.
- [13] Domon B.; Aebersold R. Science, 312, 212-218, 2006.
- [14] Cravatt B. F.; Simon G. M.; Yates III J. R.; Nature, 450, 991-1000, 2007.
- [15] Hoofnagle A. N.; Resing K. A.; Ahn N. G. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 32, 1-25, 2003.
- [16] Yan X.; Watson J.; Ho P. S.; Deinzer M. L. Mol. Cell. Proteomics, 3, 10-23, 2004.
- [17] Jay D. G. J. Biol. Chem., 259, 15572-15578, 1984
- [18] Young M. M.; Tang N.; Hempel J. C.; Oshiro C. M.; Taylor E. W.; Kuntz I. D.; Gibson B. W.; Dollinger G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 5802-5806, 2000.
- [19] Busenlehner L. S.; Armstrong R. N. Arch. Biochemistry Biophys., 433, 34-46, 2005.
- [20] Sinz, A. *Mass. Spectrom. Rev.* 2006, 25, 663.
- [21] Mädler S.; Bich C.; Touboul D; Zenobi R. J. Mass Spectrom. 2008.
- [22] Back J. W.; Jong L.; Muijsers A. O.; Koster C. G. J. Mol. Biol., 331, 303-313, 2003.
- [23] Silva, R. A. G. D.; Hilliard, G. M.; Fang, J.; Macha, S.; Davison, W. S. Biochemistry 2005, 44, 2759.
- [24] Lacroix, M.; Rossi, V.; Gaboriaud, C.; Chevallier, S.; Jaquinod, M.; Thielens, N. M.; Gagnon, J.; Arlaud, G. J. Biochemistry 1997, 36, 6270.
- [25] Alley, S. C.; Trakselis, M. A.; Mayer, M. U.; Ishmael, F. T.; Jones, A. D.; Benkovic, S. J. J. Biol. Chem. 2001, 276, 39340;
- [26] Chu, F.; Shan, S.; Moustakas, D. T.; Alber, F.; Egea, P. F.; Stroud, R. M.; Water, P.; Burlingame, A. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101 (16), 16454.
- [27] Martinez L. Tese de Doutorado IQ-UNICAMP, 2007.
- [28] D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E.



Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus.

**[29]** van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G, *J. Comp. Chem.* 30, 1545-1615 (2009).

**[30]** D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, M. Crowley, Ross C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D.H. Mathews, M.G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, and P.A. University of California, San Francisco, 2008.

**[31]** Jorgensen WL, Tirado-Rives J. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 1657–1666, 1988.

**[32]** Lee Y. *J. Mol Bio.* 4, 816-823, 2008.

**[33]** Pimenova T.; Nazabal A.; Roschitzki B.; Seebacher J.; Rinner O.; Zenobi R. *J. Mass Spectrom.* 43, 185-195, 2008.

**[34]** Maiolica A.; Cittaro D.; Borsotti D.; Sennels L.; Ciferri C.; Tarricone C.; Musacchio A.; Rappsilber J. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 2200-2211, 2007.

**[35]** MassLynx NT User's Guide v3.5, pg. 209-220

**[36]** Rinner O.; Seebacher J.; Walzthoeni T.; Mueller L.; Beck M.; Schmidt A.; Mueller M.; Aebersold R. *Nature Meth.*, 5, 315-318, 2008.

**[37]** Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

**[38]** Davidson, Ernest; Feller, David. *Chem Ver*, 4, 681–696, 1986.

**[39]** Schaftenaar G.; Noordik J.H., *J. Comput. Mol. Design*, 14, 123-134, 2000.

**[40]** E. Hückel, *Zeitschrift für Physik*, 70, 204, (1931); 72, 310, (1931); 76, 628 (1932); 83, 632, (1933)

**[41]** Hückel Theory for Organic Chemists, C. A. Coulson, B. O'Leary and R. B. Mallion, Academic Press, 1978.

**[42]** Andrew Streitwieser, *Molecular Orbital Theory for Organic Chemists*, Wiley, New York, (1961)

**[43]** U. C. Singh and P. A. Kollman (*J. Comp. Chem.* 1984, 5, 129 - 145)

**[44]** James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kale, and Klaus Schulten. *Journal of Computational Chemistry*, 26:1781-1802, 2005.

