

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

**CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL DE  
GLICOCONJUGADOS INSERIDOS EM MEMBRANA**

Carla Gottschald Chiodi

Porto Alegre – Brasil  
Março de 2013

**CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL DE GLICOCONJUGADOS  
INSERIDOS EM MEMBRANA**

*Carla Gottschald Chiodi*

Dissertação de mestrado elaborada no Grupo de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor doutor

Hugo Verli

Porto Alegre – Brasil

Março de 2013

**CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL DE GLICOCONJUGADOS  
INSERIDOS EM MEMBRANA**

*Carla Gottschald Chiodi*

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

Banca Examinadora:

---

Hugo Verli (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Presidente)

---

Charley Christian Staats (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

---

Thereza Amélia Soares (Departamento de Química Fundamental - UFPE)

---

Hubert Karl Stassen (Departamento de Físico-Química - UFRGS)

---

Gustavo Fioravanti Vieira (Departamento de Genética - UFRGS) (Suplente)

Esta dissertação foi realizada sob a orientação do Professor Doutor Hugo Verli, com o apoio financeiro da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

CHIODI, Carla Gottschald.

**Caracterização Conformacional de Glicoconjugados Inseridos em Membrana**

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2013.

Dissertação: Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

1. Dinâmica Molecular

2. Glicolípídeos

3. Glicopeptídeos

4. Modelagem molecular

I. Hugo Verli

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

III. Títulos

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao professor Hugo Verli por ter me recebido junto ao Grupo de Bioinformática Estrutural e por ter se dedicado a me orientar.

Aos membros da comissão de acompanhamento, Dra. Fernanda Stanisçuaski e Dr. Guido Lenz, por todo suporte científico.

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

À Sílvia e ao Luciano, pelo profissionalismo, competência e atenção.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite.

A CAPES, ao CNPq, a FAPERGS e ao CESUP por terem possibilitado a realização desse projeto.

Aos alunos do grupo de Bioinformática Estrutural, pelo companheirismo e convivência, principalmente à Cláudia Lemelle Fernandes, ao Rodrigo Ligabue Braun, à Liana Guimarães Sachett e à Carla Carvalho de Aguiar por todo apoio, principalmente o emocional.

Aos meus queridos amigos, desde os da infância até os mais recentes, por sempre acreditarem e torcerem por mim. Uma grande amiga citou-me essa frase de Shakespeare, e gostaria de compartilhá-la: “Quando o amor é sincero, ele vem com um grande amigo, e, quando a amizade é concreta, ela é cheia de amor e carinho”.

Amo todos vocês.

Aos meus pais, Aires José Chiodi e Elisabeth Gottschald Chiodi, e avós por todo amor, apoio e incentivo incondicional e pelos ensinamentos de grande valia tanto para minha vida profissional quanto pessoal, extenso também aos diversos “pais postigos” que me “adotaram” durante a vida. Não esqueçam que os pais seguram as mãos de seus filhos por um breve momento, mas seus corações para sempre.

*“Even if the open windows of science at first make us shiver after the cozy indoor warmth of traditional humanizing myths, in the end the fresh air brings vigor, and the great spaces have a splendor of their own.”*

Bertrand Russell  
*“What I Believe”, 1925*

**SUMÁRIO**

LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
ÍNDICE DE TABELAS .....	xvi
1 Introdução.....	1
1.1 Estrutura e conformação de carboidratos .....	1
1.2 Glicosilação .....	2
1.2.1 N-glicosilação .....	3
1.2.2 Fosfoglicosilação .....	5
1.2.3 Glipiação .....	7
1.3 Fosfolipídeos e membrana plasmática.....	12
1.4 Importância dos carboidratos em moléculas de superfície celular.....	15
1.4.1 Glicopeptídeo NETNES de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
1.4.2 Gangliosídeos .....	21
1.5 Métodos experimentais para caracterização da estrutura tridimensional de glicoconjugados ancorados em membranas.....	23
1.6 A dinâmica molecular (DM) como ferramenta para descrição conformacional de biomoléculas .....	25
2 Objetivos.....	30
3 Metodologia .....	31
3.1 Programas utilizados .....	31
3.2 Nomenclatura e definições .....	31
3.3 Cálculos utilizando métodos ab initio .....	32

3.4	Construção de topologias.....	33
3.5	Caracterização conformacional das ligações glicosídicas .....	34
3.6	Construção da estrutura glicídica.....	36
3.7	Simulações de DM .....	37
3.7.1	Protocolos de simulação do NETNES.....	37
3.7.2	Protocolos de simulação dos gangliosídeos .....	38
3.7.3	Sistemas simulados .....	39
3.7.4	Validação das simulações de DM .....	40
4	Resultados.....	41
4.1	Preâmbulo .....	41
4.2	Trabalho I .....	42
4.3	Trabalho II .....	67
5	Conclusões.....	92
6	Perspectivas .....	94
7	Referências Bibliográficas .....	95
8	Anexos.....	113
8.1	Cargas atômicas de Löwdin .....	113
8.2	Topologias dos resíduos do NETNES para GROMOS96 53a6 .....	115
8.3	Topologias dos monossacarídeos para GROMOS96 43a1 .....	138
	Curriculum Vitae.....	147

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEP	aminoetil fosfato
Alk-AG	alquil-acil glicerol
Ara	arabinose
Arg	arginina
Asn	asparagina
Cer	ceramida
Cys	cisteína
DAG	diacilglicerol
DiAcTridH	2,4,-diacetamido, 2,4,6 -trideoxihexose
DM	dinâmica molecular
DMG	dimiristoilglicerol
DMSO	dimetilsulfóxido
Dol	dolicol
ETNP	fosfoetanolamina
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
Fuc	fucose
FucNAc	N-acetil-fucosamina
Gal	galactose
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GIPL	glicoinositolfosfolípídeo
Glc	glicose
GlcN	glicosamina
GlcNAc	N-acetil-glicosamina
GPI	glicofosfatidilinositol
GSL	glicoesfingolípídeo
HexNAc	N-acetil-hexosamina
Hyl	hidroxilisina
Hyp	hidroxiprolina
Man	manose
MD	molecular dynamics
MM	mecânica molecular

NeuAc	ácido siálico
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI	fosfatidilinositol
PLG	proteína ligadora de glicana
POPC	1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina
PSE	<i>pseudaminic acid (5,7-diamino-3,5,7,9-tetradecyloxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulosonic)</i>
RE	retículo endoplasmático
Rha	ramnose
RMN	ressonância magnética nuclear
Ser	serina
Thr	treonina
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
Xyl	xilose

## RESUMO

A glicosilação é a modificação de proteínas mais abundante que existe, ocorrendo em todos os reinos da vida e com diversos tipos de ligação proteína-carboidrato já descritos. A ligação de um carboidrato em uma sequência de aminoácidos pode afetar estrutura e função desses, sendo importante para estabilidade e rigidez de proteínas, localização intracelular, sinalização e comunicação celular, adesão, resposta imune e invasão de parasitas, dentre outros. Apesar do amplo papel biológico dessas moléculas, ainda há poucos estudos acerca de sua glicobiologia estrutural, em parte em decorrência de características, como sua alta flexibilidade, que dificultam seu estudo por métodos como cristalografia de raio X e ressonância magnética nuclear. Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar a estrutura e dinâmica: 1) do glicopeptídeo NETNES de *Trypanosoma cruzi*, completamente glicosilado e inserido em membrana; e 2) dos gangliosídeos GM1, GD1b e GT1b, em ambos os casos considerando soluções semelhantes às fisiológicas. A metodologia empregada envolveu a simulação de dissacarídeos, construção de mapas de energia por metadinâmica, montagem das glicanas e simulações por dinâmica molecular. Os parâmetros para as porções sacarídicas foram desenvolvidos pelo nosso grupo, enquanto que os da membrana foram retirados do trabalho de Kukul, A. *J. Chem. Theory Comput.*, 2009,5:615-626. No caso do NETNES, foram simulados quatro sistemas: membrana de fosfatidilcolina, membrana com glicosil fosfatidil inositol, membrana com glicosil fosfatidil inositol e NETNES com uma N-glicosilação e membrana com glicosil fosfatidil inositol e NETNES com duas N-glicosilações. Os resultados obtidos mostram que as propriedades da membrana e o modelo da âncora estão de acordo com os dados experimentais, e que a porção peptídica é bem flexível, principalmente o N-terminal, o qual se dobra na região próxima às asparaginas da N-glicosilação. Além disso o peptídeo se curva sobre a superfície da membrana, expondo ele próprio e algumas glicanas ao meio extracelular. Quanto aos gangliosídeos, cada um foi submetido a diversas simulações de dinâmica molecular, utilizando dois campos de força diferentes, e algumas com restrições de distâncias de acordo com dados experimentais de *Nuclear Overhauser Effect*. Foram realizadas análises dos diedros das ligações glicosídicas e das distâncias entre

hidrogênios, sendo que essa última foi comparada com dados de ressonância magnética nuclear e cristalografia, indicando a capacidade dos campos de força GLYCAM, quando associado a restrições de distância, e do GROMOS96 em reproduzir os dados experimentais conformacionais dos gangliosídeos.

## ABSTRACT

Glycosylation is the most abundant protein modification, occurring across all kingdoms of life and having several protein-carbohydrate linkages already described. The appendage of a carbohydrate to an amino acid sequence can affect its structure and function, being important for protein stability and rigidity, intracellular localization, cellular signalization and communication, adhesion, immune response, parasites invasion, among others. Despite the plentiful roles of those molecules, there are still a few works of structural glycobiology, due to some sugar features, as high flexibility, that hinder their characterization by experimental methods, such as X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance. In this context, the present work aims to characterize and validate structure and conformation of: 1) NETNES glycopeptide from *Trypanosoma cruzi* attached to all glycans and membrane; 2) gangliosides GM1, GD1b and GT1b, in both cases considering solutions similar to the physiologic one. The employed methodology involves disaccharide simulations, construction of energy maps obtained from metadynamics, glycans building blocks and molecular dynamics simulations. The parameters for saccharidic portions were developed in our research group, and the ones for membrane were obtained from Kukol, A. *J. Chem. Theory Comput.*, 2009,5:615-626. In NETNES case, four systems were simulated: POPC membrane, membrane with glycosylphosphatidylinositol, membrane with glycosylphosphatidylinositol and one N-glycosylation NETNES, and membrane with glycosylphosphatidylinositol and NETNES with two N-glycosylations. The obtained results indicate that membrane properties and anchor model are in good agreement with experimental data, and that the protein portion is very flexible, mainly on the N-terminal, which bends on the region near the N-glycosylated asparagines. Moreover, the peptide curves over membrane surface, exposing itself and some glycans to extracellular medium. Regarding the gangliosides, each one was submitted to several molecular dynamics simulations, using two different force fields, and some of them with distance restraints according to experimental Nuclear Overhauser Effect signals. Dihedrals distribution and hydrogens distances were analyzed, and the latter was compared to nuclear magnetic resonance and crystallography data, indicating the capability of GLYCAM, when associated with distance restraints, and of GROMOS96 force fields to reproduce experimental data of gangliosides conformation.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação do globo de conformações dos anéis piranosídicos de Cremer e Pole .....	2
Figura 2: Representação dos tipos de ligações glicosídicas já identificados.....	3
Figura 3: Via da N-glicosilação na membrana do RE em <i>S. cerevisiae</i> .....	5
Figura 4: Estrutura glicídica padrão das âncoras de GPI .....	8
Figura 5: Etapas da biossíntese da âncora de GPI .....	11
Figura 6: Estrutura representativa de uma membrana plasmática com seus constituintes majoritários.....	12
Figura 7: Representação esquemática dos diferentes tipo de lipídeos que podem compor a membrana plasmática.....	13
Figura 8: Esquema de microdomínios transientes de balsas lipídicas .....	15
Figura 9: Principais funções das glicanas.....	17
Figura 10: Mecanismos de adesão entre proteína-carboidrato utilizados por alguns patógenos .....	18
Figura 11: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	19
Figura 12: Duas formas de NETNES existentes.....	21
Figura 13: Esquema ilustrando a nomenclatura de Svennerholm para gangliosídeos. ....	22
Figura 14: Funções de energia que compõe campos de força GROMOS96 .....	27
Figura 15: Exploração da superfície de energia livre, $V(x)$ , de acordo com uma variável, $x$ , pelo método de metadinâmica.....	29
Figura 16: Representação dos diedros das ligações glicosídicas .....	32

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas de GPI já descritas .....	9
Tabela 2: Funções estruturais e modulatórias das glicanas .....	17
Tabela 3: Doenças autoimunes relacionadas aos gangliosídeos .....	23
Tabela 4: Definição dos diedros impróprios utilizados para definir a conformação dos monossacarídeos contidos nos sistemas simulados .....	33
Tabela 5: Unidades dissacarídicas abordadas na presente dissertação.....	35
Tabela 6: Sistemas simulados com seus respectivos compostos, meios, condições e campos de força.....	39

# 1 Introdução

## 1.1 Estrutura e conformação de carboidratos

Carboidratos são as biomoléculas mais abundantes da Terra, sendo divididos em três grupos de acordo com seu tamanho: 1) monossacarídeos, compostos por um único açúcar; 2) oligossacarídeos, composto por unidades de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas; e 3) polissacarídeos, que são polímeros com mais de vinte monossacarídeos (Nelson & Cox, 2008). Os monossacarídeos contêm de três a nove átomos de carbono em sua estrutura, sendo pelo menos um deles quiral, assumindo, assim, estados configuracionais dextrógiro (D-) ou levógiro (L-). Em meio aquoso, glicídeos com 5 ou mais carbonos ciclizam-se, formando anéis furanosídicos e piranosídicos, com 5 e 6 átomos no anel, respectivamente, os quais podem possuir 2 estados anoméricos,  $\alpha$  e  $\beta$ , os quais se referem à posição axial ou equatorial, respectivamente, do substituinte ligado ao carbono C1 (Nelson & Cox, 2008; Berg *et al.*, 2007). As piranoses possuem diversas conformações, tais como cadeira (C), bote (B), bote-torcido (S), meia-cadeira (H) e envelope (E) (Figura 1). A conformação de cadeira é geralmente a preferencial e possui 2 formas possíveis,  ${}^4C_1$  e  ${}^1C_4$  (Fushinobu *et al.*, 2008).

Devido a todas essas variações na conformação dos carboidratos, a IUPAC possui recomendações específicas para descrevê-los (IUPAC-IUB, 1980; IUPAC-IUB, 1983; IUPAC-IUB, 1996). Assim, os monossacarídeos são escritos com códigos de três letras, precedidos pelo descritor anomérico ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) e pelo símbolo da configuração (D ou L). O tamanho do anel será indicado pelas letras “f” ou “p”, em itálico, para furanoses e piranoses, respectivamente. Quando há ligação glicosídica, os números dos carbonos envolvidos na ligação serão dados dentro de parênteses, separados por uma flecha, e entre os códigos dos carboidratos, como por exemplo,  $\beta$ -D-Glc*p*NAc-(1  $\rightarrow$  4)- $\beta$ -D-Glc*p*NAc, que significa que uma N-acetil glicosamina de anômero  $\beta$  está ligada no oxigênio do carbono 4 de outra N-acetil glicosamina de anômero  $\beta$ .

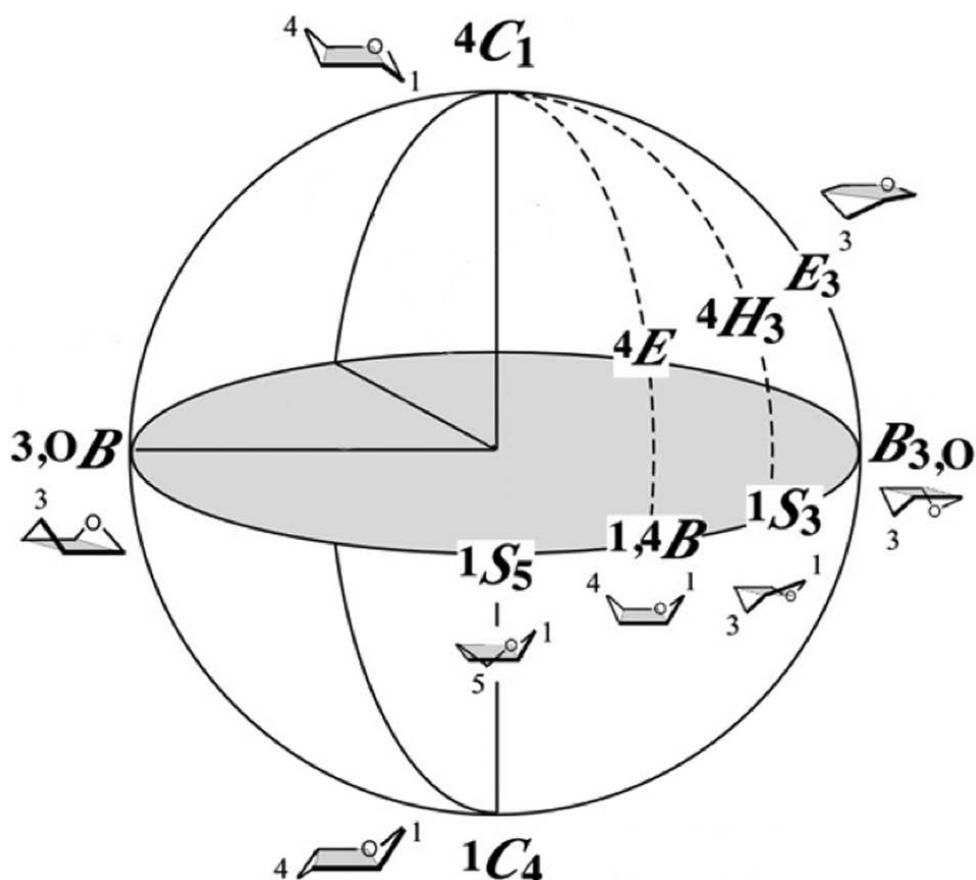


Figura 1: Representação do globo de conformações dos anéis piranosídicos de Cremer e Pole (adaptado de Fushinobu *et al.*, 2008). Essas podem ser cadeira (C), bote (B), bote-torcido (S), meia-cadeira (H) e envelope (E), sendo a primeira a forma mais estável delas.

## 1.2 Glicosilação

A glicosilação é a modificação de proteínas mais abundante na natureza. Ela foi primeiramente demonstrada no fim dos anos 1930, e por muito tempo se pensou que ela só ocorria em eucariotos. Somente a partir dos anos 70 é que foram descobertas glicoproteínas em arqueias e bactérias (Sleytr, 1975; Mescher & Strominger, 1976; Sleytr & Thorne, 1976). Hoje, sabe-se que essa modificação ocorre co- e pós-traducionalmente em um amplo espectro de organismos, desde eubactérias até eucariotos (Spiro, 2002).

Atualmente, encontram-se descritos seis tipos de ligações entre aminoácidos e carboidratos: N-glicosilação, fosfoglicosilação, gliptação, O-glicosilação, C-glicosilação e S-glicosilação, envolvendo pelo menos 13

monossacarídeos diferentes e 8 tipos de aminoácidos (Spiro, 2002; Stepper *et al.*, 2011; Pol-Fachin, 2010) (Figura 2). As três primeiras, as quais foram estudadas na presente dissertação, serão detalhadas a seguir.