**[45]** Nakano, T., Kozo, A., Tanaka, S. *Chem-Bio Inform J.* 9, 30-40, 2009

- [46] Green N. S.; Reisler E.; Houk K. N. Protein Science. 10, 1293-1304, 2001.
- [47] DSG (Disuccinimidylglutarate):  
<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=02030232>, acessado em fevereiro de 2010.
- [48] DSS (Disuccinimidyl suberate):  
<http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=02030236>, acessado em fevereiro de 2010.
- [49] Humphrey W., Dalke A., Schulten K. J Mol Grap, 14, 33-38, 1996.
- [50] Novak, P., Young, M. M., Schoeninger, J. S., Kruppa, G. H. Eur. J. Mass Spectrom. 9, 623-631, 2003
- [51] Tananchai, P., Chisti, Y. Biotech. Prog. 1-28, 2009.
- [52] Hoshi, A. I.; Santos, L. F. A., Gozzo, F. C. J Am Soc Mass Spectrom, 20, 557-566, 2009.
- [53] Hoshi, A. I.; Santos, L. F. A., Gozzo, F. C. Anal Chem, 82, 909-916, 2010.

## 7. Anexos

### 7.1. Arquivo Topologia

```
* CHARMM topology file for spacers
*
*
! Compiled by:
! Paulo Cesar Telles de Souza
! Department of Physical Chemistry, Institute of Chemistry
! State University of Campinas
! psouza@igm.unicamp.br or paulocts@gmail.com
! date: 20/11/2008
```

```
27 1
```

```
!
! Topology definitions for spacers
!
```

```
MASS  1  HXP  1.008000 H !
MASS  2  HX2  1.008000 H !
MASS  3  HX3  1.008000 H !
MASS  4  CX   12.011000 C !
MASS  5  CX1  12.011000 C !
MASS  6  CXC  12.011000 C !
MASS  7  CX2  12.011000 C !
MASS  8  CX3  12.011000 C !
MASS  9  CXP  12.011000 C !
MASS 10  NX   14.007000 N !
MASS 11  OX   15.999400 O !
MASS 12  OXC  15.999400 O !
MASS 13  OX1  15.999400 O !
MASS 14  OXE  15.999400 O !
MASS 15  OXS  15.999400 O !
MASS 16  SX   32.060000 S !
```

```
AUTO ANGLES DIHED
```

```

RESI DSS      0.00
GROUP
ATOM C1      CXP      -0.21382450  !
ATOM C2      CX1       0.53105550  !
ATOM N3      NX        0.07123800  !   H33      O9
ATOM C4      CX1       0.53105550  !   \      ||
ATOM C5      CXP      -0.21382450  ! H34--C1----C2      O8 H46 H45 H44 H43 H42 H41 O18   O25      H30
ATOM O6      OXE      -0.43501900  !   |      \      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
ATOM C7      CX        0.94587700  !   |      N3--O6--C7--C11--C12--C13--C14--C15--C16--C17--O19--N20   /      |
ATOM O8      OX       -0.57224600  !   |      /      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
ATOM O9      OX1      -0.52012100  ! H31--C5-----C4      H40 H39 H38 H37 H36 H35   \      |
ATOM O10     OX1      -0.52012100  !   /      ||      C24-----C23--H27
ATOM C11     CX2      -0.41396100  !   H32      O10      ||      \
ATOM C12     CX2      -0.18000000  !                                O26      H29
ATOM C13     CX2      -0.18000000
ATOM C14     CX2      -0.18000000
ATOM C15     CX2      -0.18000000
ATOM C16     CX2      -0.41396100
ATOM C17     CX        0.94587700
ATOM O18     OX       -0.57224600
ATOM O19     OXE      -0.43501900
ATOM N20     NX        0.07123800
ATOM C21     CX1       0.53105550
ATOM C22     CXP      -0.21382450
ATOM C23     CXP      -0.21382450
ATOM C24     CX1       0.53105550
ATOM O25     OX1      -0.52012100
ATOM O26     OX1      -0.52012100
ATOM H27     HXP       0.11339725
ATOM H28     HXP       0.11339725
ATOM H29     HXP       0.11339725
ATOM H30     HXP       0.11339725
ATOM H31     HXP       0.11339725
ATOM H32     HXP       0.11339725
ATOM H33     HXP       0.11339725
ATOM H34     HXP       0.11339725
ATOM H35     HX2       0.17815100
ATOM H36     HX2       0.09000000
ATOM H37     HX2       0.09000000
ATOM H38     HX2       0.09000000
ATOM H39     HX2       0.09000000
ATOM H40     HX2       0.17815100
ATOM H41     HX2       0.17815100
ATOM H42     HX2       0.09000000
ATOM H43     HX2       0.09000000
ATOM H44     HX2       0.09000000
ATOM H45     HX2       0.09000000
ATOM H46     HX2       0.17815100
BOND C1 H31 C1 H32 C1 C2 C1 C5 C5 H33 C5 H34 C5 C4

```

BOND C4 O10 C4 N3 N3 O6 N3 C2 C2 O9 O6 C7 C7 O8 C7 C11  
 BOND C11 H40 C11 H46 C11 C12 C12 H45 C12 H39  
 BOND C12 C13 C13 H44 C13 H38 C13 C14 C14 H37 C14 H43 C14 C15  
 BOND C15 H42 C15 H36 C15 C16 C16 H35 C16 H41 C16 C17 C17 O18  
 BOND C17 O19 O19 N20 N20 C21 N20 C24 C21 O25 C24 O26 C21 C22  
 BOND C22 H28 C22 H30 C22 C23 C23 H27 C23 H29 C23 C24  
 IMPR C7 O6 C11 O8 C17 O19 C16 O18  
 PATCH FIRST NONE LAST NONE

RESI DSG 0.00

GROUP

|          |     |             |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
|----------|-----|-------------|---|-------------|------------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|---------|----------|--|--|
| ATOM C1  | CX1 | 0.53105550  | ! |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM N2  | NX  | 0.07123800  | ! |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM C3  | CX1 | 0.53105550  | ! | H27         | O9                                       |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  | O22     | H36      |  |  |
| ATOM C4  | CXP | -0.21382450 | ! | \           |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         | /        |  |  |
| ATOM C5  | CXP | -0.21382450 | ! | H26--C4---- | C3                                       | O8 | H28 | H30 | H33 | O15 |  |  |  |  |  |  | C18---- | C19--H37 |  |  |
| ATOM O6  | OXE | -0.43501900 | ! |             | \                                        |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  | /       |          |  |  |
| ATOM C7  | CX  | 0.94587700  | ! |             | N2--O6--C7--C11--C12--C13--C14--O16--N17 |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM O8  | OX  | -0.57224600 | ! |             | /                                        |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  | \       |          |  |  |
| ATOM O9  | OX1 | -0.52012100 | ! | H25--C5---- | C1                                       |    | H29 | H31 | H32 |     |  |  |  |  |  |  | C21---- | C20--H34 |  |  |
| ATOM O10 | OX1 | -0.52012100 | ! | /           |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         | \        |  |  |
| ATOM C11 | CX2 | -0.41396100 | ! | H24         | O10                                      |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  | O23     | H35      |  |  |
| ATOM C12 | CX2 | -0.18000000 | ! |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM C13 | CX2 | -0.41396100 |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM C14 | CX  | 0.94587700  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM O15 | OX  | -0.57224600 |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM O16 | OXE | -0.43501900 |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM N17 | NX  | 0.07123800  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM C18 | CX1 | 0.53105550  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM C19 | CXP | -0.21382450 |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM C20 | CXP | -0.21382450 |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM C21 | CX1 | 0.53105550  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM O22 | OX1 | -0.52012100 |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM O23 | OX1 | -0.52012100 |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H24 | HXP | 0.11339725  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H25 | HXP | 0.11339725  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H26 | HXP | 0.11339725  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H27 | HXP | 0.11339725  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H28 | HX2 | 0.17815100  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H29 | HX2 | 0.17815100  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H30 | HX2 | 0.09000000  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H31 | HX2 | 0.09000000  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H32 | HX2 | 0.17815100  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |
| ATOM H33 | HX2 | 0.17815100  |   |             |                                          |    |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |         |          |  |  |



```

ATOM H32      HX2      0.17815100
ATOM H33      HX2      0.09000000
ATOM H34      HX2      0.09000000
ATOM H35      HX2      0.09000000
ATOM H36      HX2      0.09000000
ATOM H37      HX2      0.17815100
ATOM H38      HX2      0.17815100
ATOM H39      HX2      0.09000000
ATOM H40      HX2      0.09000000
ATOM H41      HX2      0.09000000
ATOM H42      HX2      0.09000000
ATOM H43      HX2      0.09000000
ATOM H44      HX2      0.09000000
ATOM H45      HXP      0.11339725
ATOM H46      HXP      0.11339725
ATOM H47      HXP      0.11339725
ATOM H48      HXP      0.11339725
ATOM H49      HXP      0.11339725
ATOM H50      HXP      0.11339725
ATOM H51      HXP      0.11339725
ATOM H52      HXP      0.11339725
BOND C1 N2 C1 O10 C1 C5 C5 H49 C5 H50 C5 C4 C4 H51 C4 H52 C4 C3 O21 N22 C19 O20
BOND C3 O9 C3 N2 N2 O6 O6 C7 C7 O8 C7 C11 C11 H37 C11 H38 C11 C12 C19 O21 C15 H29
BOND C12 H43 C12 H44 C12 C13 C13 H41 C13 H42 C13 C14 C14 H39 C14 H40 C14 C15 C15 H30
BOND C15 C16 C16 H36 C16 H35 C16 C17 C17 H33 C17 H34 C17 C18 C18 H31 C18 H32 C18 C19
BOND N22 C23 N22 C26 C23 O27 C23 C24 C24 H48 C24 H47 C24 C25 C25 H45 C25 H46
BOND C25 C26 C26 O28
IMPR C7 O6 C11 O8 C19 C18 O21 O20
PATCH FIRST NONE LAST NONE