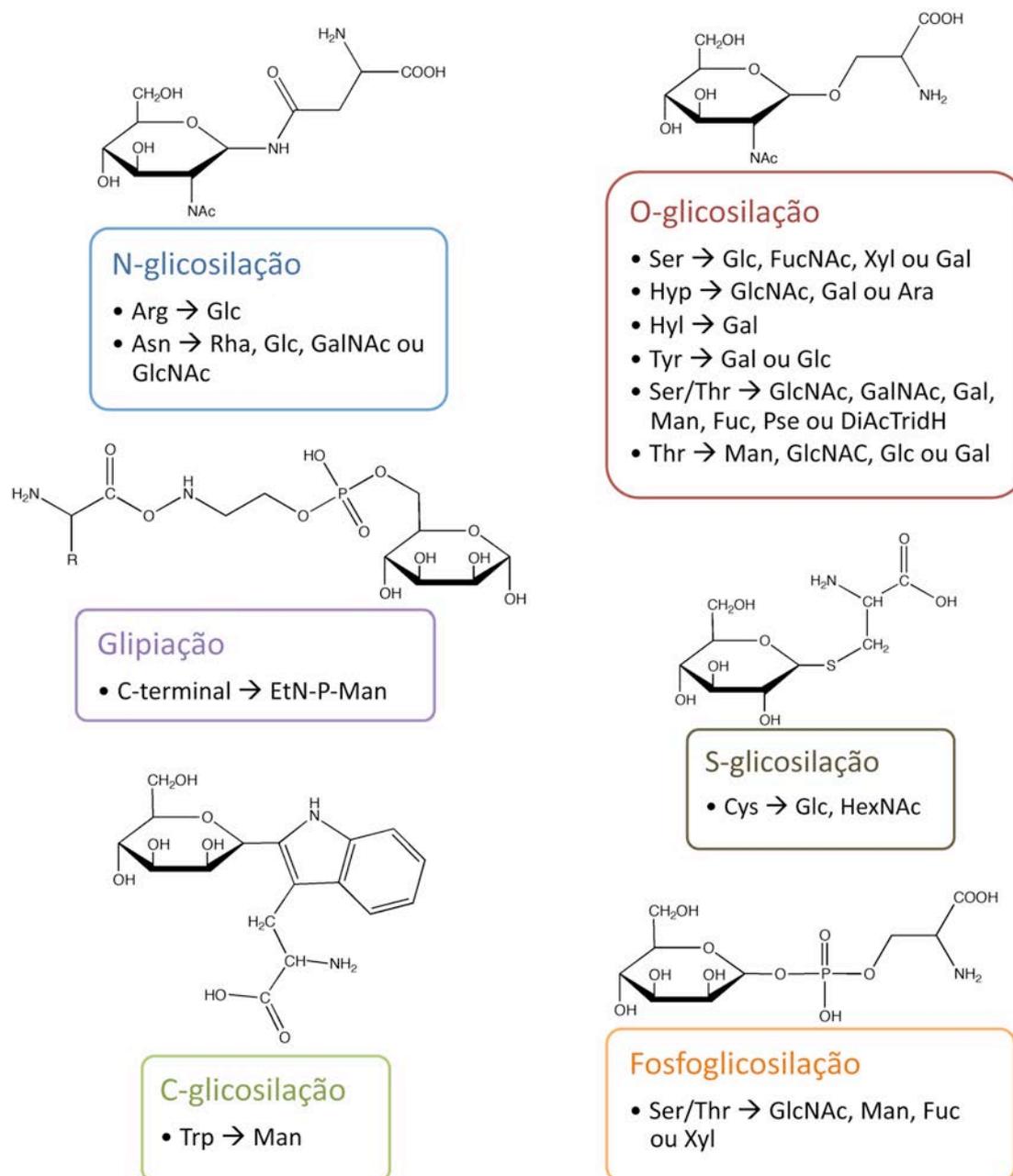
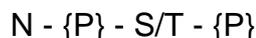


Figura 2: Representação dos tipos de ligações glicosídicas já identificados.

### 1.2.1 N-glicosilação

A N-glicosilação envolve a transferência em bloco do tetradecassacarídeo  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  do carreador dolicol fosfato, na membrana do retículo endoplasmático (RE), para o nitrogênio da cadeia lateral de um aminoácido

acceptor, arginina ou asparagina (Larkin & Imperiali, 2011). No caso da asparagina, resíduo mais comumente envolvido nesta ligação, o resíduo acceptor deve estar contido na seguinte sequência consenso (Marshall, 1972):



- O primeiro resíduo é a asparagina que será glicosilada;
- Na segunda e quarta posições, podem haver quaisquer aminoácidos à exceção da prolina (Bause, 1983);
- O terceiro resíduo pode ser serina ou treonina, sendo que há uma modesta preferência por treonina (Gavel & Von Heijne, 1990).

A montagem da glicana, isto é, da árvore glicídica, começa na face citoplasmática da membrana do RE com a transferência de cada monossacarídeo para o carreador dolicol fosfato, processo este catalizado por uma série de glicosiltransferases da família Alg (*asparagine-linked glycosylation*). A via inicia com adição de dois resíduos de GlcNAc e cinco de manose, formando um heptassacarídeo (GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>). Esta estrutura sofre uma inversão do lado citoplasmático do RE para o luminal, em um processo ainda pouco compreendido (Larkin & Imperiali, 2011), mas potencialmente associado à flipase Rft1 (Helenius *et al.*, 2002). A construção da glicana continua na face luminal, com a adição de quatro manoses e três glicoses terminais, formando o tetradecassacarídeo final GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>. Este, por fim, será transferido para a cadeia lateral da asparagina por um complexo multimérico de atividade oligossacaril transferase (Larkin & Imperiali, 2011) (Figura 3) que reconhece a sequência consenso e a estrutura secundária de *turn* nessa região (O'Connor & Imperiali, 1997; Imperiali *et al.*, 1992). Apesar da estrutura do tetradecassacarídeo ser bem conservada entre eucariotos, várias espécies de protozoários perderam algumas das glicosiltransferases durante a evolução e, por isso, apresentam formas truncadas da glicana (Guha-Niyogi *et al.*, 2001; Parodi, 1993; Samuelson *et al.*, 2005), *e.g.*, em *Trypanosoma cruzi* há a transferência da árvore GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> (Parodi, 1993).

A glicoproteína será então processada por várias glicosidases e glicosiltransferases no RE e no complexo de Golgi e, em decorrência destas modificações, há uma imensa diversidade de glicoconjugados descritos (Helenius

& Aebi, 2001; Larkin & Imperiali, 2011), importantes para inúmeras funções biológicas, como reconhecimento, sinalização, adesão, migração e comunicação celular, resposta imune, resistência a proteases e antigenicidade. Tal importância pode ser evidenciada no fato de que mutações nas etapas de biossíntese de glicanas são causa de um grupo de doenças debilitantes e frequentemente fatais, chamadas de desordens congênitas da glicosilação (Larkin & Imperiali, 2011).

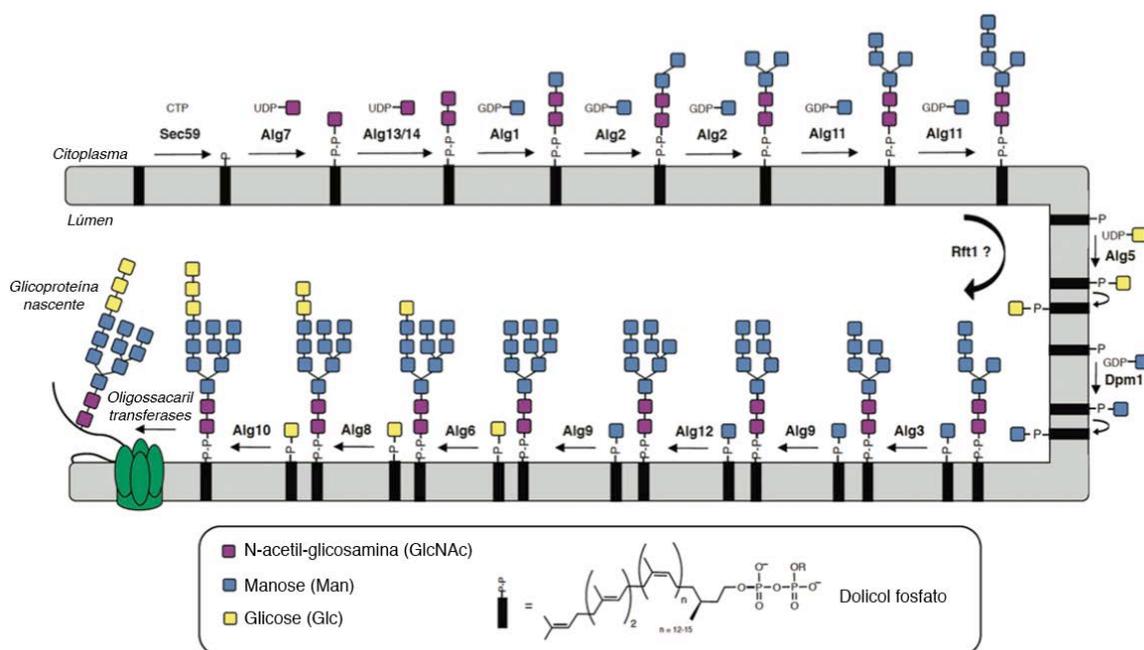


Figura 3: Via da N-glicosilação na membrana do RE em *Saccharomyces cerevisiae*. O processo inicia-se com a adição de monossacarídeos a uma molécula de dolicol fosfato ancorada à face citosólica da membrana do RE. Após a formação do heptassacarídeo  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$ , sua estrutura é revertida ao lúmen do RE e sofre a incorporação de mais sete monossacarídeos. Em seguida, esse oligossacarídeo é transferido para o polipeptídeo nascente, que pode ainda sofrer ciclos de adição e remoção de resíduos de glicose (adaptado de Larkin & Imperiali, 2011).

### 1.2.2 Fosfoglicosilação

Durante os anos 90, um novo tipo de glicoproteínas foi descrito cujos oligossacarídeos são ligados na porção protéica por ligações fosfodiéster, em uma modificação covalente de proteínas que ficou sendo conhecida como fosfoglicosilação (Mehta *et al.*, 1996). Até o presente momento há poucas

informações sobre a síntese e abrangência de organismos com esse tipo de glicosilação. Ela já foi descrita em alguns eucariotos, tais quais parasitas unicelulares e amebas (Haynes, 1998), entretanto ainda se encontra ausente em mamíferos e outros vertebrados, fato que aumenta seu potencial como alvo de novos fármacos (Majumdar *et al.*, 2005). A localização intracelular dessas glicoproteínas varia de acordo com o organismo a qual pertencem, sendo que já foram encontradas em lisossomos, superfície celular e em proteínas secretadas (Haynes, 1998).

A proteinase I de *Dictyostelium discoideum* foi a primeira proteína caracterizada com a ligação fosfodiéster, nesse caso entre uma serina e uma N-acetil-glicosamina ( $\alpha$ -D-Glc<sub>6</sub>NAc-1-PO<sub>4</sub>-Ser). A enzima responsável é a UDP-GlcNAc:Ser-proteína N-acetil-glicosamina-1-fosfotransferase, a qual foi identificada e purificada de membranas da porção trans do complexo de Golgi de *D. discoideum* (Lang *et al.*, 1986; Merello *et al.*, 1995). Quanto a especificidade do substrato, foi descoberto que essa transferase tem preferência por regiões peptídicas com serinas, embora não haja uma sequência consenso, e por regiões com características conformacionais das cisteíno proteinases similares a papaína (Mehta *et al.*, 1997).

Em *T. cruzi*, algumas proteínas, como NETNES e glicopeptídeos reativos ao anticorpo monoclonal WIC29.26, tiveram ligações fosfodiéster caracterizadas, sendo elas Man-1-PO<sub>4</sub>-Ser e Xyl-1-PO<sub>4</sub>-Thr/Ser, respectivamente (Majumdar *et al.*, 2005). Já no gênero *Leishmania*, a fosfoglicosilação é o tipo de glicosilação predominante, envolvendo diversos tipos de moléculas, como a fosfatase ácida secretada, as fosfoproteoglicanas, lipofosfoglicanas e fosfoglicana extracelular hidrofílica, sendo a maioria das ligações descritas como Man-1-PO<sub>4</sub>-Ser (Haynes, 1998; Ilg, 2000; Majumdar *et al.*, 2005). Vários estudos apontam que a fosfoglicosilação nesses parasitas confere resistência a proteinases e inibem a formação de estruturas secundárias além de que, no caso das fosfoproteoglicanas de *Leishmania*, elas são importantes para colonização no hospedeiro intermediário e para sobrevivência em ambiente hostil (Majumdar *et al.*, 2005). Quanto a biossíntese, até hoje só foi caracterizada a enzima Man-1-fosfotransferase de promastigotas de *Leishmania mexicana* na região cis do

complexo de Golgi (Moss *et al.*, 1999). Essa enzima cataliza a transferência de  $\alpha$ -D-Man-1-fosfato para resíduos de serina, preferencialmente flanqueados por aspartato e glutamato (Spiro, 2002).

### 1.2.3 Gliptação

A gliptação é a ligação de uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) ao resíduo C-terminal da proteína. Esta modificação foi caracterizada há quase 30 anos, na glicoproteína variante de superfície de *Trypanosoma brucei* e na Thy-1 de tímócitos de mamíferos (Ferguson *et al.*, 1985; Homans *et al.*, 1988). A âncora de GPI está distribuída amplamente em eucariotos, incluindo protozoários, fungos, plantas, insetos e mamíferos, mas também foi descoberta em archaea (Spiro, 2002; Paulick & Bertozzi, 2008). As proteínas que sofrem essa modificação pós-traducional variam de tamanho, desde 12 aminoácidos até 175 kDa, e possuem diversas funções biológicas, tais como atividade enzimática, interação celular, regulação do sistema complemento, antígenos de mamíferos, proteção e antigenicidade de *Trypanosoma* (Paulick & Bertozzi, 2008). Apesar dessas moléculas apresentarem diferentes funções, o único papel já confirmado do GPI é o ancoramento da proteína em membrana, tornando-a resistente a maioria das proteases e lipases extracelulares (Low & Saltiel, 1988). Contudo, trabalhos empregando experimentos de dicroísmo circular e imunoafinidade sugerem que o GPI é capaz de modificar a conformação da proteína ligada a ele (Butikofer *et al.*, 2001; Barboni *et al.*, 1995). Adicionalmente, estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) e *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) indicam que o GPI influencia a estrutura proteica por interagir diretamente com ela ou por fazê-la interagir com a membrana celular (Homans *et al.*, 1989; Lehto & Sharom, 2002), apontando também para um papel ativo do GPI sobre a estrutura das proteínas gliptadas.

Apesar da vasta distribuição em eucariotos e das diversas estruturas já relatadas, as âncoras de GPI apresentam uma porção glicídica padrão, chamada de núcleo glicídico (*glycan core*), formada por  $\alpha$ -D-Man $p$ -(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man $p$ -(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Man $p$ -(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcN $p$ -(1 $\rightarrow$ 6)-*myo*-inositol (Figura 4) (Paulick & Bertozzi, 2008). As variações entre os GPIs ocorrem nas ramificações desse núcleo, onde podem

ser adicionados resíduos de fosfoetanolamina (ETNP), manose, galactose e ácido siálico, dentre outros açúcares, de acordo com o organismo (Tabela 1). Por exemplo, já foi descrita a ligação de ETNP na segunda ou terceira manose do núcleo em eucariotos superiores, mas não em protozoários. Entretanto, só foi caracterizada uma modificação na glicosamina, que ocorre no NETNES de *T. cruzi* (Paulick & Bertozzi, 2008). Além da grande diversidade na porção glicídica, também há variações no lipídeo, tanto no tipo, que pode ser um diacilglicerol, um alquilacilglicerol ou uma ceramida, quanto no tamanho e saturação, de 14 a 28 átomos de carbono, saturados ou insaturados (Ropert & Gazzinelli, 2000; Paulick & Bertozzi, 2008).

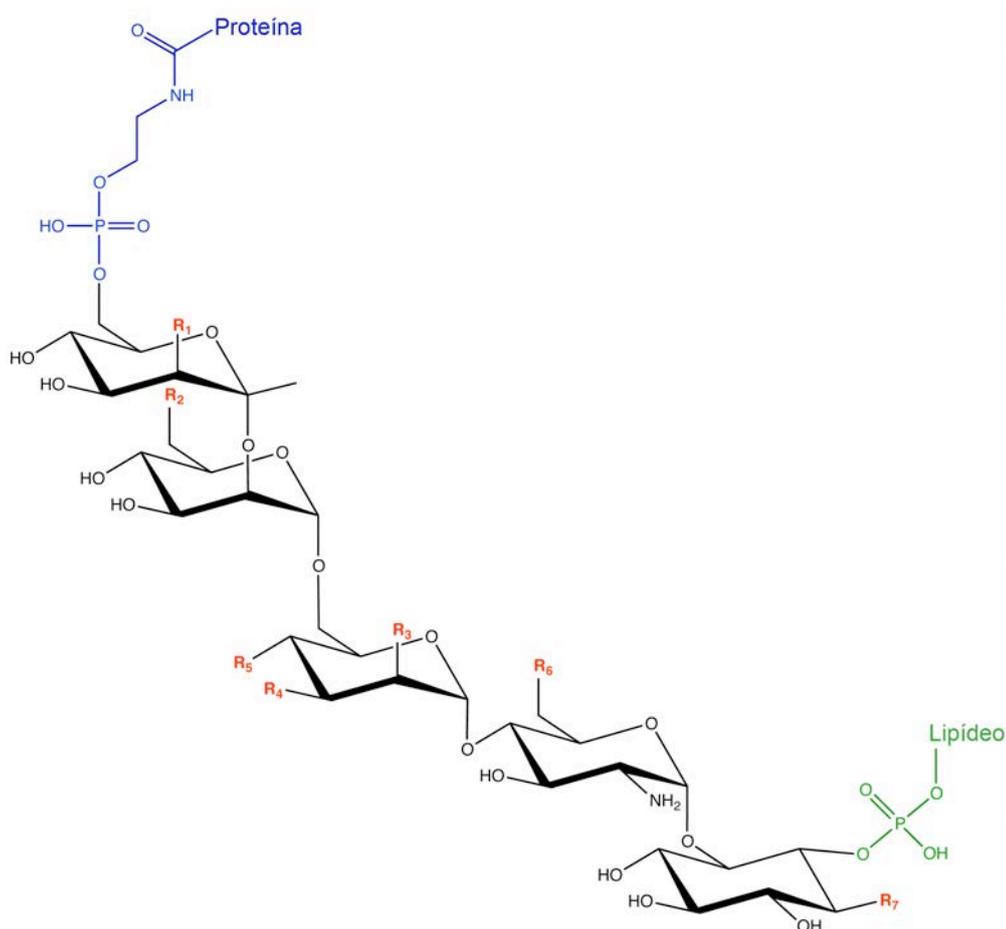


Figura 4: Estrutura glicídica padrão das âncoras de GPI. Em azul a ligação do C-terminal da proteína com a fosfoetanolamina, em verde a ligação do myo-inositol com o fosfolipídeo, e em vermelho as posições com maior variabilidade entre os organismos.

Tabela 1: Estruturas de GPI já descritas, sendo que OH indica quando não há ramificação, e ND não determinada (adaptado de Paulick & Bertozzi, 2008). Os grupos R<sub>1-7</sub> estão definidos na Figura 4.

Organismo	Proteína	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Lipídeo
Humano	AChE eritrócito	OH	ETNP	ETNP	OH	OH	OH	Palmitato	Alk-AG
	CD59 da urina	$\alpha$ -Man	OH	ETNP	OH	$\beta$ -GalNAc	OH	Palmitato	ND
	APase placentar	OH	ETNP	ETNP	OH	OH	OH	OH	Alk-AG
	CD52	$\alpha$ -Man	ETNP	ETNP	OH	OH	OH	Palmitato	DAG
	Dipeptidase de membrana	$\alpha$ -Man	ND	ETNP	OH	$\beta$ -GalNAc ou $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -GalNAc	OH	OH	ND
Rato	Thy-1 cerebral	$\alpha$ -Man	OH	ETNP	OH	$\beta$ -GalNAc	OH	OH	Alk-AG
Camundongo	NCAM músculo esquelético	$\alpha$ -Man	ND	ETNP	OH	$\beta$ -GalNAc	OH	OH	ND
Hamster	Scrapie prion	$\alpha$ -Man	OH	ETNP	OH	NeuAc $\rightarrow$ Gal $\rightarrow$ $\beta$ -GalNAc	OH	OH	ND
Bovino	5'-nucleotidase de fígado	$\alpha$ -Man	ETNP	ETNP	OH	HexNAc	OH	OH	ND
Porco	Dipeptidase de membrana	OH	ETNP	ETNP	OH	$\beta$ -GalNAc, $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -GalNAc ou NeuAc $\rightarrow$ $\beta$ -GalNAc	OH	OH	DAG

Organismo	Proteína	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Lipídeo
Protozoários	VSG de <i>T. brucei</i>	OH	OH	OH	$\alpha$ -Gal-(1→2)- $\alpha$ -Gal-(1→6)- $\alpha$ -Gal	OH	OH	OH	DMG
	IG7 de <i>T. cruzi</i>	$\alpha$ -Man	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Alk-AG
	NETNES de <i>T. cruzi</i>	$\alpha$ -Man	OH	OH	OH	OH	AEP	OH	Alk-AG
	gp63 de <i>L. major</i>	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Alk-AG
Fungos	gp125 de <i>S. cerevisiae</i>	$\alpha$ -Man-(1→2)- $\alpha$ -Man ou $\alpha$ -Man-(1→3)- $\alpha$ -Man	OH	OH	OH	OH	OH	OH	DAG
	PhoAp de <i>Aspergillus fumigatus</i>	$\alpha$ -Man-(1→3)- $\alpha$ -Man	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Cer
	Arabinogalactana de <i>Pyrus communis</i>	OH	OH	OH	OH	$\beta$ -GalNAc	OH	OH	Cer
Amebas	PsA de <i>D. discoideum</i>	$\alpha$ -Man	ND	ND	OH	OH	OH	OH	Cer

A biossíntese da âncora de GPI é bem descrita em mamíferos e leveduras, sendo um processo de aproximadamente 11 etapas (Figura 5), iniciando na face citoplasmática do RE e culminando com o encaminhamento da molécula ancorada para o Golgi, onde sofrerá modificações na estrutura, ou para a membrana celular (Orlean & Menon, 2007). Não foram descritas até o momento as transferases responsáveis pela adição de outros glicídeos, diferentemente das enzimas responsáveis pelas modificações da parte lipídica, envolvendo a remoção da cadeia acila do inositol e a introdução de cadeias mais longas, importantes para associação com os microdomínios de membrana, chamados de *rafts* lipídicas (Paulick & Bertozzi, 2008).