```

```

RESI MD2      -1.00
GROUP
ATOM C1        CX1      0.52397300 !  O7 O13 O14
ATOM C2        CXP      -0.25191200 !  \  |  /
ATOM C3        CXP      -0.35030700 !    S6      O8
ATOM C4        CX1      0.50381500 !    \      ||
ATOM N5        NX       0.19702600 !  H16--C3----C4      O11  H19
ATOM S6        SX       1.28128900 !    |      \      ||  |
ATOM O7        OXS      -0.68956867 !    |      N5--O9--C10--C15--H20
ATOM O8        OX1      -0.50866300 !    |      /      |
ATOM O9        OXE      -0.44731500 !  H17--C2----C1      H21
ATOM C10       CX       0.91610900 !    /      ||
ATOM O11       OX       -0.60061700 !    H18      O12
ATOM O12       OX1      -0.55909700

```

```

ATOM O13      OXS      -0.68956867
ATOM O14      OXS      -0.68956867
ATOM C15      CX3      -0.53310300
ATOM H16      HXP       0.16991500
ATOM H17      HXP       0.15192200
ATOM H18      HXP       0.11192300
ATOM H19      HX3       0.15458267
ATOM H20      HX3       0.15458267
ATOM H21      HX3       0.15458267
BOND C1 O12 C1 C2 C1 N5 C2 H17 C2 H18
BOND C2 C3 C3 H16 C3 S6 S6 O7 S6 O13 S6 O14
BOND C3 C4 C4 O8 C4 N5 N5 O9 O9 C10 C10 O11
BOND C10 C15 C15 H19 C15 H20 C15 H21
IMPR C10 O9 C15 O11
PATCH FIRST NONE LAST NONE

```

```

RESI MD3      0.00
GROUP
ATOM C1      CX3      -0.52594100      !
ATOM C2      CXC       0.81894802      !      H10  O4   H7
ATOM C3      CX3      -0.52594100      !      |   ||   |
ATOM O4      OXC      -0.59285400      ! H9--C1---C2---C3--H6
ATOM H5      HX3       0.13763133      !      |   |
ATOM H6      HX3       0.13763133      !      H8      H5
ATOM H7      HX3       0.13763133      !
ATOM H8      HX3       0.13763133
ATOM H9      HX3       0.13763133
ATOM H10     HX3       0.13763133
BOND C1 C2 C1 H8 C1 H8 C1 H10 C2 O4
BOND C2 C3 C3 H5 C3 H6 C3 H7
IMPR C2 C1 C3 O4
PATCH FIRST NONE LAST NONE

```

```

RESI MD4      0.00
ATOM C1      CX3      -0.50911400      !
ATOM C2      CXC       0.71676400      !      H11  O7   H9   O8      H14
ATOM C3      CX2      -0.27276800      !      |   ||   |   ||   |
ATOM C4      CX       0.85553601      ! H12--C1---C2---C3---C4---O5---C6--H15
ATOM O5      OXE      -0.46976000      !      |   |
ATOM C6      CX3       0.09729700      !      H13      H10      H16
ATOM O7      OXC      -0.55049700
ATOM O8      OX       -0.61439100
ATOM H9      HX2       0.07147500
ATOM H10     HX2       0.07147500
ATOM H11     HX3       0.14378433

```



```

ATOM H12      HX3      0.14378433
ATOM H13      HX3      0.14378433
ATOM H14      HX3      0.05754333
ATOM H15      HX3      0.05754333
ATOM H16      HX3      0.05754333
BOND C1 H11 C1 H12 C1 H13 C1 C2 C2 O7 C2 C3 C3 C4
BOND C6 H14 C6 H15 C6 H16 C6 O5 O5 C4 C4 O8
IMPR C2 C1 C3 O7 C4 C3 O5 O8
PATCH FIRST NONE LAST NONE

```

```

RESI MD5      0.00
ATOM C1        CX3      -0.59900900  !
ATOM C2        CX3      0.78406000  !      H11 O3 H9 H14 O7 H16
ATOM O3        OXC      -0.58167650  !      | || | | || |
ATOM C4        CX2      -0.19318400  ! H12--C1---C2---C4---C5---C6---C8--H17
ATOM C5        CX2      -0.19318400  !      | | |
ATOM C6        CX3      0.78406000  !      H13 H10 H15 H18
ATOM O7        OXC      -0.58167650
ATOM C8        CX3      -0.59900900
ATOM H9        HX2      0.06276825
ATOM H10       HX2      0.06276825
ATOM H11       HX3      0.15475767
ATOM H12       HX3      0.15475767
ATOM H13       HX3      0.15475767
ATOM H14       HX2      0.06276825
ATOM H15       HX2      0.06276825