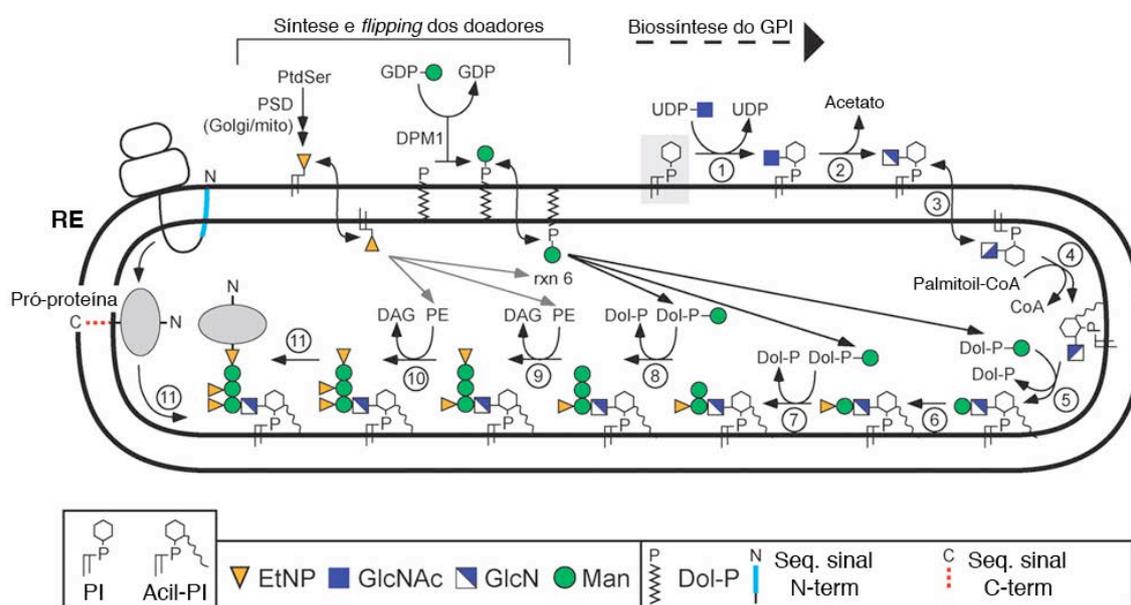


Figura 5: Etapas da biossíntese da âncora de GPI. (1) Transferência de uma N-acetil-glicosamina para o PI por meio da ação de várias enzimas; (2) remoção da N-acetilação da N-acetil-glicosamina pela PIG-L; (3) flipping da molécula da face citoplasmática para face luminal do RE; (4) acilação do inositol pela PIG-W; (5) adição da primeira manose, Man-1, pela PIG-M; (6) adição da ETNP na Man-1 pela PIG-N; (7) PIG-V adiciona a segunda manose, Man-2; (8) a terceira manose, Man-3, é aditada pela PIG-B; (9) PIG-O faz com que Man-3 sofra adição de uma ETNP, a qual será posteriormente ligada a proteína; (10) adição de uma ETNP a Man-2 é feita pela proteína Gpi7; (11) Após a tradução da proteína, a seqüência sinal C-terminal é removida e substituída pela âncora de GPI na face luminal do RE por meio da ação da GPI transamidase (adaptado de Orlean & Menon, 2007).

### 1.3 Fosfolípidos e membrana plasmática

A membrana plasmática é uma importante estrutura celular que define limites, regula o transporte de moléculas e íons, mantém diferenças físico-químicas entre o citosol e a parte extracelular e é importante para comunicação celular. Ela é composta por lipídeos, proteínas, carboidratos e colesterol, sendo que a proporção desses varia de acordo com o tipo de membrana, o que reflete na sua especialização e na diversidade de funções biológicas (Nelson & Cox, 2008; Alberts *et al.*, 2010). No que diz respeito aos seus lipídeos, eles são anfipáticos, isto é, possuem uma porção hidrofóbica (ou cauda apolar) e outra hidrofílica (também chamada de cabeça polar) e por isso, em meio fisiológico, se agregam espontaneamente, formando micelas, lipossomos, vesículas ou bicamadas lipídicas (Figura 6). Nesse último caso, as regiões polares estão voltadas para o ambiente aquoso e a parte apolar de cada camada interage consigo mesmo, mas não com a água (Nelson & Cox, 2008; Alberts *et al.*, 2010).

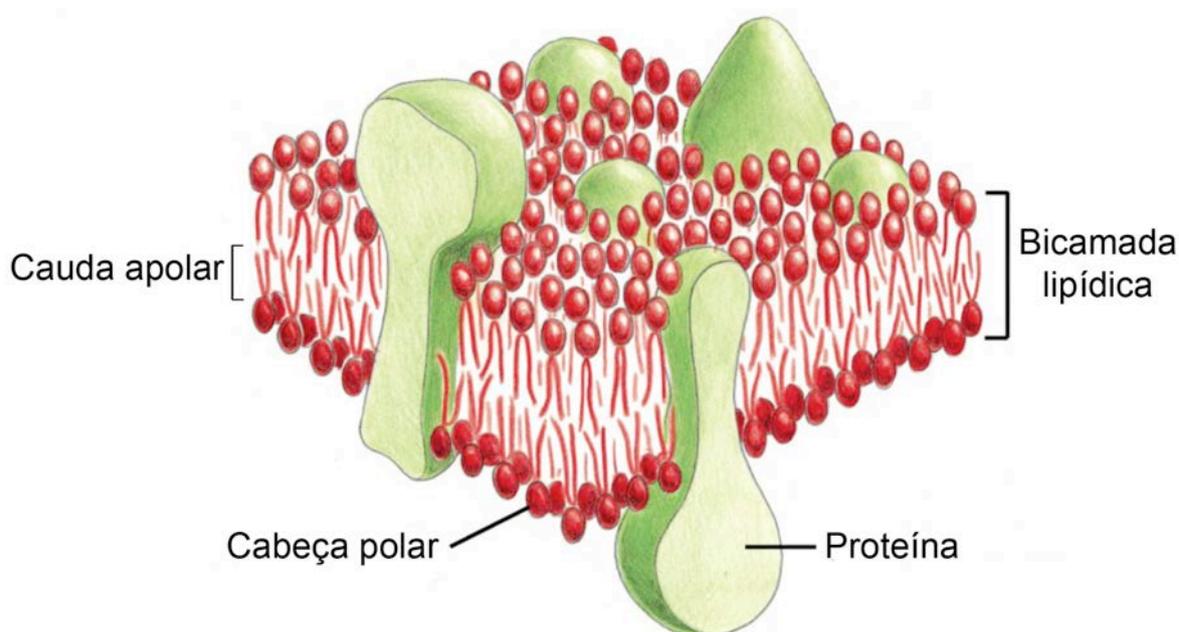


Figura 6: Estrutura representativa de uma membrana plasmática com seus constituintes majoritários (adaptado de Alberts *et al.*, 2010).

Em linhas gerais, existem 5 tipos de lipídeos de membrana (Figura 7): 1) glicerofosfolipídeos; 2) galactolipídeos e sulfolipídeos; 3) lipídeos tetraéter em Archea; 4) esfingolipídeos; e 5) esteróis. Dentre esses, os mais abundantes são

glicerofosfolípídeos e alguns esfingolípídeos, os quais se caracterizam pela presença de uma ligação fosfodiéster, e devido a isso são chamados de fosfolípídeos. O primeiro possui dois ácidos graxos e um grupo altamente polar ou carregado ligados em um glicerol, enquanto que o último tem somente um ácido graxo e o grupo polar ligados a uma esfingosina. Outros esfingolípídeos não possuem fosfato, mas sim açúcares na sua porção polar, sendo subdivididos em: 1) glicolípídeos, quando apresentam carboidratos neutros; e 2) gangliosídeos, quando possuem resíduos de ácido acetilneuramínico (ou ácido siálico), o qual confere uma carga negativa à molécula (Nelson & Cox, 2008; Alberts *et al.*, 2010).

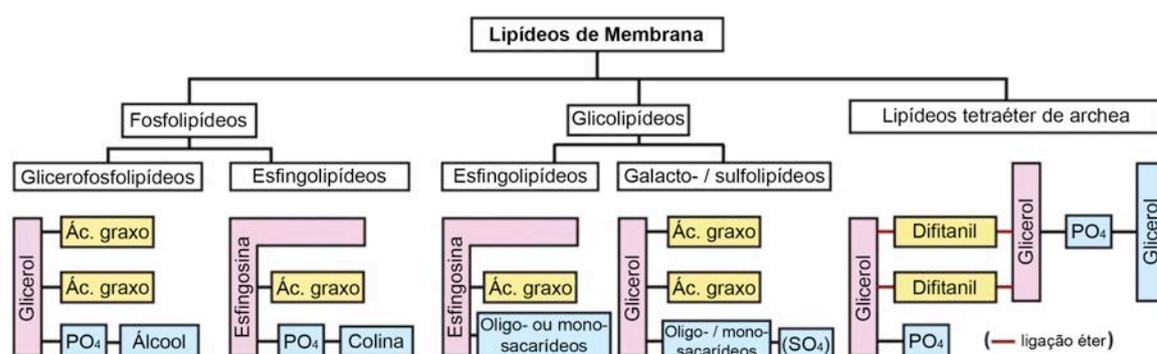


Figura 7: Representação esquemática dos diferentes tipos de lipídeos que podem compor a membrana plasmática (adaptado de Nelson & Cox, 2008).

Esses vários tipos de lipídeos, proteínas e colesterol que compõem a membrana impactam diretamente em sua versatilidade de funções. A sua fluidez, por exemplo, depende da composição lipídica e da temperatura, *e.g.*, caudas apolares curtas ou com insaturações tornam a membrana mais fluida ao promoverem uma diminuição da interação com outras caudas (Fagone & Jackowski, 2009; Alberts *et al.*, 2010). Adicionalmente, a multiplicidade de papéis de membranas envolve uma grande plasticidade na composição da própria bicamada, que pode ter a localização de seus lipídeos modificada ao longo do tempo e de estímulos bioquímicos por movimentos de *flip-flop* e difusão lateral.

Apesar dessa distribuição e movimentação, diferentes lipídeos podem se agrupar transientemente, criando domínios como as balsas lipídicas (*lipid rafts*). Nessas, glicosfingolípídeos, os quais possuem cadeias apolares maiores e saturadas, formam associações estáveis com moléculas de colesterol na camada

externa da membrana (Nelson & Cox, 2008; Alberts *et al.*, 2010). Esses microdomínios são mais espessos e ordenados, ou seja, menos fluidos que o restante da membrana, sendo mais difíceis de serem dissolvidos com detergentes não-iônicos. Ainda, os componentes da balsa lipídica oferecem uma base de associação mais favorável a moléculas como GPI e ácidos graxos longos e saturados, auxiliando na organização de certas proteínas de membrana. Essa segregação dos diferentes tipos de proteínas de membrana é funcionalmente importante, *e.g.*, receptores e proteínas de sinalização geralmente se encontram ou são recrutados para as balsas lipídicas (Nelson & Cox, 2008; Mishra & Joshi, 2007). Além disso a interação de um ligante com uma molécula da balsa induz a coalescência desses microdomínios transientes (Figura 8A), formando plataformas estáveis de sinalização (Figura 8B e 8C) (Rodgers & Zavzavadjian, 2001; Kusumi *et al.*, 2004).

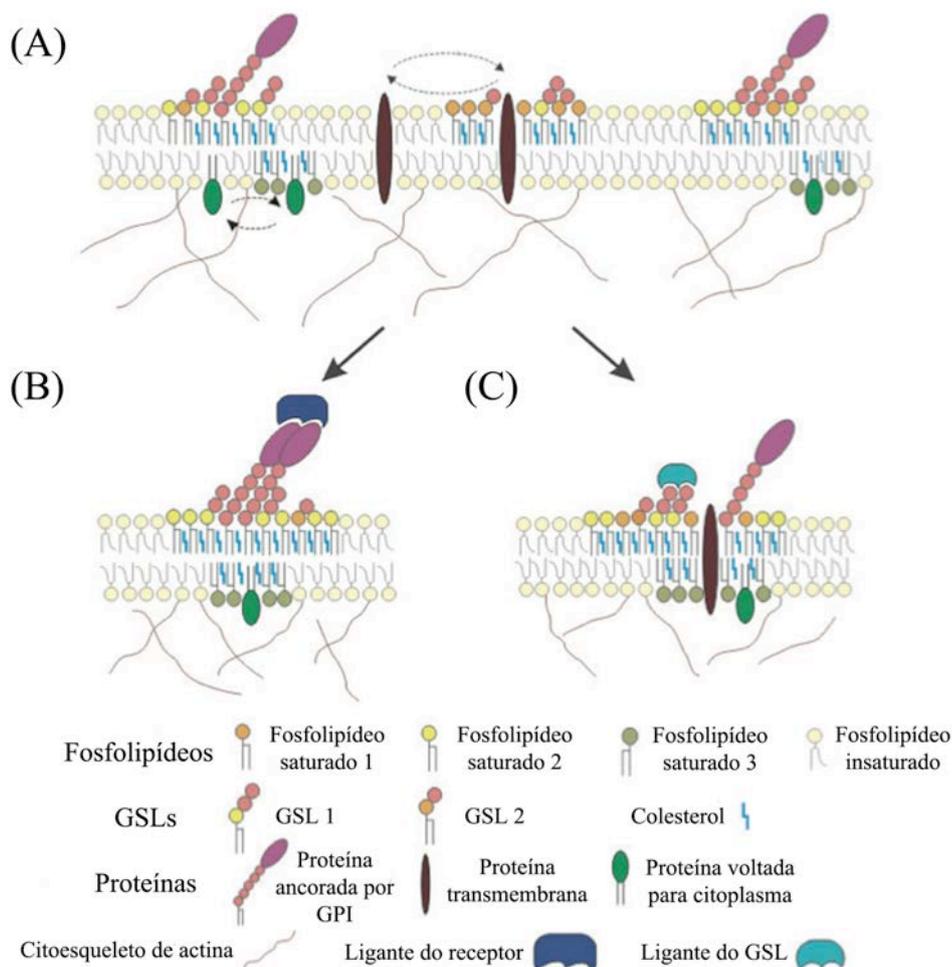


Figura 8: (A) Esquema de microdomínios transitentes de balsas lipídicas, cuja divisão em pequenos compartimentos é auxiliada pelo citoesqueleto de actina, com movimentação de proteínas para dentro e fora da *raft*. A estimulação por um ligante, tanto de receptor proteico (B) quanto de um glicosíngolípídeo (C), leva a coalescência desses microdomínios após a reorganização da actina, aproximando moléculas que estavam em diferentes balsas, ativando uma cascata de sinalização (adaptado de Mishra & Joshi, 2007).

#### 1.4 Importância dos carboidratos em moléculas de superfície celular

A superfície de muitas células são cobertas por uma densa capa de açúcares, provenientes de diferentes tipos de glicoconjugados, cuja porção sacarídica é imensamente variável, não só na composição mas também na quantidade, sendo em alguns casos uma parte substancial da massa de glicoproteínas (Varki *et al.*, 2009; Roseman, 2001). Esses carboidratos possuem

duas classes de funções biológicas (Figura 9): 1) estrutural e modulatória; e 2) interação molecular e reconhecimento por proteínas ligadoras de glicanas (PLGs), tanto endógenas (ou intrínsecas) quanto exógenas (ou extrínsecas) (Varki *et al.*, 2009). Com relação a primeira, podemos exemplificar as funções de proteção (conferida às moléculas presentes na superfície celular), estabilização e organização (Tabela 2) (Varki, 1993). Já no caso de interações moleculares, existem receptores que reconhecem os resíduos terminais das árvores glicídicas dos glicoconjugados, mediando ações de depuração, tráfego intracelular e respostas imunes. No que tange o reconhecimento intrínseco, sabe-se que os carboidratos presentes na superfície celular podem interagir com PLGs ou com outros glicídeos, como é o caso da família das selectinas cuja ligação com ligantes sacarídicos medeia a interação entre células sanguíneas e vasculares em situações normais e patológicas, ou até mesmo o modelo de zíper de carboidratos entre proteoglicanas de superfície de esponjas, favorecendo a agregação celular (Lis & Sharon, 1993; Spillmann & Burger, 1996; Varki *et al.*, 2009).

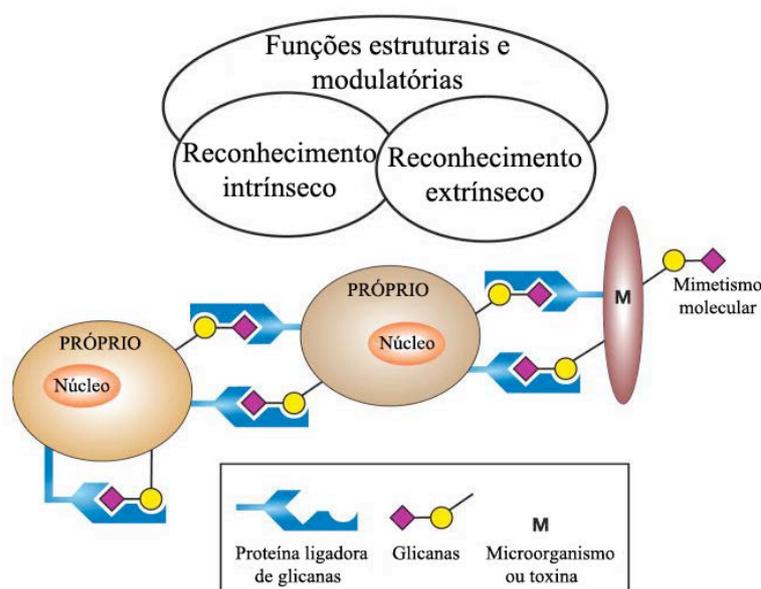


Figura 9: Principais funções das glicanas (adaptado de Varki *et al.*, 2009). Os carboidratos possuem funções estruturais e modulatórias, bem como reconhecimento por proteínas, podendo ser intrínseco (endógena) ou extrínseco (exógena). No primeiro caso, os carboidratos de uma célula são reconhecidos pelas PLGs ou da mesma célula ou de outra, mas do mesmo organismo. Já no

reconhecimento extrínseco, as glicanas de um microorganismo ou de sua toxina são semelhantes às do hospedeiro, interagindo com as PLGs deste ou vice-versa.

Tabela 2: Funções estruturais e modulatórias das glicanas.

Local	Funções
Matriz extracelular	Manutenção da estrutura tecidual, porosidade e integridade Auxílio da organização geral da matriz
Retículo endoplasmático	Correto enovelamento de proteínas Manutenção da solubilidade e conformação proteica
Hormônios e fatores de crescimento	Modulação da atividade de acordo com a extensão e o tipo de glicosilação Armazenamento de fatores de crescimento ligadores de heparina interagindo com glicosaminoglicanos da matriz extracelular, prevenindo sua difusão do sitio de ação
Superfície externa da membrana	Barreira física Proteção, dificultando o reconhecimento do polipeptídeo por proteases ou anticorpos

No contexto de reconhecimento extrínseco, as glicanas podem agir como sítios de ligação para diversos tipos de vírus, bactérias e parasitas, ou como alvos de toxinas de plantas e bactérias. Como consequência, não é incomum que patógenos possuam glicoconjugados em sua superfície, formando uma capa espessa de estrutura glicídicas idêntica ou semelhante a das células do hospedeiro, em uma estratégia chamada de mimetismo molecular que os possibilita evadir o sistema imune (Varki *et al.*, 2009). Além disso, no caso da interação entre hospedeiro intermediário e parasitas, postula-se que haja 3 mecanismos de invasão do epitélio intestinal dos invertebrados após a ingestão

do sangue infectado (Figura 10). O primeiro mecanismo envolve a ligação da glicanas do vetor com a PLG do parasita. No segundo, ocorre o inverso, ou seja, é a PLG do hospedeiro quem reconhece as glicanas presentes em cápsulas glicosiladas ou em glicoproteínas de membrana. Já no terceiro mecanismo, ocorre a interação de múltiplas moléculas de PLGs e glicanas, gerando um efeito de “velcro”, onde inclusive pode haver reconhecimento proteína-proteína para aumentar a adesão (Dinglasan & Jacobs-Lorena, 2005).