```

```
ATON H16      HX3      0.15475767
ATON H17      HX3      0.15475767
ATON H18      HX3      0.15475767
BOND C1 H11 C1 H12 C1 H13 C1 C2 C2 O3 C2 C4
BOND C8 H16 C8 H17 C8 H18 C8 C6 C6 O7 C6 C5
BOND C4 H9 C4 H10 C4 C5 C5 H14 C5 H15
IMPR C2 C1 C4 O3 C6 C5 C8 O7
PATCH FIRST NONE LAST NONE
```

## 7.2. Arquivo Parâmetro

```
* CHARMM format parameter file for cross-linkings
*

! Compiled by:
! Paulo Cesar Telles de Souza
! Department of Physical Chemistry, Institute of Chemistry
! State University of Campinas
! psouza@iqm.unicamp.br or paulocts@gmail.com
!
! Topology definitions for ALC's
!
! references:
! - lipid, protein, sugar and nucleic acid sections in CHARMM22 and CHARMM27

BONDS
!
!V(bond) = Kb(b - b0)**2
!
!Kb: kcal/mole/A**2
!b0: A
!
!atom type      Kb          b0
!
HXP  CXP  309.000    1.08889911 ! => HA-CT2 and HAL2-CTL2
CXP  CXP  222.500    1.52904214 ! => CTL2-CTL2 and CT2-CT2
CXP  CX1  200.000    1.51425614 ! => CTL2-CL and CT2-CC
CX1  OX1  860.000    1.19512679 ! => CN1T-ON1
CX1  NX   340.000    1.40421786 ! => CN1-NN2U and CN1T-NN2U
NX   OXE  414.900    1.38053214 ! => amber parameter NC-OS: Kb 414.900 and b0 1.395 => other: Ab initio Kb 748.841 ? need to check
OXE  CX   150.000    1.37696929 ! => OSL-CL
CX   OX   750.000    1.19115643 ! => OBL-CL
CX   CX2  200.000    1.50281333 ! => CT2-CC
CXC  CX2  200.000    1.52173167 ! => CD1-CC316 and CD1-CC325
CXC  OXC  445.000    1.19592667 ! => CD1-O1
CX2  HX2  309.000    1.09321017 ! => CT2-HA and CTL2-HAL2
CX2  CX2  222.500    1.52925846 ! => CT2-CT2 and CTL2-CTL2
CX3  CX   200.000    1.49587000 ! => CTL3-CL and CT3-CC
CX3  HX3  322.000    1.08223000 ! => HA-CT3 and HAL3-CTL3
CC   CX2  200.000    1.52200000 ! => CC-CT2
CC   NH1  430.000    1.36000000 ! => CC-NH2
```

```

ANGLES
!
!V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2
!
!V(Urey-Bradley) = Kub(S - S0)**2
!
!Ktheta: kcal/mole/rad**2
!Theta0: degrees
!Kub: kcal/mole/A**2 (Urey-Bradley)
!S0: A
!
!atom types      Ktheta      Theta0      Kub      S0
!
HXP  CXP  CXP      34.530    112.772661  22.53    2.17900 ! => HN8-CN8-CN8
HXP  CXP  HXP      35.500    107.351143   5.40    1.80200 ! => HA-CT2-HA and HN8-CN8-HN8
HXP  CXP  CX1      33.000    109.176001  30.00    2.16300 ! => HA-CT2-C
CXP  CXP  CX1      52.000    105.444750           ! => CT2-CT2-C
CXP  CX1  NX       80.000    106.305464           ! => NH1-C-CT2
CXP  CX1  OX1      80.000    129.167429           ! => CT2-C-O
CX1  NX  CX1     130.000    114.234143           ! => CPH2-NR1-CPH1
OX1  CX1  NX     100.000    124.556464           ! => ON1-CN1-NN2U
CX1  NX  OXE     100.000    121.124750           ! => no analogue => ON1-CN1-NN2U
NX  OXE  CX      100.000    115.184714           ! => no analogue => ON1-CN1-NN2U
OXE  CX  OX       90.000    121.475000  160.00    2.25760 ! => OSL-CL-OBL
OXE  CX  CX2      55.000    110.538917  20.00    2.32600 ! => OSL-CL-CTL2
OX  CX  CX2      70.000    128.156667  20.0     2.44200 ! => OBL-CL-CTL2
OXC  CXC  CX2     140.000    121.136500           ! => CC331M-CD1-O1,CC316-CD1-O1 and CC325-CD1-O1
CX  CX2  HX2      33.000    108.106167  30.00    2.16300 ! => CL-CTL2-HAL2 and C-CT2-HA
CXC  CX2  HX2      33.000    108.577000  30.00    2.16300 ! => CL-CTL2-HAL2 and C-CT2-HA and CC-CT2-HA
HX2  CX2  HX2      35.500    106.564694   5.40    1.80200 ! => HAL2-CTL2-HAL2 and HA-CT2-HA
CXC  CX2  CX       52.000    111.316500           ! => CT2-CT2-C and CTL*-CTL2-CL
CX2  CXC  CX2      27.000    117.688333           ! => CC325-CD1-CC325, CC325-CD1-CC316 and CC331M-CD1-CC331M
CX  CX2  CX2      52.000    112.152700           ! => CL-CTL2-CTL2 and C-CT2-CT2
CXC  CX2  CX2      52.000    113.777250           ! => CL-CTL2-CTL2 and C-CT2-CT2
CX2  CX2  HX2      26.500    110.212782  22.53    2.17900 ! => CTL2-CTL2-HAL2 and CT2-CT2-HA
CX2  CX2  CX2      58.350    111.124750  11.16    2.56100 ! => CTL2-CTL2-CTL2 and CT2-CT2-CT2
OX  CX  CX3       70.000    128.071000  20.00    2.44200 ! => => OBL-CL-CTL3
OXE  CX  CX3      55.000    109.430000  20.00    2.32600 ! => OSL-CL-CTL3
CX  CX3  HX3      33.000    109.242670  30.00    2.16300 ! => CL-CTL3-HAL3 and C-CT3-HA
HX3  CX3  HX3      35.500    109.697000   5.40    1.80200 ! => HAL3-CTL3-HAL3 and HA-CT3-HA
O  CC  CX2       15.000    121.000000  50.00    2.44000 ! => O-CC-CT2
NH1  CC  CX2      50.000    116.500000  50.00    2.45000 ! => NH2-CC-CT2
CC  CX2  HX2      33.000    109.500000  30.00    2.16300 ! => CT2-CC-HA
CC  CX2  CX2      52.000    108.000000           ! => CT2-CT2-CC
CC  NH1  CT2      50.000    120.000000           ! => CT2-NH1-C

```

|     |     |   |        |            |              |
|-----|-----|---|--------|------------|--------------|
| NH1 | CC  | O | 80.000 | 122.500000 | ! => O-C-NH1 |
| CC  | NH1 | H | 34.000 | 123.000000 | ! => H-NH1-C |

# DIHEDRALS

```

!
!V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))
!
!Kchi: kcal/mole
!n: multiplicity
!delta: degrees
!
!atom types          Kchi      n      delta
!
! mobile part I
OXC  CXC  CX2  CX      1.0500  1    180.000 ! |
OXC  CXC  CX2  CX      0.4000  2    180.000 ! | => no analogue => O1-CD1-CC316-CC316
OXC  CXC  CX2  CX      0.6000  3    180.000 ! |
OXC  CXC  CX2  HX2     0.0000  3    180.000 ! | => O1-CD1-CC316-HCA1
OXC  CXC  CX2  CX2     1.0500  1    180.000 ! |
OXC  CXC  CX2  CX2     0.4000  2    180.000 ! | => O1-CD1-CC316-CC316
OXC  CXC  CX2  CX2     0.6000  3    180.000 ! |
CX2  CXC  CX2  HX2     0.1600  3      0.000 ! | => CC325-CD1-CC316-HCA1
CX2  CXC  CX2  CX      1.4000  1      0.000 ! | => no analogue => CC325-CD1-CC316-CC316
CX2  CXC  CX2  CX      0.2200  3    180.000 ! |
CX2  CXC  CX2  CX2     1.4000  1      0.000 ! | => CC325-CD1-CC316-CC316
CX2  CXC  CX2  CX2     0.2200  3    180.000 ! |
HX2  CX2  CX  OX      0.0000  6    180.000 ! |
CXC  CX2  CX  OX      0.0200  4    180.000 ! | => OBL-CL-CTL2-HAL2
CXC  CX2  CX  OX      0.0250  2    180.000 ! | => no analogue => CTL2-CTL2-CL-OBL
CX2  CX2  CX  OX      0.0200  4    180.000 ! | => CTL2-CTL2-CL-OBL
CX2  CX2  CX  OX      0.0250  2    180.000 ! |
HX2  CX2  CX  OXE     0.0000  6    180.000 ! | => OSL-CL-CTL2-HAL2
CX2  CX2  CX  OXE     0.0600  4      0.000 ! | => CTL2-CTL2-CL-OSL
CX2  CX2  CX  OXE     0.1060  3    180.000 ! |
CX2  CX2  CX  OXE     0.4390  2    180.000 ! |
CX2  CX2  CX  OXE     0.1530  1      0.000 ! |
CXC  CX2  CX  OXE     0.0600  4      0.000 ! | => no analogue => CTL2-CTL2-CL-OSL
CXC  CX2  CX  OXE     0.1060  3    180.000 ! |
CXC  CX2  CX  OXE     0.4390  2    180.000 ! |
CXC  CX2  CX  OXE     0.1530  1      0.000 ! |
CX2  CX  OXE  NX      2.0500  2    180.000 ! | => X-CL-OSL-X
OX  CX  OXE  NX      0.9650  1    180.000 ! | => OBL-CL-OSL-CTL2, OBL-CL-OSL-CTL3 and OBL-CL-OSL-CTL1
OX  CX  OXE  NX      3.8500  2    180.000 ! |
HX3  CX3  CX  OX      0.0000  6    180.000 ! | => OBL-CL-CTL3-HAL3
HX3  CX3  CX  OXE     0.0500  6    180.000 ! | => X-CL-CTL3-X