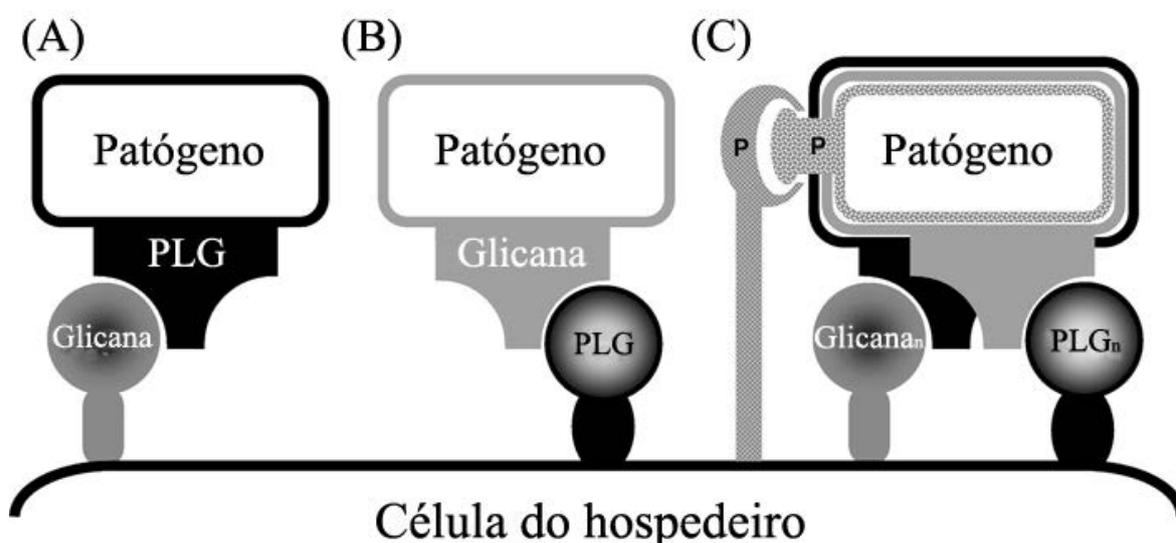


Figura 10: Mecanismos de adesão entre proteína-carboidrato utilizados por alguns patógenos. (A) Interação da PLG do patógeno com a glicana da célula do hospedeiro. (B) Glicana presente em glicoconjugados de membrana de patógenos é ligada a PLG do hospedeiro. (C) Reconhecimento recíproco, ocorrendo diversas interações PLG-glicana. Nesse último caso, pode ocorrer inclusive reconhecimento proteína (P)-proteína (P) (adaptado de Dinglasan & Jacobs-Lorena, 2005).

#### 1.4.1 Glicopeptídeo NETNES de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* é um protozoário parasita, cujo ciclo de vida envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados para o desenvolvimento de seus 4 estágios (Figura 11). A forma epimastigota é encontrada no trato digestivo de triatomíneos. Após esses insetos se alimentarem do sangue de algum animal, eles defecam na região próxima a picada, liberando a forma infectiva do parasita nas fezes,

chamada de tripomastigota metacíclico, as quais irão invadir as células do hospedeiro vertebrado a partir do local da picada. Quando eles entram em contato com o citoplasma, diferenciam-se em amastigotas, fase intracelular replicativa. O acúmulo de amastigotas induz o rompimento celular, quando os protozoários se diferenciam em tripomastigotas e são liberados na circulação sanguínea. Caso um triatomíneo se alimente de um hospedeiro infectado, ele irá ingerir essas formas tripomastigotas (Burleigh & Andrews, 1995).

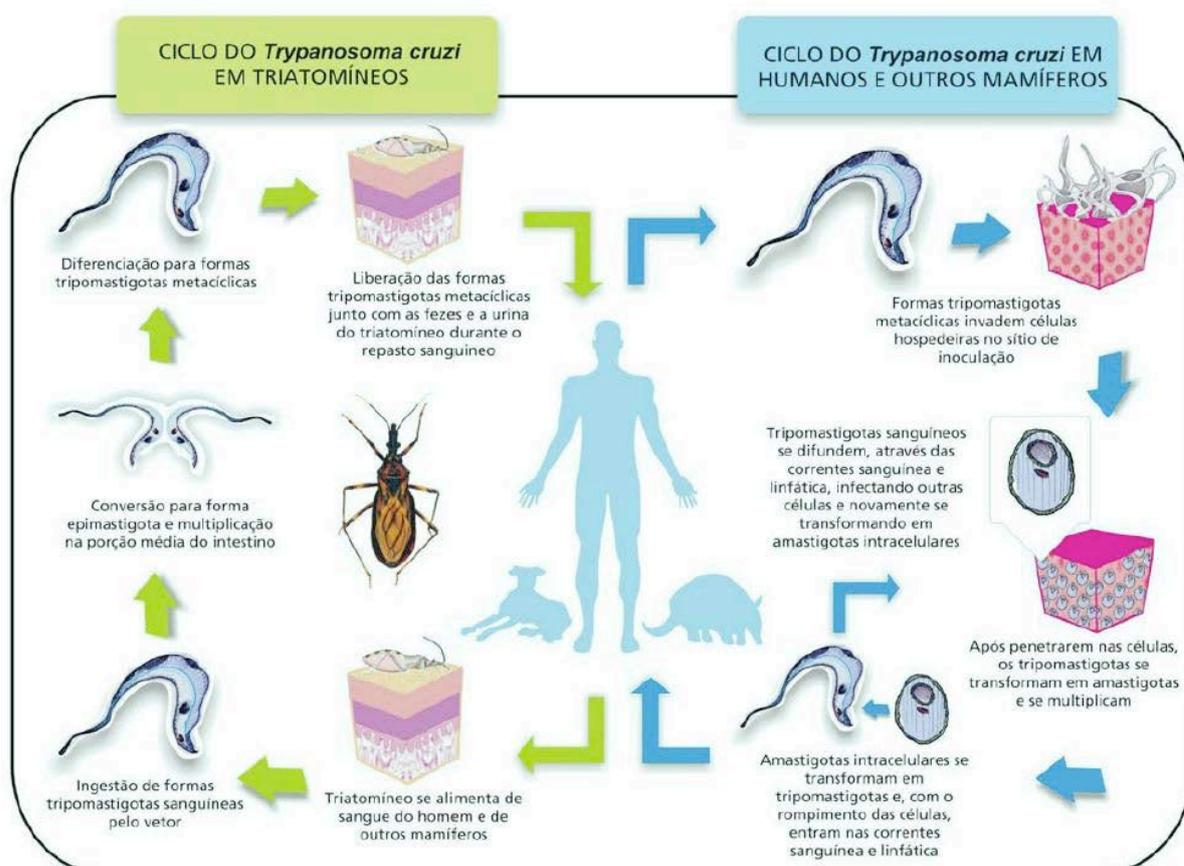


Figura 11: Ciclo de vida do *T. cruzi*. Desenvolvimento e diferenciação dos 4 estágios do *T. cruzi* nos hospedeiros: 1) epimastigota, encontrado nos triatomíneos; 2) tripomastigota metacíclico, forma infectante liberada nas fezes do barbeiro e que invade as células do outro hospedeiro; 3) amastigota, fase replicativa intracelular; 4) tripomastigota, encontrado na circulação sanguínea (Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz).

Nos hospedeiros vertebrados, o *T. cruzi* é o agente causador da Doença de Chagas, cuja distribuição se estende do sul dos Estados Unidos até o sul da

América do Sul (Braz *et al.*, 2011). Apesar do número de infecções ter diminuído, em função de programas de controle de vetores, essa doença ainda afeta cerca de 15 milhões de pessoas na América Latina (Almeida & Gazzinelli, 2001, Rodrigues *et al.*, 2012), sendo um problema para a saúde pública, pois cerca de 20% a 30% dos pacientes em estágio crônico apresentam problemas cardíacos ou gastrointestinais. Além disso, a maioria dos indivíduos afetados estão em uma idade produtiva, caracterizando a Doença de Chagas como uma das mais importantes causas de aposentadoria precoce (Oliveira *et al.*, 2011).

Como já mencionado anteriormente, os carboidratos possuem importantes funções em muitos organismos, como comunicação celular, regulação do sistema complemento, interação celular (Paulick & Bertozzi, 2008). Neste contexto, os parasitas sintetizam diversas estruturas sacarídicas envolvidas na invasão celular e evasão do sistema imune (Mendonça-Previato *et al.*, 2005). Estes glicoconjugados na superfície do *T. cruzi* variam de acordo com seu estágio de desenvolvimento. Na forma epimastigota, há uma cobertura de GIPLs, mucinas e moléculas de menor abundância intercaladas, tais como o NETNES (MacRae *et al.*, 2005).

O NETNES é um glicopeptídeo de baixa abundância, encontrado em epimastigotas. Em 2005, MacRae e colaboradores caracterizaram a composição dessa molécula por espectrometria de massas (MacRae *et al.*, 2005). Contudo, sua estrutura tridimensional e função biológica ainda são desconhecidas.

Esse glicopeptídeo é considerado uma das moléculas mais complexas já descritas em eucariotos. Consiste em um peptídeo de 13 aminoácidos com diversas modificações pós-traducionais, incluindo uma gliptação, duas fosfoglicosilações e uma ou duas N-glicosilações (Figura 12). Além disso, diferente de muitos glicoconjugados de *T. cruzi*, o NETNES não possui resíduos de galactose e, conseqüentemente, de ácido siálico, mas possui manose em abundância, tornando possível a sua interação com lectinas específicas de manose presentes no intestino do vetor (MacRae *et al.*, 2005).

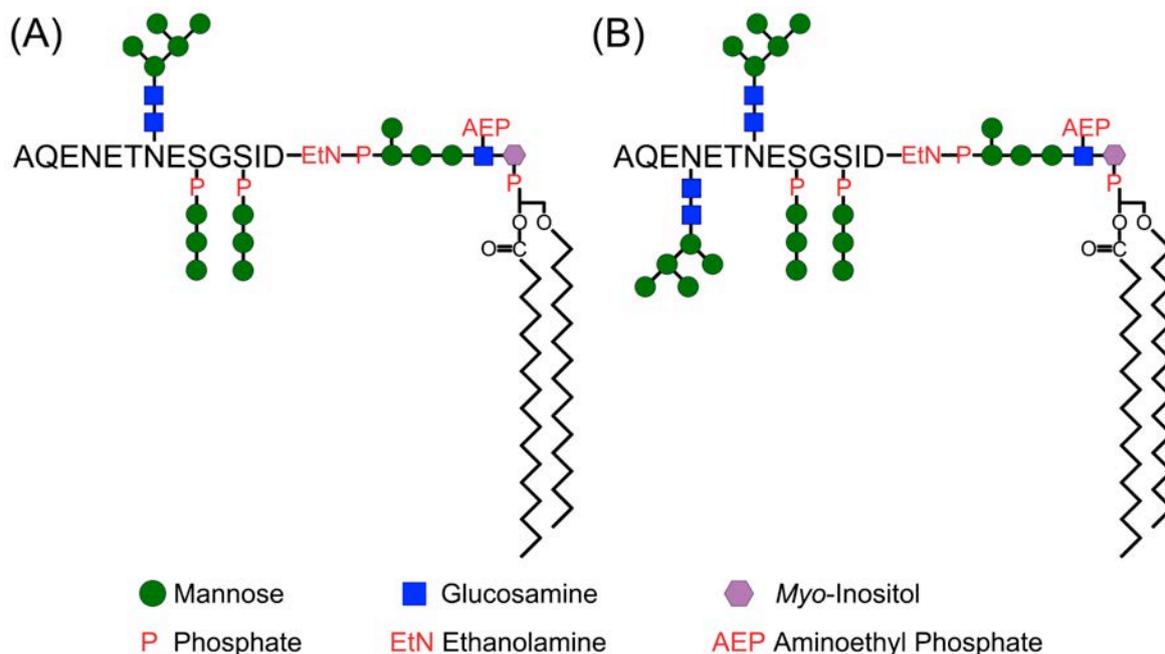


Figura 12: Duas formas de NETNES existentes, (A) com uma N-glicosilação e (B) com duas N-glicosilações (adaptado de MacRae *et al.*, 2005).

### 1.4.2 Gangliosídeos

Gangliosídeos são glicoesfingolípídeos ácidos, propriedade esta decorrente da presença, em sua cabeça polar, de resíduos ácido siálico, além de outros carboidratos, fazendo com que essas moléculas sejam muito polares (Cantù *et al.*, 2011). O termo ácido siálico refere-se a todos os derivados do ácido neuramínico presentes nos gangliosídeos: 5-N-acetil-, 5-N-acetil-9-O-acetil- e 5-N-glicolil-neuramínico. Em humanos saudáveis, o derivado mais abundante é o 5-N-acetil (Yu & Ledeen, 1972). Já o 5-N-acetil-9-O-acetil- foi encontrado em cérebro de camundongos (Chigorno *et al.*, 1982, Ghidoni *et al.*, 1980), e o 5-N-glicolil- em casos de câncer de mama (Marquina *et al.*, 1996).

Em função de alta variabilidade da porção sacarídica dos gangliosídeos, Svennerholm criou designações mais simples para essas moléculas (Svennerholm, 1980), utilizadas até hoje. De acordo com essa nomenclatura, utiliza-se (Figura 13):

- Letra G: para gangliosídeo
- Letras M, D, T: considerando o número de ácidos siálicos presente na estrutura (mono, di ou tri)

- Números 1, 2 ou 3: de acordo com a sequência oligossacarídica, sendo:
  - 1 para Gal-GalNAc-Gal-Glc
  - 2 para GalNAc-Gal-Glc
  - 3 para Gal-Glc
- Letras a, b ou c: referente a localização do ácido siálico, para diferenciar as moléculas.

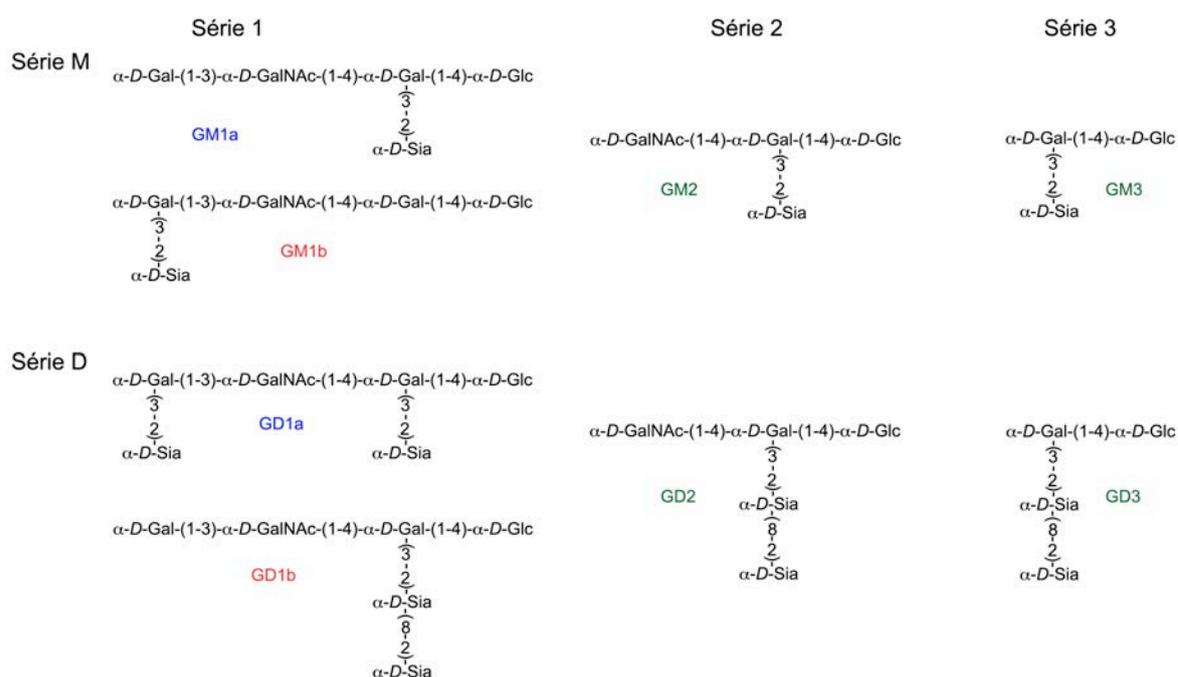


Figura 13: Esquema ilustrando a nomenclatura de Svennerholm para gangliosídeos.

Os gangliosídeos estão presentes em todas as células de mamíferos, predominantemente localizados em microdomínios na camada externa da membrana plasmática (DeMarco & Woods, 2009), e particularmente abundantes no sistema nervoso (Cantù *et al.*, 2011). Estão envolvidos em interações da célula com o meio extracelular, desempenhando importantes funções biológicas como neurodiferenciação, sinaptogênese e transmissão sináptica (Mandal & Pettegrew, 2004). Além disso, a presença de anticorpos contra alguns gangliosídeos é a causa de várias doenças autoimunes (Tabela 3), e há diversos estudos demonstrando sua participação em processos relacionados a outras patologias, agindo como alvos e facilitando a entrada de vírus, tais como influenza, vírus da

imunodeficiência humana e rotavírus (Suzuki *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999; Hug *et al.*, 2000), além de toxinas bacterianas, como as de *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Neisseria gonorrhoeae* (Eidels *et al.*, 1983; Bernardi *et al.*, 2002). Nesse contexto, torna-se importante compreender a complexidade estrutural dos gangliosídeos, seu metabolismo, topologia celular, funções biológicas, implicações patológicas, interação proteína-carboidrato, bem como desenvolvimento de fármacos (Zhang & Kiechle, 2004; Sonnino *et al.*, 2006).

Tabela 3: Doenças autoimunes relacionadas aos gangliosídeos (adaptado de Zhang & Kiechle, 2004).

Neuropatia Periférica	Anticorpos anti-gangliosídeos	Sintomas
Síndrome de Guillain-Barré	Anti-GM1, anti-GM2, anti-GQ1b	Fraqueza progressiva dos membros, arreflexia
Neuropatia motora multifocal	Anti-GM1	Fraqueza motora com leve atrofia muscular
Síndrome de Miller-Fisher	Anti-GQ1b	Oftalmoplegia, ataxia, arreflexia
Neuropatia atáxica idiopática crônica	Anti-GM3, anti-GD1b, anti-GD3, anti-GQ1b	Perda de cinestesia e ataxia

### **1.5 Métodos experimentais para caracterização da estrutura tridimensional de glicoconjugados ancorados em membranas**

Como mencionado anteriormente, os carboidratos são moléculas muito flexíveis e polares, apresentando um alto grau de coordenação com moléculas de água e poucas ou até inexistência de interações interresíduo dipolares ou lipofílicas fortes (Woods, 1998). Essas características acabam dificultando a obtenção da estrutura tridimensional de glicoconjugados pela técnica de cristalografia de raios-X (Petrescu *et al.*, 2006), pois a grande flexibilidade das

glicanas compromete a obtenção de um mapa de densidade eletrônica adequado. De fato, em uma pesquisa realizada no *Protein Data Bank* (PDB), foi visto que cerca de um terço dos modelos que continham oligossacarídeos possuíam erros na estereoquímica e na nomenclatura do carboidrato (Lütteke *et al.*, 2004; Crispin *et al.*, 2007). Tais dificuldades são ampliadas no caso de glicoconjugados acoplados à membrana celular. Nesse caso, utilizando a técnica de cristalografia de raios-X, a proteína precisa ser solubilizada com moléculas de detergente ou utiliza-se moléculas, tais como anticorpos monoclonais, para aumentar a superfície hidrofílica disponível, porque geralmente são essas regiões que fazem os contatos nos cristais (Loll, 2003; Caffrey, 2003). Este processo, em contrapartida, é capaz de modificar a conformação da molécula em relação a seu estado nativo.

Como as glicanas possuem diversas conformações coexistindo em solução, sem possuir uma única forma tridimensional (Woods, 1998), o emprego de técnicas de RMN e obtenção de sinais de *Nuclear Overhauser Effect* (NOE) é usualmente a metodologia mais adequada para caracterizar a estrutura tridimensional de carboidratos. Existem, porém, três grandes problemas: 1) são necessários pelo menos três sinais de NOE interresíduo para a definição conformacional da ligação glicosídica, o que frequentemente não é alcançado; 2) as distâncias caracterizadas pelos sinais de NOE, de cerca de 4 Å a 5 Å, restringem-se a distâncias intramoleculares ou na região da ligação glicosídica, dificultando a caracterização da estrutura sacarídica como um todo; 3) os dados de NOE correspondem a propriedades conformacionais médias para as moléculas estudadas, visto que a escala de tempo da medição varia de 50 ms a 1 s (Woods, 1998; Wormald *et al.*, 2002), de forma que as conformações obtidas podem se configurar como artefatos, médias de estados conformacionais existentes em solução.

Observa-se, assim, que a caracterização da estrutura e conformação de carboidratos é um grande desafio experimental, e novas técnicas ou abordagens fazem-se necessárias de forma a permitir que nosso entendimento estrutural destas moléculas possa avançar ao estágio em que compreendemos as proteínas.

## 1.6 A dinâmica molecular (DM) como ferramenta para descrição conformacional de biomoléculas

As simulações de DM, que consistem na computação do movimento dos átomos de uma molécula, são ferramentas promissoras para a descrição estrutural e conformacional de carboidratos e glicoconjugados em solução (van Gunsteren & Mark, 1992; Pol-Fachin & Verli, 2011). Essa metodologia vem sendo empregada no estudo de biomoléculas desde a década de 1970 (McCammon *et al.*, 1977) e, hoje, encontra-se amplamente difundida, sendo utilizada, por exemplo, em estudos de caracterização de interações moleculares (Ponder & Case, 2003), enovelamento e desenovelamento (Daura *et al.*, 1998) e mudanças no comportamento de proteínas glicosiladas e não-glicosiladas (Fernandes *et al.*, 2010; Pol-Fachin & Verli, 2012).

Basicamente, as simulações de DM resolvem a equação do movimento de Newton para todos os átomos do sistema:

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i}$$

Nessa equação,  $d^2 r_i/dt^2$  representa a aceleração de uma partícula  $i$ , cuja massa é  $m_i$ , quando se aplica uma força  $F_i$  sobre ela em um instante de tempo  $t$ . A trajetória do movimento dos átomos e moléculas é obtida quando essa integração é resolvida sobre todas as partículas do sistema em uma sucessão de instantes  $t$  (Leach, 2001). No entanto, somente isso não é possível para determinar o módulo e a direção da força  $F_i$  sobre os átomos do sistema, nem sua relação com as características químicas de cada molécula em estudo (Leach, 2001). Para tal, há a necessidade de uso do denominado campo de força.

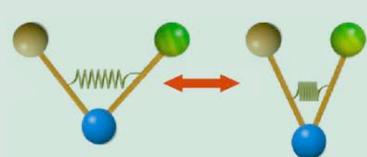
O campo de força pode ser definido como um conjunto de funções e parâmetros usados em cálculos de mecânica molecular (de Sant'Anna, 2002). Estas funções (Figura 14) definem as energias associadas a interações ligadas e não-ligadas, como estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação e diedros de uma molécula quando comparadas com a sua conformação não tensionada, isto é, de equilíbrio (aquela caracterizada pelos valores-padrão de

comprimentos e de ângulos de ligação), forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Nesse contexto, os campos de força expressam o somatório das funções de energia potencial de cada átomo e calculam a energia dos sistemas em função das posições dos núcleos dos átomos (Leach, 2001).

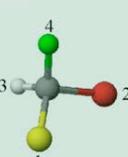
$$V(\vec{r}(t)) = V^{físicas}(\vec{r}(t)) + V^{especiais}(\vec{r}(t))$$

$$V^{físicas}(\vec{r}(t)) = V^{Ligação}(\vec{r}(t)) + V^{\hat{A}ngulo}(\vec{r}(t)) + V^{DiedroImpróprio}(\vec{r}(t)) + V^{DiedroPróprio}(\vec{r}(t)) + V^{LJ}(\vec{r}(t)) + V^{CRF}(\vec{r}(t))$$

$$V^{Ligação}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{4} \sum_{ligação} K_l [l^2(t) - l_0^2]^2$$


$$V^{\hat{A}ngulo}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{2} \sum_{\hat{a}ngulo} K_{\theta} [\cos(\theta(t)) - \cos(\theta_0)]^2$$


$$V^{DiedroPróprio}(\vec{r}(t)) = \sum_{diedro\ próprio} K_{\phi} [1 + \cos(\delta) \cos(m\phi(t))]$$


$$V^{DiedroImpróprio}(\vec{r}(t)) = \frac{1}{2} \sum_{diedro\ impróprio} K_{\xi} [\xi(t) - \xi_0]^2$$


$$V^{LJ}(\vec{r}(t)) = \sum_{\substack{pares \\ (i,j)}} \left[ \frac{C_{12}(i,j)}{r_{ij}^{4D}(t)^{12}} - \frac{C_6(i,j)}{r_{ij}^{4D}(t)^6} \right]$$

$$V^{CRF}(\vec{r}(t)) = \sum_{\substack{pares \\ (i,j)}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_1} \left[ \frac{1}{r_{ij}^{4D}(t)} - \frac{C_{rf} r_{ij}^{3D}(t)^2}{2R_{rf}^3} - \frac{1 - \frac{1}{2}C_{rf}}{R_{rf}} \right]$$

$$V^{especiais}(\vec{r}(t)) = V^{PositionRestr}(\vec{r}^{3D}(t)) + V^{DistanceRestr}(\vec{r}(t)) + V^{DihedralRestr}(\vec{r}^{3D}(t)) +$$

$$V^{J-CouplRestr}(\vec{r}^{3D}(t)) + V^{LocalElevation}(\vec{r}^{3D}(t)) + V^{4thDRestr}(\vec{r}^{4thD}(t))$$

Figura 14: Funções de energia que compõe campos de força GROMOS96. De cima para baixo estão representadas as equações que descrevem: o campo de força, as interações físicas (como estiramento de ligações químicas, ângulos de ligação, diedros e pares não ligados) e as especiais (as quais são utilizadas em propósitos particulares). Os pares não ligados englobam as interações intermoleculares eletrostáticas, ou Coulômbicas (CRF), e de van der Waals,

também conhecidas como potencial de Lennard-Jones (LJ) (adaptado de Sachett, 2011 e Scott *et al.*, 1999).

Existem diversos campos de força disponíveis para simulações de DM, sendo a maioria parametrizado para o estudo de proteínas, destacando-se AMBER (Weiner *et al.*, 1984), CHARMM (MacKerell *et al.*, 1998), CVFF (Kitson & Hagler, 1988), TRIPOS (Clark *et al.*, 1989), OPLS (Jorgensen *et al.*, 1988) e GROMOS96 (van Gunsteren *et al.*, 1996). No entanto, no caso de carboidratos, a presença de diversos grupos altamente polares, a elevada flexibilidade e as diferenças nas propriedades eletrônicas que podem ocorrer durante modificações conformacionais dificultam sua parametrização (Pérez *et al.*, 1998). Portanto, somente nos últimos 15 anos, houve atualizações para inclusão de parâmetros de carboidratos nesses campos de força (Kirschner *et al.*, 2008; Pol-Fachin *et al.*, 2012; Lins & Hünenberger, 2005; Senderowitz *et al.*, 1996; Ott & Meyer, 1996; Glennon *et al.*, 1994), e, ainda hoje, há espaço para o refinamento desses.

Nesse sentido, o Grupo de Bioinformática Estrutural vem se dedicando ao desenvolvimento e uso de estratégias computacionais para a descrição e caracterização de carboidratos e glicoconjugados, empregando o campo de força GROMOS96. Um aspecto importante neste conjunto de procedimentos se deve ao fato de que este campo de força é do tipo átomo unido, isto é, somente os hidrogênios polares (mais os átomos de hidrogênio ligados a anéis aromáticos) estão explícitos, reduzindo o custo computacional. A partir dos protocolos desenvolvidos pelo grupo, foi possível a reprodução conformacional de moléculas, como heparina (Verli & Guimarães, 2004),  $\alpha$ -fucanas e  $\alpha$ -galactanas de ouriço-do-mar (Becker *et al.*, 2007), exopolissacarídeos (Pol-Fachin *et al.*, 2010) e saponinas (Pedebos *et al.*, 2012), dentre outros.

Embora o desenvolvimento e aprimoramento de campos de força para carboidratos estejam crescendo gradativamente nos últimos anos, a adequação desses parâmetros ao estudo de glicoconjugados, tais como glicoproteínas, ainda encontra-se bastante incipiente. O principal campo de força capaz de descrever a conformação de glicoproteínas e polissacarídeos é o GLYCAM (Kirschner *et al.*, 2008) do AMBER (Case *et al.*, 2005), que consiste em uma plataforma paga e de alto custo computacional. Nesse contexto, o aprimoramento de campos de força,

tornando-os capazes de gerar maior amostragem e possuindo parâmetros que abrangem grande parte dos diversos monossacarídeos existentes, pode apresentar significativo impacto na área de glicobiologia estrutural.

Uma das grandes limitações da DM se refere ao elevado custo computacional necessário para a produção de simulações capazes de descrever o comportamento molecular em escalas de tempo compatíveis com fenômenos biológicos. Usualmente, estamos limitados a escalas de tempo próximas de microssegundos, e este tempo se reduz conforme o tamanho do sistema em estudo aumenta. Desta forma, há a necessidade de métodos adicionais, capazes de aumentar a amostragem de simulações por DM e, assim, aumentando nossa capacidade de modelar fenômenos reais em solução. Dentre os diversos métodos capazes de aumentar a amostragem de simulações, mencionaremos, no contexto da presente dissertação, a metadinâmica. Esse método é uma combinação das idéias da dinâmica de *coarse-grained*, em um espaço delimitado por um conjunto de variáveis, e da introdução de um viés história-dependente (*history dependent bias*, viés este definido sobre variáveis configuracionais no sistema em estudo). Esses dois ingredientes são essenciais para a metodologia e precisam estar combinados para uma determinação precisa da superfície de energia livre. Com a definição de algumas variáveis, simplifica-se enormemente a complexidade do sistema, e o viés previne a revisitação de regiões já exploradas e encoraja a exploração eficiente da superfície de energia livre (Laio & Parrinello, 2002).

A metadinâmica, a partir da identificação preliminar de determinadas variáveis, pode ser usada para reconstruir a superfície de energia livre e para acelerar eventos raros. O princípio da técnica pode ser explicado usando a analogia de uma pessoa presa, no escuro, dentro de um buraco, sem fundo plano, cujas paredes são muito íngremes para escalar, e a escuridão dificulta a localização da porção mais rasa. Em uma DM normal a pessoa faria uma caminhada aleatória com viés na direção da menor energia livre, mas com pouca probabilidade de explorar regiões de transição, ou seja, com poucas chances de achar a parte mais rasa. Já no caso da metadinâmica, é como se a pessoa tivesse uma grande quantidade de areia disponível para depositar na sua posição atual até cobrir toda aquela região, fazendo com que ela comece a explorar

regiões mais altas, inclusive outros buracos (outros mínimos de energia), até que esteja suficientemente cheio para sair (Figura 15). Assim a pessoa consegue fazer uma reconstrução da imagem e topologia (energia livre) do local onde estava (Laio & Gervasio, 2008).

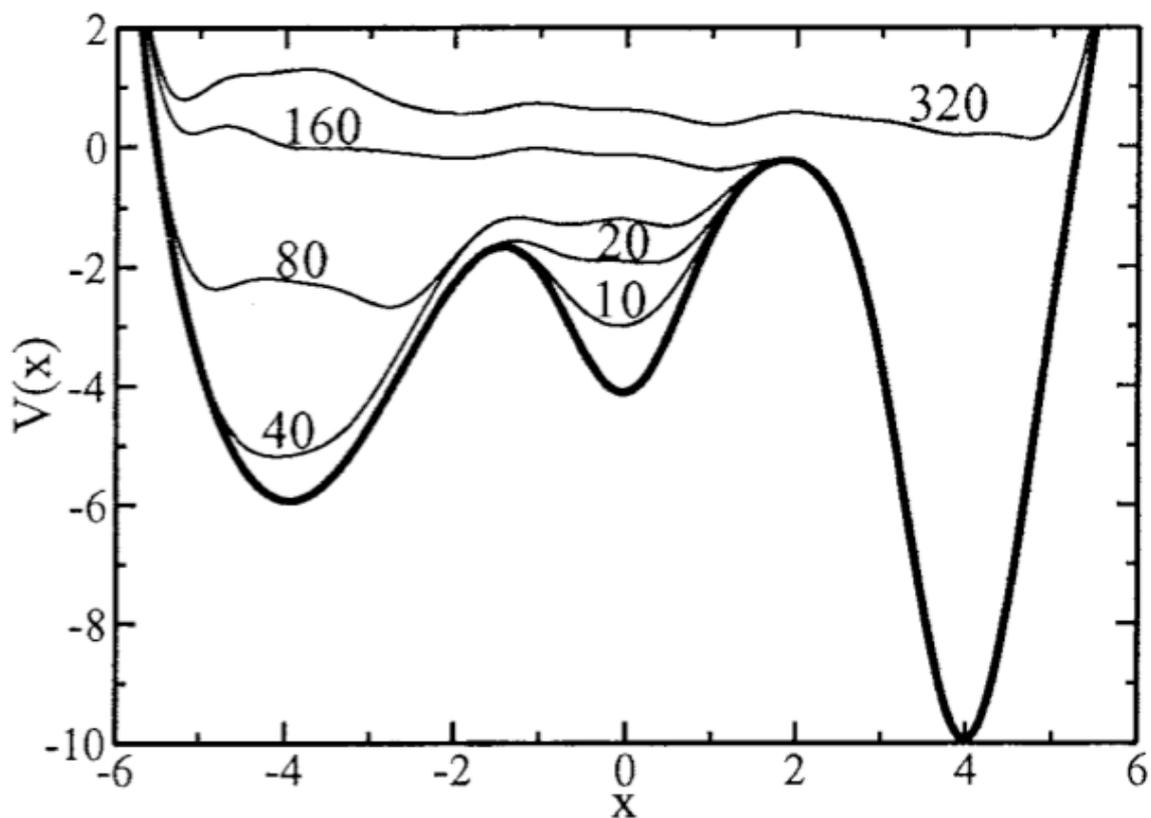


Figura 15: Exploração da superfície de energia livre,  $V(x)$ , de acordo com uma variável,  $x$ , pelo método de metadinâmica. O potencial de início (linha mais grossa) possui 3 mínimos, e a dinâmica começa no segundo deles ( $x = 0$ ). A evolução (marcada pelas linhas mais finas) mostra que, depois de 20 passos, o sistema escapou daquela região de mínimo e foi explorar outra, e, após 160 passos, ela alcançou o último vale. (Laio & Parrinello, 2002).

## 2 Objetivos

Em função do exposto, o presente trabalho visa contribuir no entendimento da glicobiologia estrutural de glicoconjugados acoplados à membrana. Para tal, foram selecionados o glicopeptídeo NETNES e os gangliosídeos GM1, GD1b e GT1b. E as seguintes metas foram estabelecidas:

- Construir modelos tridimensionais para o NETNES em sua forma completa, ancorada à membrana através de uma âncora de GPI;
- Construir e validar, em relação a dados prévios de RMN, a estrutura da âncora de GPI ligada ao NETNES;
- Construir e validar, em relação a dados prévios de RMN, a estrutura dos gangliosídeos selecionados;
- Caracterizar a dinâmica da membrana de fosfatidilcolina (POPC) na presença e na ausência de GPI e NETNES;
- Caracterizar a estrutura e dinâmica do glicopeptídeo NETNES ancorado em membrana;
- Caracterizar a estrutura e dinâmica dos gangliosídeos selecionados em solução;
- Avaliar a metodologia e comparar os dados teóricos obtidos por dois campos de força diferentes, GROMOS96 e GLYCAM, para descrição dos gangliosídeos.

## 3 Metodologia

### 3.1 Programas utilizados

Diversas metodologias de modelagem molecular foram utilizadas no presente trabalho, incluindo mecânica molecular (MM), DM e métodos *ab initio*. Os protocolos referentes a cada um destes métodos estão descritos em detalhes a seguir.

Os programas utilizados ao longo do trabalho incluem:

- Ferramentas de visualização de moléculas: VMD v1.9.1 (Humphrey *et al.*, 1996), PyMol v1.4 (DeLano, 2002) e MOLDEN (Schaffenaar & Noordik, 2000);
- Programa para cálculo *ab initio*: GAMESS-UK (Schmidt *et al.*, 1993);
- Programa para construção de mapas de contorno, metadinâmica e simulações de dinâmica molecular: GROMACS v4.5.1 (van der Spoel *et al.*, 2005), GROMACS v4.5.4 (van der Spoel *et al.*, 2005), PLUMED (Bonomi *et al.*, 2009) e SigmaPlot 11.0;
- Programa para geração de topologias: PRODRG *Beta* v2.5 (Schüttelkopf & van Aalten, 2004); *Online Carbohydrate Builder* (Woods Group, 2005); ACPYPE (Sousa da Silva & Vranken, 2012)
- Programas para análise da espessura da membrana: GRIDMAT-MD (Allen *et al.*, 2009).

### 3.2 Nomenclatura e definições

As recomendações da IUPAC (IUPAC, 1996) de nomenclatura, simbologia, numeração dos átomos e definição da ligação glicosídica foram utilizadas para todos os dissacarídeos estudados. Quanto aos gangliosídeos, foram utilizadas as definições de Svennerholm (Svennerholm, 1980).

Os tipos de ligação entre dois monossacarídeos são do tipo  $1 \rightarrow X$ , onde X pode ser 2, 3, 4 ou 6. Especificamente para o ácido siálico, as ligações abordadas nesse trabalho foram do tipo  $2 \rightarrow Y$ , onde Y foi 3 ou 8. A orientação relativa destas ligações glicosídicas foi descrita por dois ou três diedros (Figura 16), a saber:

$$\phi = \text{O5-C1-OX-CX} \text{ ou } \text{O6-C2-OY-CY}$$

$$\psi = \text{C1-OX-CX-C(X-1)} \text{ ou } \text{C2-OY-CY-C(Y-1)}$$

Para as ligações (1 → 6) e (2 → 8), há mais uma definição de diedro:

$$\omega = \text{O6-C6-C5-C4} \text{ ou } \text{O8-C8-C7-C6}$$

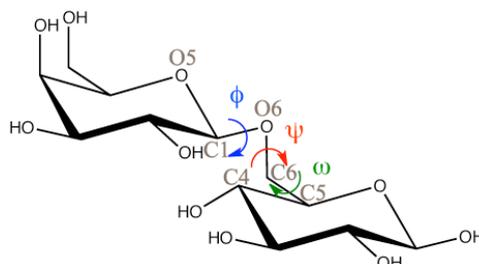


Figura 16: Representação dos diedros das ligações glicosídicas.

### 3.3 Cálculos utilizando métodos *ab initio*

Uma importante etapa na parametrização de campos de força de mecânica molecular é a obtenção de cargas atômicas para as moléculas em estudo. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisas vem aplicando, com sucesso, um procedimento baseado em cargas atômicas de Löwdin, obtidas por cálculos Hartree Fock, na descrição conformacional de polissacarídeos sulfatados (Verli & Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005) e monossacarídeos componentes de glicanas (Becker, 2007).

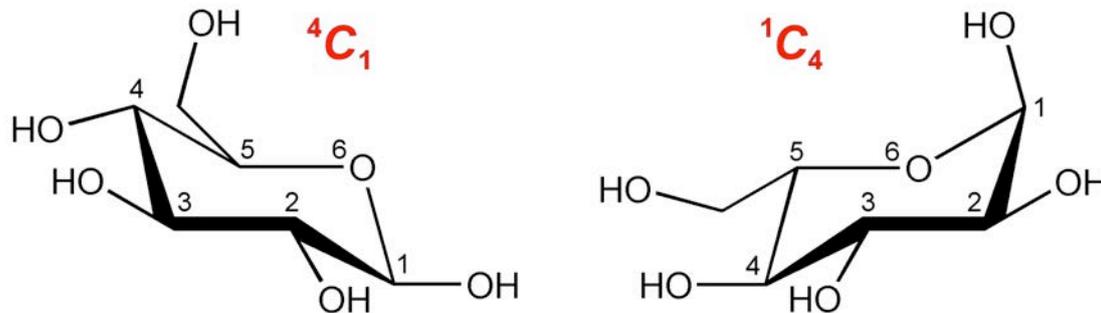
Tendo-se em vista o elevado custo computacional associado aos métodos *ab initio*, as moléculas utilizadas para a obtenção destas cargas atômicas foram simplificadas para incluírem somente os resíduos em suas formas isoladas e aqueles envolvidos nas ligações fosfodiéster, os quais são:  $\alpha$ -D-Man-(1→O)-metil-fosfato, metil-ETNP-(O→6)- $\alpha$ -D-Man,  $\alpha$ -D-GlcN-(6→O)-AEP e *myo*-Ino-(1→O)-metil-fosfato. Dessa forma, tais resíduos foram construídos utilizando o programa Molden (Schaftenaar & Noordik, 2000) e, posteriormente, submetidos a cálculos de minimização de energia utilizando a base Hartree-Fock/3-21G no programa GAMESS (Schmidt *et al.*, 1993). As conformações de mínimo de energia então obtidas foram empregadas como geometrias de entrada para cálculos de minimização na base Hartree-Fock/6-31G\*\*, de forma a gerar cargas atômicas segundo o esquema de Löwdin, as quais são encontradas no item de anexos.

### 3.4 Construção de topologias

A topologia é um arquivo contendo parâmetros que descrevem as propriedades atômicas de uma estrutura química por meio da descrição da força e tipo de cada ligação química, ângulos de ligação e de diedro, assim como os parâmetros de Lennard Jones e as cargas atômicas. As topologias das moléculas estudadas para o campo de força GROMOS96 foram obtidas a partir da submissão de um arquivo PDB da estrutura para o servidor PRODRG (Schüttelkopf & van Aalten, 2004).