```

```

! mobile part II
CX2 CX2 CX2 CX 0.5190 1 0.000 ! |
CX2 CX2 CX2 CX 0.6620 2 0.000 ! |
CX2 CX2 CX2 CX 0.3070 3 180.000 ! |
CX2 CX2 CX2 CX 0.0980 4 0.000 ! | => CTL2-CTL2-CTL2-CL
CX2 CX2 CX2 CXC 0.5190 1 0.000 ! |
CX2 CX2 CX2 CXC 0.6620 2 0.000 ! |
CX2 CX2 CX2 CXC 0.3070 3 180.000 ! |
CX2 CX2 CX2 CXC 0.0980 4 0.000 ! |

! mobile part III
CXC CX2 CX2 CX 0.5190 1 0.000 ! |
CXC CX2 CX2 CX 0.6620 2 0.000 ! |
CXC CX2 CX2 CX 0.3070 3 180.000 ! | no analogue => CTL2-CTL2-CTL2-CL and
CXC CX2 CX2 CX 0.0980 4 0.000 ! | CTL3-CTL2-CTL2-CL
CXC CX2 CX2 HX2 0.1900 3 0.000 ! => X-CTL2-CTL2-X
CX CX2 CX2 HX2 0.1900 3 0.000 ! => X-CTL2-CTL2-X

! mobile part IV
CX2 CX2 CX2 HX2 0.1900 3 0.000 ! => X-CTL2-CTL2-X
HX2 CX2 CX2 HX2 0.1900 3 0.000 ! => X-CTL2-CTL2-X

CX2 CX2 CX2 CX2 0.06450 2 0.000 ! |
CX2 CX2 CX2 CX2 0.14975 3 180.000 ! | => CTL2-CTL2-CTL2-CTL2
CX2 CX2 CX2 CX2 0.09458 4 0.000 ! |
CX2 CX2 CX2 CX2 0.11251 5 0.000 ! |

! ring part I
OXE NX CX1 OX1 10.0000 1 180.000 ! => O-C-NH1-CT2
CX1 NX CX1 OX1 10.0000 1 0.000 ! => O-C-NH1-CT2
CX1 NX CX1 CXP 10.0000 1 180.000 ! => O-C-NH1-CT2
OXE NX CX1 CXP 1.6000 1 0.000 ! => CT2-C-NH1-CT2
NX CX1 CXP CXP 0.0000 1 180.000 ! => NH1-C-CT2-CT2
OX1 CX1 CXP CXP 1.4000 1 0.000 ! => O-C-CT2-CT2
NX CX1 CXP HXP 0.0000 3 0.000 ! => NH1-C-CT2-HA
OX1 CX1 CXP HXP 0.0000 3 180.000 ! => NH1-C-CT2-CT2
CX1 CXP CXP CX1 0.1950 3 180.000 ! |
HXP CXP CXP CX1 0.1950 3 0.000 ! | => X-CN8-CN8-X and X-CT2-CT2-X
HXP CXP CXP HXP 0.1950 3 180.000 ! |
CX3 CX OXE NX 1.6000 1 0.000 ! => X-CL-OSL-X

! ring part II
CX OXE NX CX1 -0.3221625 1 0.000 ! |
CX OXE NX CX1 1.1590500 2 0.000 ! | => Ab Initio Gaussian Calculations
CX OXE NX CX1 0.2270675 3 0.000 ! |

! residue link
H1 NH1 CC CX2 2.5000 2 180.00 ! => H-NH1-C-CT2
CX2 NH1 CC CX2 1.6000 1 0.00 ! => CT2-C-NH1-CT2
CX2 NH1 CC CX2 2.5000 2 180.00 !
NH1 CC CX2 HX2 0.0000 3 180.00 ! NH2-CC-CT2-HA and NH1-C-CT2-HA
O CC CX2 HX2 0.0000 3 180.00 ! O-CC-CT2-HA and O-C-CT2-HA
NH1 CC CX2 CX2 0.0000 1 0.00 ! => NH1-C-CT2-CT2
O CC CX2 CX2 1.4000 1 0.00 ! => O-C-CT2-CT2

```

|     |     |     |     |        |   |         |  |                      |
|-----|-----|-----|-----|--------|---|---------|--|----------------------|
| CX2 | CX2 | CX2 | CC  | 0.5190 | 1 | 0.000   |  |                      |
| CX2 | CX2 | CX2 | CC  | 0.6620 | 2 | 0.000   |  | => CTL2-CTL2-CTL2-CL |
| CX2 | CX2 | CX2 | CC  | 0.3070 | 3 | 180.000 |  |                      |
| CX2 | CX2 | CX2 | CC  | 0.0980 | 4 | 0.000   |  |                      |
| CC  | CX2 | CX2 | HX2 | 0.1900 | 3 | 0.000   |  | => X-CTL2-CTL2-X     |
| CT2 | CT2 | NH1 | CC  | 1.8000 | 1 | 0.000   |  | => CT2-CT2-NH1-C     |
| CT2 | NH1 | CC  | O   | 2.5000 | 2 | 180.00  |  | => O-C-NH1-CT2       |
| CT2 | NH1 | CC  | CX2 | 1.6000 | 1 | 0.00    |  | => CT2-C-NH1-CT2     |
| HA  | CT2 | NH1 | CC  | 0.0000 | 3 | 0.00    |  | => HA-CT2-NH1-C      |
| H   | NH1 | CC  | O   | 2.5000 | 2 | 180.00  |  | => O-C-NH1-H         |
| H   | NH1 | CC  | CX2 | 2.5000 | 2 | 180.00  |  | => O-C-NH1-CT2       |

```

IMPROPER
!
!V(improper) = Kpsi(psi - psi0)**2
!
!Kpsi: kcal/mole/rad**2
!psi0: degrees
!note that the second column of numbers (0) is ignored
!
!atom types          Kpsi          psi0
!
CX  OXE  CX2  OX      100.00    0      0.00 ! => OBL-X-X-CL
CX  OXE  CX3  OX      100.00    0      0.00 ! => OBL-X-X-CL
CXC CX2  CX2  OXC      100.00    0      0.00 ! => OBL-X-X-CL
OX  OXE  CX2  CX      100.00    0      0.00 ! => OBL-X-X-CL
CC  NH1  CX2  O       120.00    0      0.00 ! => O-X-X-C
H   CT2  CX2  NH1     20.00    0      0.00 ! => H-X-X-NH1

```



```

NONBONDED nbxmod 5 atom cdiel shift vatom vdistance vswitch -
cutnb 14.0 ctofnb 12.0 ctonnb 10.0 eps 1.0 e14fac 1.0 wmin 1.5
!adm jr., 5/08/91, suggested cutoff scheme
!
!V(Lennard-Jones) = Eps,i,j[(Rmin,i,j/ri,j)**12 - 2(Rmin,i,j/ri,j)**6]
!
!epsilon: kcal/mole, Eps,i,j = sqrt(eps,i * eps,j)
!Rmin/2: A, Rmin,i,j = Rmin/2,i + Rmin/2,j
!
!atom  ignored      epsilon      Rmin/2  ignored      eps,1-4      Rmin/2,1-4
!
CX2      0.000      -0.0550      2.175      0.000      -0.010      1.900      ! => CT2
CXP      0.000      -0.0560      2.010      0.000      -0.010      1.900      ! => CTL2 and CN8
HX2      0.000      -0.0220      1.320
HXP      0.000      -0.0280      1.340      ! => HA
CXC      0.000      -0.1100      2.000      ! => HAL2
CX      0.000      -0.0700      2.000      ! => C
CX1      0.000      -0.1000      1.900      ! => CL and CC
OX1      0.000      -0.1200      1.700      ! => CN1 and CN1T
NX      0.000      -0.2000      1.850      ! => ON1
OXE      0.000      -0.1521      1.770      ! => NN*
OX      0.000      -0.1200      1.700      0.000      -0.120      1.400      ! => OSL
OXC      0.000      -0.1200      1.700      0.000      -0.120      1.400      ! => O and OBL
CX3      0.000      -0.0800      2.060      0.000      -0.010      1.900      ! => O and OBL
HX3      0.000      -0.0220      1.320      ! => CT3
!SX
!OXS

```