Esta ferramenta gera somente um conjunto de parâmetros iniciais, que necessitam ser refinamentos através do acréscimo de cargas atômicas, calculadas por métodos *ab-initio* (Verli & Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005), e da adição de diedros impróprios (Tabela 4), necessários para preservar os estados conformacionais ( ${}^4C_1$  ou  ${}^1C_4$ ) dos monossacarídeos. Assim, no item 8.2 do anexo estão disponíveis as topologias dos resíduos parametrizados para esta dissertação.

Tabela 4: Definição dos diedros impróprios utilizados para definir a conformação dos monossacarídeos contidos nos sistemas simulados (Verli, 2005).



Seqüência de átomos definindo o diedro <sup>a</sup>	Ângulos (em graus)	
	${}^4C_1$	${}^1C_4$
5 – 2 – 4 – 1	2,0	-2,0
5 – 2 – 3 – 1	23,0	-23,0
5 – 2 – 3 – 6	-2,0	2,0

<sup>a</sup> Na figura, a glicose é utilizada como modelo.

As topologias dos gangliosídeos e de seus dissacarídeos constituintes para o campo de força GLYCAM foram obtidas a partir da construção da estrutura no servidor *Online Carbohydrate Builder* (Woods Group, 2005). Esta ferramenta gera somente um conjunto de parâmetros no formato do AMBER. Portanto, para que elas possam ser usadas no pacote de simulações GROMACS, foi necessário a conversão desses arquivos de estrutura e topologia por meio da ferramenta ACPYPE (Sousa da Silva & Vranken, 2012).

### **3.5 Caracterização conformacional das ligações glicosídicas**

As preferências conformacionais das unidades dissacarídicas abordadas na presente dissertação (Tabela 5) foram avaliadas através de mapas de contorno, análogos aos mapas de Ramachandran, por meio da metadinâmica. Essas simulações foram realizadas no pacote GROMACS com uso do PLUMED (Bonomi *et al.*, 2009), avaliando os diedros  $\phi$  e  $\psi$  ou  $\omega$  e  $\psi$ , como variáveis escolhidas, durante 10 ns. Os potenciais, gaussianas, foram adicionados a cada 200 ps, com altura de 0,1 kcal.mol<sup>-1</sup> e largura de 0,5 radianos, de acordo com o trabalho de Pol-Fachin *et al.*, 2012. Os sistemas foram solvatados com modelo de água SPC (Berendsen *et al.*, 1987) em uma caixa retangular com condições periódicas de contorno. A temperatura e pressão foram mantidas constantes a 310 K (298 K nos casos das moléculas do NETNES) e 1 atm, respectivamente, por meio do termostato de Nosé-Hoover (Nosé, 1984; Hoover, 1985) e barostato de Parrinello-Rahman (Parrinello & Rahman, 1981), com constantes de acoplamento de  $t = 0,1$  ps e  $t = 1,0$  ps, respectivamente. O método Lincs (Hess *et al.*, 1997) foi aplicado na restrição de ligações covalentes de forma a permitir um passo de integração de 2 fs. As interações eletrostáticas foram calculadas usando Reaction Field (Tironi *et al.*, 1995). A constante dielétrica foi tratada como  $\epsilon = 66$  (Pol-Fachin *et al.*, 2012).

Adicionalmente, o nosso grupo de pesquisas tem se voltado mais para a abundância relativa de estados conformacionais do que para mínimos de energia, como estratégia para buscar formas mais representativas de fenômenos biológicos (Pol-Fachin *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Pedebos *et al.*, 2012). Assim, cada mínimo de energia obtido pelos mapas de contorno foi submetido a simulações por DM por 0,1  $\mu$ s (Tabela 5) (ver adiante para os detalhes destas

simulações). Pôde-se, assim, identificar os estados conformacionais majoritários para cada ligação glicosídica.

Tabela 5: Unidades dissacarídicas abordadas na presente dissertação. Todas tiveram seus perfis conformacionais caracterizados a partir de mapas de contorno gerados por metadinâmica usando as ligações glicosídicas como variáveis. Adicionalmente, cada mínimo de energia foi ainda submetido a uma DM em solução para identificação dos estados conformacionais mais abundantes para cada conexão carboidrato-carboidrato.

Campo de Força	Ligação Glicosídica	Mínimos de energia refinados em solução	Tempo total de simulação			
GROMOS96	$\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcN	$\phi = 90^\circ ; \psi = 90^\circ$ $\phi = 90^\circ ; \psi = -60^\circ$	0.2 $\mu$ s			
	$\alpha$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- <i>mIno</i>	$\phi = 90^\circ ; \psi = 120^\circ$ $\phi = 90^\circ ; \psi = -60^\circ$	0.2 $\mu$ s			
	<i>mIno</i> -(1 $\rightarrow$ O)-PO <sub>4</sub> -Me	$\phi = 100^\circ ; \psi = 110^\circ$ $\phi = -90^\circ ; \psi = 110^\circ$	0.2 $\mu$ s			
	$\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ O)-PO <sub>4</sub> -Me	$\phi = 90^\circ ; \psi = 90^\circ$ $\phi = 90^\circ ; \psi = -90^\circ$	0.2 $\mu$ s			
	PO <sub>4</sub> -Me(O $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Man		$\phi = -120^\circ ; \psi = -120^\circ$ $\phi = -90^\circ ; \psi = 120^\circ$ $\phi = 90^\circ ; \psi = 120^\circ$ $\phi = 90^\circ ; \psi = -120^\circ$ $\omega = 60^\circ ; \psi = 120^\circ$ $\omega = 60^\circ ; \psi = -120^\circ$ $\omega = -60^\circ ; \psi = -90^\circ$ $\omega = -90^\circ ; \psi = 120^\circ$	0.8 $\mu$ s		
			$\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -D-NeuAc	$\phi = -60^\circ ; \psi = 120^\circ$ $\phi = -60^\circ ; \psi = -120^\circ$ $\omega = 60^\circ ; \psi = 100^\circ$ $\omega = -60^\circ ; \psi = -100^\circ$ $\omega = 60^\circ ; \psi = -120^\circ$	0.5 $\mu$ s	
				$\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal	$\phi = -60^\circ ; \psi = -120^\circ$	0.2 $\mu$ s

		$\phi = 60^\circ ; \psi = -120^\circ$	
	$\beta$ -D-Gal-(1→3)- $\beta$ -D-GalNAc	$\phi = -90^\circ ; \psi = 60^\circ$ $\phi = -90^\circ ; \psi = -150^\circ$	0.2 $\mu$ s
	$\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc	$\phi = -90^\circ ; \psi = -60^\circ$ $\phi = -90^\circ ; \psi = 120^\circ$	0.2 $\mu$ s
	$\beta$ -D-GalNAc-(1→4)- $\beta$ -D-Gal	$\phi = -30^\circ ; \psi = -90^\circ$ $\phi = 60^\circ ; \psi = -120^\circ$	0.2 $\mu$ s
		$\phi = 60^\circ ; \psi = 120^\circ$	
	$\alpha$ -D-NeuAc-(2→8)- $\alpha$ -D-NeuAc	$\omega = -150^\circ ; \psi = 120^\circ$ $\omega = -150^\circ ; \psi = -60^\circ$ $\omega = -30^\circ ; \psi = 120^\circ$	0.4 $\mu$ s
	$\alpha$ -D-NeuAc-(2→3)- $\beta$ -D-Gal	$\phi = 60^\circ ; \psi = -120^\circ$	0.1 $\mu$ s
GLYCAM	$\beta$ -D-Gal-(1→3)- $\beta$ -D-GalNAc	$\phi = -60^\circ ; \psi = -90^\circ$ $\phi = 60^\circ ; \psi = -120^\circ$	0.3 $\mu$ s
	$\beta$ -D-Gal-(1→4)- $\beta$ -D-Glc	$\phi = -60^\circ ; \psi = 120^\circ$ $\phi = -60^\circ ; \psi = -60^\circ$	0.2 $\mu$ s
	$\beta$ -D-GalNAc-(1→4)- $\beta$ -D-Gal	$\phi = -60^\circ ; \psi = -120^\circ$ $\phi = -60^\circ ; \psi = 60^\circ$	0.2 $\mu$ s
	<b>15 dissacarídeos</b>	<b>41 confôrmeros</b>	<b>4.1 <math>\mu</math>s</b>

### 3.6 Construção da estrutura glicídica

As estruturas das glicanas foram construídas de duas maneiras: 1) por meio da ferramenta *GlyProt* do site GLYCOSCIENCES.de (Lütekke *et al.*, 2006) para o caso das N-glicosilações; ou 2) por montagem em bloco a partir das conformações mais abundantes dos carboidratos estudados. O *GlyProt* identifica os possíveis sítios de N-glicosilações na estrutura submetida e devolve um arquivo PDB da proteína com a glicana escolhida. No caso do NETNES, foi verificado por DM, por meio da convergência de simulações com duas conformações iniciais diferentes, e por dados de predição de estrutura secundária que ele não possuía estruturas de hélices e fitas  $\beta$ . Portanto seu PDB na forma de alça alongada foi submetido ao servidor. Na glicoproteína obtida, cada ligação

glicosídica foi ajustada para reproduzir as geometrias mais abundantes em solução, de acordo com os estudos dos dissacarídeos.

### **3.7 Simulações de DM**

#### **3.7.1 Protocolos de simulação do NETNES**

Considerando que o NETNES é um glicopeptídeo de superfície, os sistemas foram inseridos em uma membrana de POPC, a qual foi obtida já montada e equilibrada do trabalho de Kukol, 2009. Esse tipo de membrana foi usado porque: 1) fosfatidilcolina é o fosfolípídeo mais abundante da forma epimastigota; 2) mantém em fase fluida em temperatura ambiente; 3) foi parametrizada para o campo de força GROMOS96 53a6, que foi utilizado no trabalho.

O protocolo geral de simulação foi baseado em procedimentos previamente descritos (de Groot & Grubmüller, 2001). As simulações do glicopeptídeo NETNES foram realizadas à temperatura ambiente (298K), com duração de 100 ns cada, com pacote GROMACS 4.5.1 (van der Spoel *et al.*, 2005) e campo de força GROMOS96 53a6 (Oostenbrink *et al.*, 2004). Cada sistema foi solvatado numa caixa retangular utilizando condições periódicas de contorno, empregando o modelo de água SPC (Berendsen *et al.*, 1987) e contra-íons, cloreto ou sódio, a fim de neutralizar as cargas dos sistemas estudados. O método Lincs (Hess *et al.*, 1997) foi aplicado na fixação de ligações covalentes, de forma a permitir um passo de integração de 2 fs, enquanto as interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método Particle-Mesh Ewald (PME, Darden *et al.*, 1993), utilizando raios de corte de *Coulomb* e de *van der Waals* de 9 Å. A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento do soluto, íons e solvente a banhos externos de temperatura, e do acoplamento, semiisotrópico, do sistema a banhos externos de pressão. Para as simulações do glicopeptídeo, o termostato e barostato utilizados foram Nosé-Hoover e Parrinello-Rahman, utilizando constantes de acoplamento de  $\tau = 0,2$  ps e  $\tau = 2$  ps, respectivamente. A constante dielétrica do meio foi tratada como  $\epsilon = 1$ .

As simulações por DM podem ser divididas em duas etapas: equilibração e recolhimento de dados. Nos sistemas do NETNES, que possuem membrana, foi

realizada uma etapa de 5 ns de simulação de DM, restringindo todos os átomos do sistema com uma constante de força de  $10.000 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , a fim de que as moléculas de água se acomodem. Quando a âncora de GPI foi inserida, primeiramente foi selecionada uma molécula de POPC aleatória do centro da camada superior da bicamada, e esta foi substituída pelo fosfolípídeo modificado do NETNES. A membrana foi acomodada ao redor deste fosfolípídeo em uma etapa de 20 ns de DM, posterior a minimização com algoritmo de *Steepest Descents*. Após a equilibração, os sistemas foram novamente minimizados, e a simulação prosseguiu pelo tempo estipulado.

### 3.7.2 Protocolos de simulação dos gangliosídeos

As simulações dos gangliosídeos foram realizadas à temperatura fisiológica (310K) com duração de 100 ns cada, com pacote GROMACS 4.5.4 (van der Spoel *et al.*, 2005) e campos de força GROMOS96 43a1 (van Gunsteren *et al.*, 1996) ou GLYCAM (Kirschner *et al.*, 2008). Cada sistema foi solvatado numa caixa retangular utilizando condições periódicas de contorno, empregando o modelo de água SPC (Berendsen *et al.*, 1987), quando utilizado o campo de força GROMOS96 43a1 (van Gunsteren *et al.*, 1996), ou TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983), quando usado o GLYCAM (Kirschner *et al.*, 2008), e contra-íons, cloreto ou sódio, a fim de neutralizar as cargas dos sistemas estudados. O método Lincs (Hess *et al.*, 1997) foi aplicado na fixação de ligações covalentes, de forma a permitir um passo de integração de 2 fs, enquanto as interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método Particle-Mesh Ewald (PME, Darden *et al.*, 1993), utilizando raios de corte de *Coulomb* e de van der Waals de 9 Å. A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento do soluto, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão. O termostato e barostato utilizados foram v-rescale (Bussi *et al.*, 2007) e Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984), cujas constantes de acoplamento foram, respectivamente,  $\tau = 0,1 \text{ ps}$  e  $\tau = 0,5 \text{ ps}$ . A constante dielétrica do meio foi tratada como  $\epsilon = 1$ .

Nesse trabalho, 4 diferentes DMs foram simuladas para cada gangliosídeo: 1) com campo de força GROMOS43a1 em meio aquoso; 2) com campo de força

GROMOS43a1 em meio DMSO:H<sub>2</sub>O (98%:2% v/v); 3) com campo de força GLYCAM em meio aquoso; 4) com campo de força GLYCAM em meio aquoso, empregando restrições de distância entre os átomos de hidrogênio a fim de tentar reproduzir as estruturas obtidas por RMN. Para tanto foi utilizada uma constante de força de 1000 kJ.mol<sup>-1</sup> para prender as distâncias nos limites mínimo e máximo estipulados por dados experimentais de NOE de estudos prévios.

O DMSO foi utilizado no trabalho, pois dados prévios de RMN dos gangliosídeos foram obtidos com essa proporção de solução, DMSO:H<sub>2</sub>O (98%:2% v/v). Os parâmetros desse composto foram obtidos do trabalho de Vishnyakov *et al.*, 2001.

### 3.7.3 Sistemas simulados

Assim, considerando os 2 trabalhos, temos um total de 16 sistemas simulados, conforme a tabela 6.

Tabela 6: Sistemas simulados com seus respectivos compostos, meios, condições e campos de força.

<b>Trabalho I – NETNES</b>		
Sistemas	Composição	Campo de Força
A	POPC, água	
B	POPC, GPI, água e íons	GROMOS96 53a6
C	POPC, GPI, NETNES 1 N-glicosilação, água e íons	
D	POPC, GPI, NETNES 2 N-glicosilações, água e íons	
<b>Trabalho II – Gangliosídeos</b>		
Sistemas	Composição	Campo de Força
GM1 – 1	GM1, água e íons	GROMOS96 43a1
GM1 – 2	GM1, DMSO, água e íons	
GM1 – 3	GM1, água e íons	GLYCAM
GM1 – 4	GM1, água e íons – com viés de restrição de distância	
GD1b – 1	GD1b, água e íons	GROMOS96 43a1
GD1b – 2	GD1b, DMSO, água e íons	
GD1b – 3	GD1b, água e íons	GLYCAM
GD1b – 4	GD1b, água e íons – com viés de restrição de distância	

GT1b – 1	GT1b, água e íons	GROMOS96 43a1
GT1b – 2	GT1b, DMSO, água e íons	
GT1b – 3	GT1b, água e íons	GLYCAM
GT1b – 4	GT1b, água e íons – com viés de restrição de distância	

### 3.7.4 Validação das simulações de DM

A confiabilidade das predições baseadas em cálculos de DM depende, principalmente, da precisão do campo de força utilizado e do tamanho da amostragem do espaço conformacional realizada durante a simulação (van Gunsteren & Mark, 1998). De forma geral, são feitas comparações dos resultados obtidos para modelo teórico com propriedades experimentais, logo a reprodução desses dados por DM é que julga a precisão do método (van Gunsteren & Berendsen, 1990; Karplus & Petsko, 1990). Assim, para a porção sacarídica, a validação dos resultados obtidos nas simulações de DM foi realizada através da comparação com dados experimentais prévios, principalmente sinais de NOE inter-resíduos oriundos de experimentos de RMN. No caso da âncora de GPI, seis valores de distância entre hidrogênios foram avaliados. Já para os gangliosídeos, foram 21 sinais de NOE analisados. Com relação a porção peptídica, presente no trabalho do NETNES, os dados das simulações de DM foram comparados com os resultados de servidores de predição de estrutura secundária a partir da sequência de aminoácidos.

## 4 Resultados

### 4.1 *Preâmbulo*

Os resultados obtidos durante a realização da presente dissertação serão apresentados a seguir, na forma de dois artigos científicos, a saber:

- **Carla Gottschald Chiodi & Hugo Verli:** Structural characterization of NETNES glycopeptide from *Trypanosoma cruzi*. *Carbohydr. Res.*, 373: 28-34, 2013.

Este trabalho apresenta a aplicação de ferramentas de modelagem e dinâmica molecular para estudo da glicobiologia estrutural do NETNES, um peptídeo de *T. cruzi* altamente glicosilado e ancorado em membrana.

- **Carla Gottschald Chiodi & Hugo Verli:** Conformational characterization of GM1, GD1b and GT1b gangliosides. *Carbohydr. Res.*, *in preparation*.

Neste trabalho, os gangliosídeos em questão foram construídos e analisados quanto ao comportamento deles em meio fisiológico, utilizando dois campos de força diferentes e comparando-os com dados experimentais.

A forma completa destes trabalhos será apresentada a seguir, precedida de um pequeno resumo.

## 4.2 Trabalho I

### **Structural characterization of NETNES glycopeptide from *Trypanosoma cruzi***

**Carla Gottschald Chiodi & Hugo Verli**

*Carbohydr. Res.*, 373: 28-34, 2013.

O NETNES é um glicopeptídeo de baixa abundância na superfície celular de *Trypanosoma cruzi* na forma epimastigota, porém ele é considerado uma das moléculas de eucariotos mais complexas já caracterizada, pois possui de 4 a 5 modificações pós-traducionais, que incluem uma âncora de GPI, duas fosfoglicosilações e uma ou duas N-glicosilações. Considerando a dificuldade da caracterização da estrutura e conformação de glicopeptídeos, especialmente os inseridos em membrana, por técnicas experimentais e o conhecimento e reconhecimento do grupo na área de glicobiologia conformacional, o presente trabalho objetivou a obtenção de um modelo atômico para o NETNES, através da avaliação das estruturas iniciais dos carboidratos e do peptídeo, construção das glicanas por blocos, inserção em membrana e simulações de DM em solução aquosa.

Os resultados obtidos indicam que o NETNES modifica a fluidez da POPC, aumentando a ordem dos carbonos entre a ligação dupla da cadeia sn2. Em relação a porção proteica, foi visto uma grande flexibilidade, principalmente na região N-terminal, devido a curvatura do peptídeo e inclinação sobre a superfície da membrana, expondo ele mesmo e alguns carboidratos para o meio, indicando que ele pode ter algum papel na interação entre parasita-hospedeiro intermediário ou na proteção do parasita.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Carbohydrate Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carres](http://www.elsevier.com/locate/carres)

## Structural characterization of NETNES glycopeptide from *Trypanosoma cruzi*



Carla G. Chiodi, Hugo Verli\*

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

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 January 2013

Received in revised form 11 March 2013

Accepted 12 March 2013

Available online 21 March 2013

## Keywords:

Molecular Dynamics

*Trypanosoma cruzi*

Glycopeptide

GPI-anchor

NETNES

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* is a protozoan, responsible for Chagas disease, that parasites triatomines and some vertebrates, mainly *Homo sapiens*. In 2010, nearly 10 million people in whole world, most from Latin America, had Chagas disease, which is an illness of high morbidity, low mortality, and serious problems of quality of life. The available treatment has high toxicity and low efficacy at chronic phase. Some of the protozoan antigenic or virulence factors include complex carbohydrate structures that, due to their uniqueness, may constitute potential selective targets for the development of new treatments. One example of such structures is NETNES, a low abundance *T. cruzi* glycopeptide, comprising 13 amino acid residues, one or two N-glycosylation chains, a GPI anchor and two P-glycosylations. In this context, the current work aims to obtain an atomic model for NETNES, including its glycan chains and membrane attachment, in order to contribute in the characterization of its structure and dynamics. Based on POPC and GPI models built in agreement with experimental data, our results indicate that, in the first third of the simulation, NETNES peptide is very flexible in solution, bending itself between asparagine residues and lying down on some carbohydrates and membrane, exposing amino acid residues and some other glycans, mainly terminal mannoses, to the extracellular medium, remaining in this position until the end of simulations.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Trypanosoma cruzi* is a protozoan parasite that has both vertebrate and invertebrate hosts and four developmental stages in its life cycle: (1) epimastigote, found in triatomine's digestive tract; (2) metacyclic trypomastigote, the infective form that is usually released from the insect with the feces; (3) amastigote, intracellular replicative state; and (4) trypomastigote, release in bloodstream after cell rupture.<sup>1</sup> It is also the causative agent of Chagas' disease, whose distribution extends from Southern United States to Southern South America.<sup>2,3</sup> Despite the decrease in the number of infection, mainly due to triatomines control strategies, this illness still affects around 15 million people in Latin America, and puts more than 25 million at risk.<sup>2–4</sup>

Regarding this illness treatment, there are only two drugs available: nifurtimox and benznidazole.<sup>5</sup> However, in most South

American countries there is only one drug available, because nifurtimox commercialization was discontinued. But both compounds have low efficacy in chronic phase, high toxicity, and many *T. cruzi*-resistant strains have been reported,<sup>5,6</sup> reinforcing the needs of new therapeutic targets.

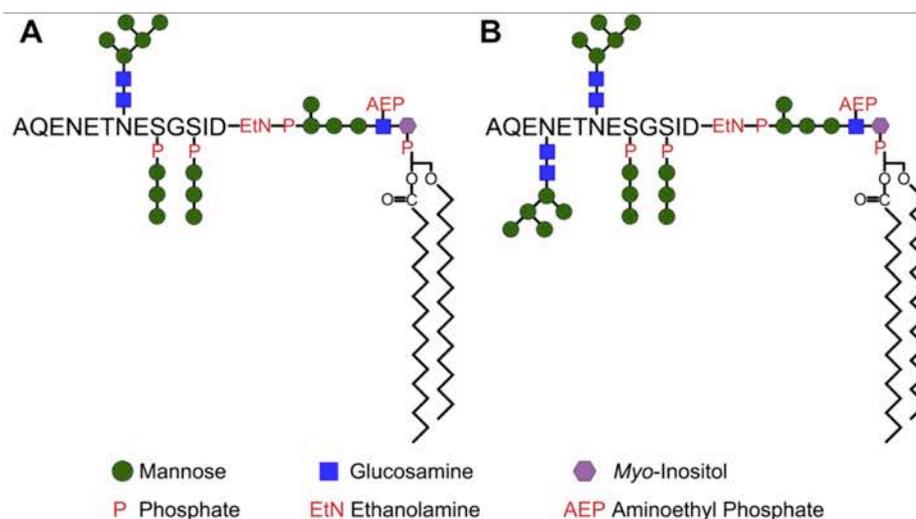
Carbohydrate moieties have important functions in many organisms, such as modifying protein properties, cellular communication, and regulating complement system.<sup>7,8</sup> Remarkably, parasites synthesize distinct glycan structures that are required for host cell invasion and evasion of immune system,<sup>9</sup> among them GPI-anchored molecules, which play a critical role in inflammation processes and immune response.<sup>10</sup> Therefore, those saccharide compounds were postulated to be novel targets for antiparasitic treatments.<sup>9</sup> *T. cruzi* surface glycoconjugates comprise GIPLs, sialoglycoproteins, and NETNES.<sup>9</sup> The latter one is a low abundance glycopeptide, whose structure was characterized in epimastigotes. NETNES has two forms, depending on the number of posttranslational modifications. It is composed by thirteen amino acid residues, a GPI-anchor, two P-glycosylations, and one or two N-glycosylations (Fig. 1). In this way, NETNES is considered one of the most unusual and most complex molecules yet described in eukaryotes.<sup>9,11</sup>

Since carbohydrates are very flexible, experimental techniques present some challenges for analyzing their conformations in solution, and theoretical methods come out to be promising tools in

**Abbreviations:** GPI, glycosylphosphatidylinositol; GIPLs, glycoinositolphospholipid; MD, molecular dynamics; AEP, aminoethyl phosphate; ETNP, ethanolamine phosphate; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine; Man, mannose; GlcN, glucosamine; Ino, inositol; PCA, principal component analysis; PC, principal component; RMSF, root mean square fluctuation.

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316 7770; fax: +55 51 3316 7309.

E-mail addresses: [carla.chiodi@gmail.com](mailto:carla.chiodi@gmail.com) (C.G. Chiodi), [hverli@cbiot.ufrgs.br](mailto:hverli@cbiot.ufrgs.br) (H. Verli).



**Figure 1.** NETNES structures. Representation of the two NETNES forms: with peptide sequence, GPI-anchor, P-glycosylation and (A) one N-glycosylation or (B) two N-glycosylations. Adapted from Ref.<sup>11</sup>

this field.<sup>7</sup> In this context, the current work aims to obtain NETNES three-dimensional models, at the atomic level, including the glycan chains and membrane attachment, in order to characterize this molecule conformation and dynamics, and contribute in the understanding of the parasite structural glycobiology.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Metadynamics conformational analysis

Metadynamics was employed in order to obtain the free energy minima for the following structures: methyl-phosphate-(O→6)- $\alpha$ -D-Man,  $\alpha$ -D-Man-(1→4)- $\alpha$ -D-GlcN,  $\alpha$ -D-GlcN-(1→6)-myo-Ino, myo-Ino-(1→O)-methyl-phosphate, and  $\alpha$ -D-Man-(1→O)-methyl-phosphate (Supplementary Fig. 1). For the other disaccharides that compose NETNES posttranslational modifications the minimum energy structures were obtained from previous works.<sup>12,13</sup> After metadynamics, all minima orientations of each disaccharide were used as different starting geometries and submitted to independent MD simulations, each one of 100 ns, after which their  $\phi$ ,  $\Psi$ , and  $\omega$  dihedrals converged to the same conformational states (Supplementary Fig. 2), indicating the robustness of the employed strategy to describe the saccharides conformational ensemble. Those most abundant conformations were used for GPI and P-glycosylation structure construction (Supplementary Fig. 3).

### 2.2. Peptide structure

Small peptides in solution are usually highly flexible, adopting many conformational states, which may hinder their structure determination. A promising tool to gain insight into such complex and dynamical conformational behavior may be found in MD simulations. In fact, several studies have successfully demonstrated folding and unfolding of a large variety of peptides using MD simulations with different force fields,<sup>14–19</sup> pointing to the reliability of such methodology.

So, in the absence of experimental information on NETNES structure, we employed a combination of microsecond MD simulations and secondary structure prediction from sequence to prospect NETNES dynamics. Accordingly, several methods agree on the absence of secondary structure for NETNES (Supplementary Table 1), pointing to an unfolded peptide on biological solutions. In order to reinforce such observations from the atomic level

perspective, MD simulations on the microsecond timescale were performed starting from two conformational states, a coil and a hypothetical helix. Still, despite the different initial structures, both systems ended the simulations in the absence of secondary structure (Supplementary Fig. 4).

### 2.3. Systems construction

A POPC membrane was used in this work due to three reasons: (1) phosphatidylcholine is one of the most abundant phospholipid in epimastigotes;<sup>20</sup> (2) it remains in fluid phase in plasma temperature;<sup>21</sup> and (3) it has been parameterized for GROMOS96 53a6.<sup>22</sup> System A (POPC) was simulated for 100 ns and the final frame was used to attach the GPI-anchor. GPI carbohydrates were built as described above and attached to the modified phospholipid. NETNES models were built based on the last frame of System B (that is, POPC-GPI) dynamics.

### 2.4. Membrane analyses

In order to evaluate the lipid bilayer equilibration and monitor unusual phase transitions we measure the area per lipid and thickness proprieties of POPC in all MD systems and compare them with the experimental<sup>23</sup> and a theoretical<sup>24</sup> data (Supplementary Table 2). Accordingly, area per lipid and thickness results were approximately 0.684 nm<sup>2</sup> and 3.53 nm, respectively, which are in good agreement with the experimental values.<sup>23</sup>

An additional propriety used to evaluate the membrane fluidity and the structural and dynamical information on lipids, that is, its order within the membrane, is the deuterium order parameter. It is related to the average orientation of methylene groups of each phospholipid chain. According to Supplementary Figure 5 and previously experimental<sup>25</sup> and theoretical<sup>24,26,21</sup> published data, the systems present a good overall correspondence of the order parameter.

### 2.5. GPI-anchor analyses

There is a lack of GPI MD simulations reported in the literature. The GPI structures of prion<sup>27,28</sup> and of the common oligosaccharide core<sup>29,30</sup> were simulated for a short period of 15 ns, using Senderowitz-Still AMBER\*, GLYCAM or Levitt and co-worker's force fields.<sup>31–33</sup> Thus, this is the first work of GPI MD simulations

**Table 1**  
NOE derived distances for GPI in the simulated systems compared to previous experimental<sup>35–37</sup> and theoretical<sup>27</sup> data obtained for similar GPI-anchor structures (described in Supplementary Fig. 6)

GPIs	NOE signals distances (Å)					
	(GlcN)H1-H6(mIno)	(ManIV)H1-H4(GlcN)	(ManII)H1-H5(ManIV)	(ManI)H1-H2(ManII)	(ManII)H1-H6'(ManIV)	(ManII)H1-H6''(ManIV)
A <sup>a</sup> [Ref.35]	2.6	2.4	2.5	2.3	—	—
B <sup>a</sup> [Ref. 36]	1.8–3.3	1.8–2.7	—	—	—	—
C <sup>b</sup> [Ref. 27]	3.7	6.2	5.2	3.3	—	—
D <sup>a</sup> [Ref. 37]	—	—	—	1.8–2.7	1.8–3.3	1.8–3.3
System B <sup>b</sup>	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.6	3.4 ± 0.4	2.4 ± 0.4	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.7
System C <sup>b</sup>	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.3	4.1 ± 0.3	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.4
System D <sup>b</sup>	2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.3	3.9 ± 0.4	2.4 ± 0.2	2.6 ± 0.4	2.1 ± 0.4

<sup>a</sup> NMR experimental data in D<sub>2</sub>O.

<sup>b</sup> Theoretical data obtained from MD simulations in a membrane and water environment.

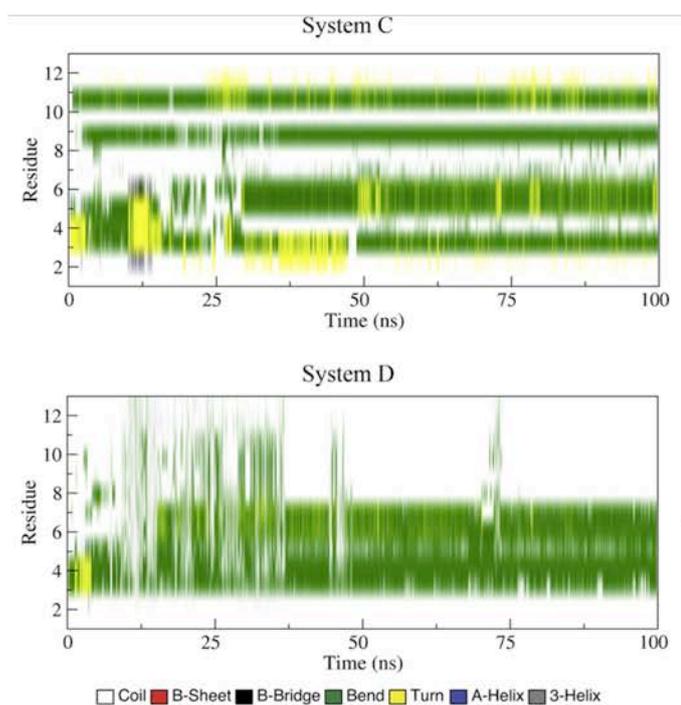
employing GROMOS96 force field,<sup>34</sup> achieving a sampling increase of approximately 6× in each of the simulated replica when compared to those previous articles. Since our GPI model had to be validated and there is no experimental data of NETNES available in literature, we used other GPIs with similar carbohydrate composition for validation (Supplementary Fig. 6).

In order to verify the accuracy of the produced models, the distances of hydrogens in dynamics were compared with experimental<sup>35–37</sup> and theoretical<sup>27</sup> NOE signals. The overall values are in good accordance with NMR experimental data (Table 1), pointing out the reliability of the obtained model. Only the distance between ManII H1 and ManIV H5 was a little higher, however, it is better than the one obtained from other theoretical data.<sup>27</sup> Such differences may be due to carbohydrate composition of the different anchors, since GPI structures A<sup>35</sup> and C<sup>27</sup> have different ramification in ManIV (Supplementary Fig. 6A and C), whereas NETNES does not have any (Supplementary Fig. 6E), or membrane influence, because experimental data were obtained in D<sub>2</sub>O, in contrast to MD simulations with membrane and water environment. Moreover, a comparison of the glycosidic linkage geometries of GPI glycans with the ones from other theoretical work<sup>30</sup> is given (Supplementary Table 3), indicating the good agreement between

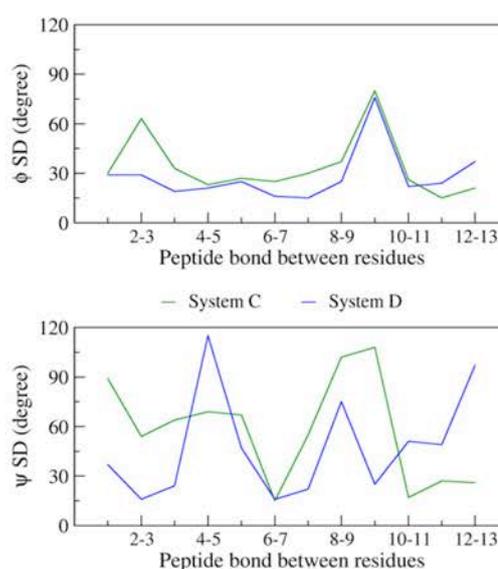
some average geometries. A few torsion angles were dissimilar; however, it is important to emphasize that the previously published data report MD simulations of the glycan core free in solution, that is, without membrane influence as explored in our systems. Therefore, the employed methodology is feasible and trustworthy, providing conformational data able to support further structural insights into the glycolipids.

## 2.6. NETNES analyses

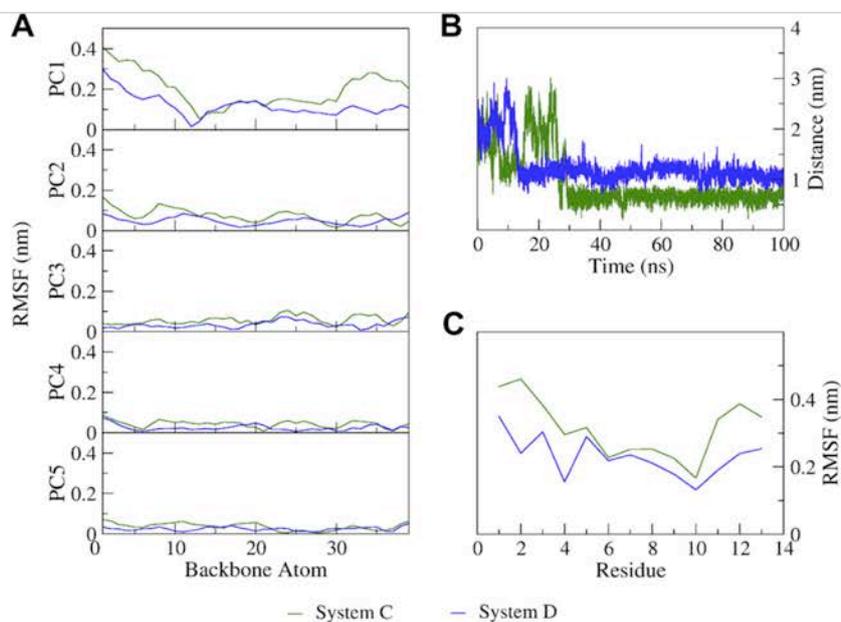
Regarding the peptide conformation and dynamics, NETNES was observed to remain absent of secondary structure during the performed simulations (Fig. 2), promoting bends between residues ASN4 and ASN7, which correlates to experimental data from other glycopeptides adopting turns and bends in the peptide sequence near the N-glycosylation<sup>38–41</sup> (Supplementary Fig. 7). Comparing both systems, the presence of another N-glycan caused a prevalence of coils at the C-terminal region (Fig. 2), which can be related to the increase of flexibility in the last peptide bonds (Fig. 3). Moreover, this analysis of standard deviation of peptide bonds' torsion angles indicates NETNES pliability as well as a higher torsion on ASN4-GLU5  $\Psi$  dihedral with addition of the other N-glycan (Fig. 3). The structural description of glycosidic linkages from each carbohydrate of N- and P-glycosylations during MD simulations is given in Supplementary Table 4.



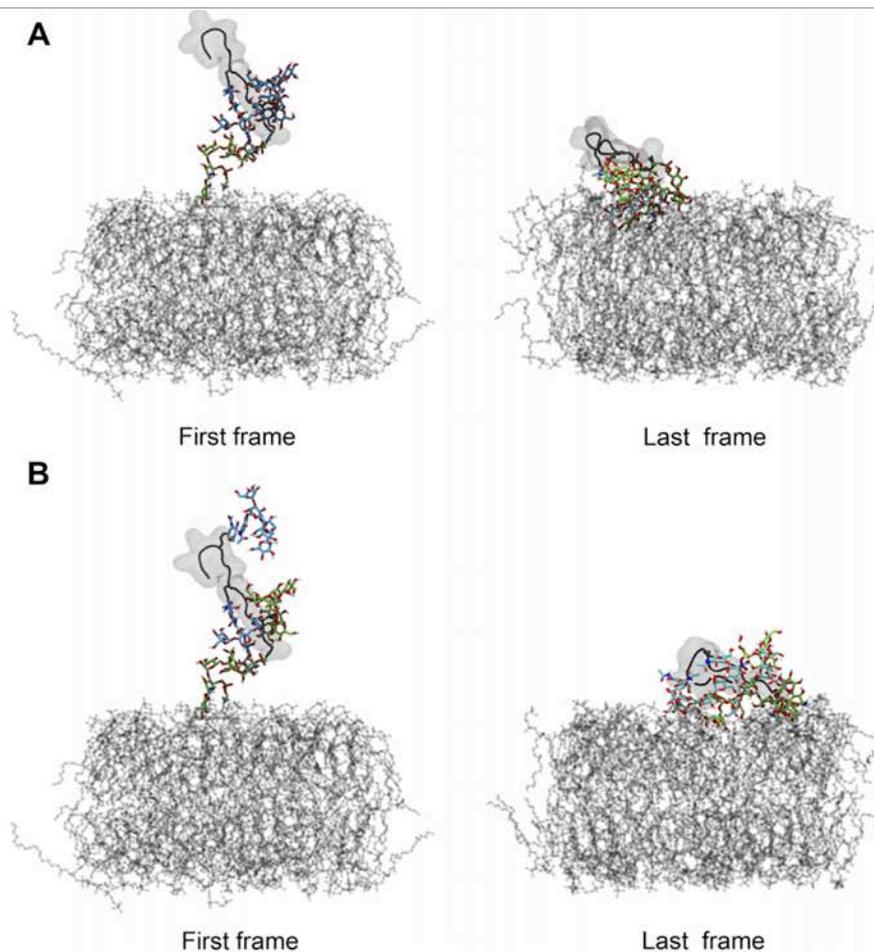
**Figure 2.** Secondary structure assignment. NETNES peptide secondary structure of systems C and D were measured by GROMACS during the MD simulations.



**Figure 3.** Standard deviation (SD) of NETNES peptide bonds. Dihedrals  $\phi$  and  $\Psi$  were measured during System C (green) and System D (blue) MD simulations, and only their SD were plotted in order to obtain the peptide structural description. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Figure 4.** NETNES flexibility. (A) RMSF analysis of the backbone atoms in the first 5 PCs. (B) Distance between residues ALA1 and ASP13 throughout MD simulations. (C) RMSF of each residue along the entire simulations for systems C and D.



**Figure 5.** NETNES orientation over the membrane. First and last frames of MD simulations of (A) system C and (B) system D.

Considering the absence of secondary structure on NETNES, our focus was directed to the peptide dynamics and flexibility in conditions closer to those expected to occur on the parasite. So

in order to identify the major motion patterns of NETNES under the performed simulations, a PCA was performed for the four systems using two programs from GROMACS 4.5.1 package<sup>42</sup>: (1)

g\_covar, to compute the covariance matrix of positional fluctuation for the NETNES backbone atoms; and (2) g\_anaeig, to examine the eigenvectors. PCA analyzes filter the main contributors to atomic fluctuations, yielding eigenvectors and eigenvalues. The first is the motion itself, and the latter represents the contribution of the eigenvector for the fluctuation. Hence, the eigenvector with higher eigenvalues correspond to the most significant global motions of the protein.

According to the observed contributions (Supplementary Table 5), the first five PCs supply more than 50% of total mean square fluctuation of systems C and D, and have cosine contents close to zero, pointing out the convergence of the trajectories.<sup>43</sup> The N-terminal and C-terminal residues have the highest flexibilities (Fig. 4A) due to the kink in peptide backbone between asparagine residues and to its bending toward the membrane. This curvature approximates ALA1 to ASP13 during MD simulations, reaching average distances of  $1.0 \pm 0.5$  and  $1.3 \pm 0.4$  nm for systems C and D, respectively (Fig. 4B). Moreover, the addition of the second N-linked glycan decreases NETNES flexibility (Fig. 4C) probably due to presence of more carbohydrates and, consequently, more interactions with the amino acids, as can be observed in contact maps (Supplementary Fig. 8) and in the interaction energies between protein residues and saccharides. Regarding the latter one, system D has higher interaction energy,  $-479 \pm 52$  kJ/mol, than system C, which is,  $-350 \pm 42$  kJ/mol. In addition, measuring the hydrogen bonds between glycosylated NETNES and water molecules, an increase of 10% of those bonds in system D is noticed. Concerning the final orientation of the glycopeptide, it can be seen that both systems lie down over the membrane surface (Fig. 5), exposing the peptide sequence and some carbohydrates to environment. In fact, this parallel orientation may occur due to attraction between the many polar and charged residues from NETNES and the POPC hydrophilic region. Still, despite the good agreement with experimental data and the use of large time scales compared to the literature, and considering the complexity of the systems, it is hard to affirm that all conformational sampling was covered.

**Table 2**

Solvent accessible area of NETNES peptide portion and of each glycan. As can be seen, there was no difference between the systems and the most terminal mannoses have more solvent accessibility

		Solvent accessible area (nm <sup>2</sup> )			
		System C	System D		
GPI	Peptide	14.89 ± 0.70	14.84 ± 0.59		
	ETNP	1.68 ± 0.14	1.77 ± 0.75		
	ManI	1.25 ± 0.10	1.23 ± 0.10		
	ManII	1.63 ± 0.14	1.59 ± 0.12		
	ManIII	1.99 ± 0.21	1.86 ± 0.12		
	ManIV	1.50 ± 0.14	1.49 ± 0.11		
	GlcN	1.23 ± 0.10	1.19 ± 0.09		
	AEP	1.42 ± 0.15	1.26 ± 0.12		
	mlno	1.91 ± 0.11	1.83 ± 0.09		
<hr/>					
	Peptide	ASN7	ASN4	ASN7	
N-glyc	GlcNAcI	2.61 ± 0.12	2.50 ± 0.15	2.23 ± 0.21	
	GlcNAcII	1.64 ± 0.14	1.50 ± 0.19	1.62 ± 0.17	
	ManV	1.09 ± 0.13	1.11 ± 0.11	1.17 ± 0.12	
	ManVI	2.16 ± 0.08	2.16 ± 0.08	2.15 ± 0.09	
	ManVII	1.08 ± 0.09	1.06 ± 0.12	1.17 ± 0.13	
	ManVIII	2.02 ± 0.14	1.40 ± 0.32	2.12 ± 0.12	
	ManIX	1.87 ± 0.16	1.72 ± 0.18	1.98 ± 0.22	
<hr/>					
	Peptide	SER9	SER11	SER9	SER11
P-glyc	ManX	2.53 ± 0.14	2.57 ± 0.12	2.52 ± 0.14	2.45 ± 0.14
	ManXI	1.62 ± 0.12	1.62 ± 0.10	1.68 ± 0.12	1.73 ± 0.10
	ManXII	1.72 ± 0.10	1.73 ± 0.09	1.70 ± 0.10	1.65 ± 0.10
	ManXIII	1.92 ± 0.12	1.89 ± 0.12	1.93 ± 0.13	1.94 ± 0.13

In addition, the solvent accessible area of all glycans and of the peptide portion were very similar when comparing both systems (Table 2). Besides, the most exposed carbohydrates were the first residues of the glycan trees (mlno, GlcNAcI and ManX) and the terminal mannoses (ManIII of GPI; ManVI, ManVIII and ManIX of N-glycosylations; and ManXIII of P-glycosylation). Most of *Trypanosoma* glycan chains have galactose residues in profusion because of the role of trans-sialidase proteins in sialic acid attachment, an event that is involved in cell adhesion, invasion, and protection against alternative complement pathway.<sup>44</sup> However, NETNES has a unique carbohydrate composition due to the presence of mannose residues in abundance and exposed to solution, and the absence of galactose residues. Hence, it may potentially interact with vector's mannose-specific lectins, suggesting a role in adhesion of parasites to the insect gut epithelia. Because NETNES is a small and low abundant molecule, it is probably located between other epimastigote molecules, as GIPLs and mucins, covering exposed membrane regions and acting as a protective coat against the digestive tract conditions.

### 3. Conclusions

Our findings suggest that POPC model and GPI-anchor presented, respectively, lipid properties and distance between hydrogen atoms values in accordance with experimental data. Regarding the peptide, it is very flexible in the first third of the simulations, mainly due to the bending of backbone bringing the N- and C-terminals closer. Furthermore, NETNES curves over the carbohydrates, exposing itself and some carbohydrates to solution, available to participate in parasite-invertebrate host interaction or in parasite protection.

This is the first work to build a three-dimensional model of NETNES, as well as to obtain dynamical insights into its structural glycochemistry. Also, it is the first force field simulation of phosphoglycosylation and the first simulation of GPI using GROMOS53a6 force field, as well as this is one of the most accurate computational reproductions of experimental GPI-anchor structure. According to our results, the employed methodology provided conformational data able to support further structural insights into the glycochemistry of the *T. cruzi* glycopeptide NETNES.

### 4. Materials and methods

#### 4.1. Nomenclature and topology

IUPAC nomenclature and symbols have been adopted.<sup>45</sup> Two disaccharides and three phosphated monosaccharides were evaluated in order to construct glycan moieties. Their relative orientation was described by two or three torsional angles at the glycosidic and phosphate linkages. For a (1 → X) linkage, where 'X' is '2', '3', '4', or '6', the  $\phi$  and  $\psi$  were defined as:

$$\phi = O5 - C1 - OX - CX$$

$$\Psi = C1 - OX - CX - C(X - 1)$$

For (1 → 6) linkage,  $\omega$  was defined as:

$$\omega = O6 - C6 - C5 - C4$$

Each disaccharide, as well as the phosphated monosaccharides, was built in Molden.<sup>46</sup> Their respective topologies were obtained from PRODRG server.<sup>47</sup> Improper dihedrals to preserve hexopyranose conformations in solution and HF/6-31\*\*<sup>48</sup>-derived Löwdin charges were included in those topologies, as described and validated previously.<sup>12,13,48</sup>

## 4.2. Metadynamics energy contour maps

Metadynamics energy sampling explores the free energy surface according to a set of collective variables, which can be angles, distances, potential energies, coordinates, and others.<sup>49,50</sup> These calculations were performed using GROMACS 4.5.1 simulation suite<sup>42</sup> with PLUMED implementation<sup>51</sup> and GROMOS96 53a6 force field.<sup>34</sup> Independent simulations were carried out evaluating  $\phi$  and  $\psi$  or  $\omega$  and  $\psi$  dihedrals as collective variables in a 10 ns based sampling. These variables were written every 10 ps, and the gaussian potentials were added every 200 ps with a height of 0.1 kcal mol<sup>-1</sup> and a width of 0.5 radians. The disaccharides and the phosphated monosaccharides were solvated with SPC water model<sup>52</sup> in triclinic boxes using periodic boundary conditions. Temperature and pressure were kept constant at 298 K and 1 atm using Nosé-Hoover thermostat<sup>53,54</sup>, Parrinello-Rahman barostat<sup>55,56</sup> and coupling constants of  $\tau = 0.1$  and 1.0 ps, respectively. The Lincs method<sup>57</sup> was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2 fs. Electrostatic interactions were calculated using Reaction Field.<sup>58</sup> The dielectric constant was treated as  $\epsilon = 66$ , and the calculations for the optimal fast Fourier transform plan for the grid was enabled. The energy minima, that is, 2 starting conformations for  $\alpha$ -D-Man-(1→O)-methyl-phosphate,  $\alpha$ -D-Man-(1→4)- $\alpha$ -D-GlcN,  $\alpha$ -D-GlcN-(1→6)-*myo*-Ino and *myo*-Ino-(1→O)-methyl-phosphate, and 4 for methyl-phosphate-(O→6)- $\alpha$ -D-Man, totalizing 14 systems, were submitted to conventional MD simulation, using GROMOS96 53a6 force field,<sup>32</sup> each one for 0.1  $\mu$ s and a protocol previously described<sup>12,13,59</sup> and presented in item 4.7. Each minimum was used to build GPI-anchor and P-glycosylation structures.

## 4.3. Peptide structure

Since there was no information in the literature concerning NETNES three-dimensional structure and the impossibility of perform-

ing comparative modeling methods due to the absence of proper templates, two initial models of this peptide with different secondary structures, one as an extended coil and another as an  $\alpha$ -helix, were submitted to 1  $\mu$ s MD simulations with GROMOS96 53a6 force field,<sup>34</sup> using the MD protocol previously described.<sup>12,13,59</sup> Besides that, we submitted the peptide sequence to secondary structure prediction servers Phyre2,<sup>60</sup> Psipred,<sup>61</sup> Jpred3,<sup>62</sup> and PredictProtein<sup>63</sup> in order to confirm the MD conformational sampling.

## 4.4. AEP and ETNP conformations

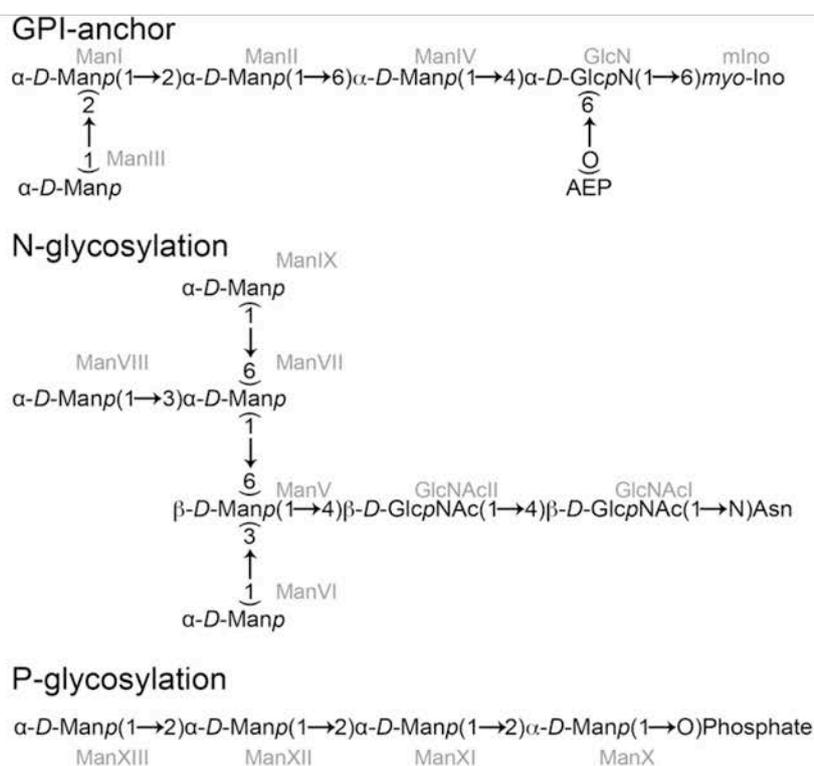
AEP and ETNP topologies were obtained from PRODRG server<sup>47</sup> and the Löwdin charges were added. Those molecules were bound to glucosamine and aspartate, respectively, and then were submitted to 100 ns of MD simulations, using the same protocol described above in item 4.3. In order to obtain the most prevalent conformation, GROMACS cluster analysis was performed.

## 4.5. Construction of glycosylated NETNES structure

Glycan moieties from N-glycosylation (Fig. 6) were added in the coiled conformation of NETNES peptide using GLYPROT server.<sup>64</sup> Carbohydrates composing GPI-anchor and P-glycosylation (Fig. 6) were constructed using each disaccharide most abundant conformation of AEP and ETNP as reference starting geometries, as previously described.<sup>65,66</sup>

## 4.6. GPI phospholipid

In order to construct the GPI lipid part, a dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) membrane was modified, removing the choline and one acyl group of the glycerol. Parameters and charges for this phospholipid were adapted from Kukol.<sup>22</sup> One random phospholipid at the middle of the membrane was exchanged for this constructed lipid attached to NETNES models.



**Figure 6.** Scheme of NETNES glycan structures. Man is mannose; GlcN, glucosamine; *myo*-Ino, *myo*-inositol; AEP, aminoethyl phosphate; GlcNAc, N-acetylglucosamine; Asn, asparagine. The names in gray were used in this work to differentiate the carbohydrates.

#### 4.7. MD simulations

Four systems (Supplementary Fig. 9) were built and submitted to MD simulations, and the last 2 were in duplicate: (1) 128 POPC molecules (System A); (2) 127 POPC molecules and one GPI-anchor (System B); (3) 127 POPC molecules, one GPI-anchor attached to NETNES peptide with one N-glycosylation and two P-glycosylations (System C); and (4) 127 POPC molecules, one GPI-anchor attached to NETNES peptide with two N-glycosylations and two P-glycosylations (System D).

Those systems were solvated with SPC water model<sup>52</sup> and neutralized with sodium ions in a triclinic box using periodic boundary conditions in order to perform the MD simulations with GROMACS 4.5.1 package<sup>42</sup> using GROMOS96 53a6 force field.<sup>34</sup> Temperature and pressure were kept constant at 298 K and 1 atm using Nosé-Hoover thermostat,<sup>53,54</sup> Parrinello-Rahman barostat<sup>55,56</sup> and coupling constants of  $\tau = 0.2$  and 2.0 ps, respectively. The Lincs method<sup>57</sup> was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2 fs after Steepest Descents minimization. Electrostatic interactions were calculated using Particle Mesh Ewald.<sup>67</sup>

Regarding the analyses, area per lipid was calculated as the lateral area of xy-plane of the simulation box divided by the number of lipids in one monolayer. Thickness was measured employing GridMAT-MD program,<sup>68</sup> which calculated the average membrane thickness of every 20 ns. In order to analyze distances between hydrogen atoms during the simulations and compare them to NMR NOE signals, apolar hydrogens were added on a 20,000 frames trajectory, using PyMOL, and the distances were calculated with g\_mindist of GROMACS package.

#### Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), MCT, by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brazil, by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Porto Alegre, RS, Brazil, and by Centro Nacional de Supercomputação (CESUP), UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

#### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.03.010>.

#### References

- Burleigh, B. A.; Andrews, N. W. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 175–200.
- The World Health Organization (WHO), **2010**, Factsheet no. 340.
- Almeida, I. C.; Gazzinelli, R. T. *J. Leukocyte Biol.* **2001**, *70*, 467–477.
- Rodrigues, R. F.; Castro-Pinto, D.; Echevarria, A.; dos Reis, C. M.; Cistia, C. N. D.; Sant'Anna, C. M. R.; Teixeira, F.; Castro, H.; Canto-Cavalheiro, M.; Leon, L. L.; Tomás, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1760–1766.
- Coura, J. R.; de Castro, S. L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3–24.
- Wilkinson, S. R.; Taylor, M. C.; Horn, D.; Kelly, J. M.; Cheeseman, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 5022–5027.
- Pol-Fachin, L.; Verli, H. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2011**, *8*, 229–238.
- Paulick, M. G.; Bertozzi, C. R. *Biochemistry* **2008**, *47*, 6991–7000.
- Mendonça-Previato, L.; Todeschini, A. R.; Heise, N.; Previato, J. O. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 499–505.
- Nakayasu, E. S.; Yashunsky, D. V.; Nohara, L. L.; Torrecilhas, A. C. T.; Nikolaev, A. V.; Almeida, I. C. *Mol. Syst. Biol.* **2009**, *5*, 261.
- MacRae, J. I.; Acosta-Serrano, A.; Morrice, N. A.; Mehler, A.; Ferguson, M. A. J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12201–12211.
- Pol-Fachin, L.; Fernandes, C. L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 491–500.
- Fernandes, C. L.; Sachett, L. G.; Pol-Fachin, L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 663–671.
- Duan, Y.; Kollman, P. A. *Science* **1998**, *282*, 740–744.
- Simmerling, C.; Strockbine, B.; Roitberg, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11258–11259.
- Freddolino, P. L.; Liu, F.; Gruebele, M.; Schulten, K. *Biophys. J.* **2008**, *94*, L75–L77.
- Daura, X.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F.; Mark, A. E. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 925–932.
- Giesel, G. M.; Lima, L. M. T. R.; Faber-Barata, J.; Guimarães, J. A.; Verli, H. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3619–3624.
- Terra, R. M.; Guimarães, J. A.; Verli, H. *J. Mol. Graphics Modell.* **2007**, *25*, 767–772.
- Florin-Christensen, M.; Florin-Christensen, J.; de Isola, E. D.; Lammel, E.; Meinardi, E.; Brenner, R. R.; Rasmussen, L. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *88*, 25–33.
- Heller, H.; Schaefer, M.; Schulten, K. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8343–8360.
- Kukol, A. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 615–626.
- Kučerka, N.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. *J. Membr. Biol.* **2005**, *208*, 193–202.
- Poger, D.; Mark, A. E. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 325–336.
- Seelig, J.; Waespe-Sarčević, N. *Biochemistry* **1978**, *17*, 3310–3315.
- Janosi, L.; Gorge, A. A. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 3267–3273.
- Zuegg, J.; Gready, J. E. *Glycobiology* **2000**, *10*, 959–974.
- DeMarco, M. L.; Daggett, V. *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 60–73.
- Martín-Lomas, M.; Khair, N.; García, S.; Koessler, J. L.; Nieto, P. M.; Rademacher, T. W. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3608–3621.
- Chevalier, F.; Lopez-Prados, J.; Perez, S.; Martín-Lomas, M.; Nieto, P. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *15*, 3489–3498.
- Senderowitz, H.; Still, W. C. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1427–1438.
- Woods, R. J.; Dwek, R. A.; Raymond, A.; Edge, C. J. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3832–3846.
- Levitt, M.; Hirshberg, M.; Sharon, R.; Daggett, V. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 215–231.
- Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1656–1676.
- Homans, S. W.; Edge, S. C. J.; Ferguson, M. A. J.; Dwek, R. A.; Rademacher, T. W. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2881–2887.
- Weller, C. T.; McConville, M.; Homans, S. W. *Biopolymers* **1994**, *34*, 1155–1163.
- Mehlert, A.; Richardson, J. M.; Ferguson, A. J. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 379–392.
- O'Connor, S. E.; Imperiali, B. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 803–812.
- Andreotti, A. H.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3352–3353.
- Beintema, J. J. *Biosci. Rep.* **1986**, *6*, 709–714.
- Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G. J. *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R–136R.
- van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–1718.
- Hess, B. *Phys. Rev. E* **2002**, *65*, 031910–1–031910–10.
- Frasch, A. C. *Parasitol. Today* **2000**, *16*, 282–286.
- I.U.P.A.C.-I.U.B. Commission on Biochemical Nomenclature. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1919–2008.
- Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 123–134.
- Schuettelkopf, A. W.; van Alten, D. M. F. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2004**, *60*, 1355–1363.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1499–1507.
- Laio, A.; Parrinello, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 12562–12566.
- Laio, A.; Gervasio, F. L. *Rep. Prog. Phys.* **2008**, *71*, 126601–126622.
- Bonomi, M.; Branduardi, D.; Bussi, G.; Camilloni, C.; Provasi, D.; Raiteri, P.; Donadio, D.; Marinelli, F.; Pietrucci, F.; Broglia, R. A.; Parrinello, M. *Comp. Phys. Commun.* **2009**, *180*, 1961–1972.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269–6271.
- Nosé, S. *Mol. Phys.* **1984**, *52*, 255–268.
- Hoover, W. G. *Phys. Rev. A* **1985**, *31*, 1695–1697.
- Parrinello, M.; Rahman, A. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182–7190.
- Nosé, S.; Klein, M. L. *Mol. Phys.* **1983**, *50*, 1055–1076.
- Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472.
- Tironi, I. G.; Sperber, R.; Smith, P. E.; van Gunsteren, W. F. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 5451–5459.
- Verli, H.; Guimarães, J. A. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 281–290.
- Kelley, L. A.; Sternberg, M. J. E. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 363–371.
- Buchan, D. W.; Ward, S. M.; Lobley, A. E.; Nugent, T. C.; Bryson, K.; Jones, D. T. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W563–W568.
- Cole, C.; Barber, J. D.; Barton, G. J. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *35*, W197–W201.
- Rost, B.; Yachdav, G.; Liu, J. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *32*, W321–W326.
- Bohne-Lang, A.; von der Lieth, C. W. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W214–W219.
- Pedebos, C.; Pol-Fachin, L.; Verli, H. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1196–1200.
- Pol-Fachin, L.; Serrato, R. V.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1922–1931.
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- Allen, W. J.; Lemkul, J. A.; Bevan, D. R. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 1952–1958.

## Supplementary Data

# Structural characterization of NETNES glycopeptide from *Trypanosoma cruzi*

*Carla G. Chiodi<sup>a</sup> and Hugo Verli<sup>a</sup>*

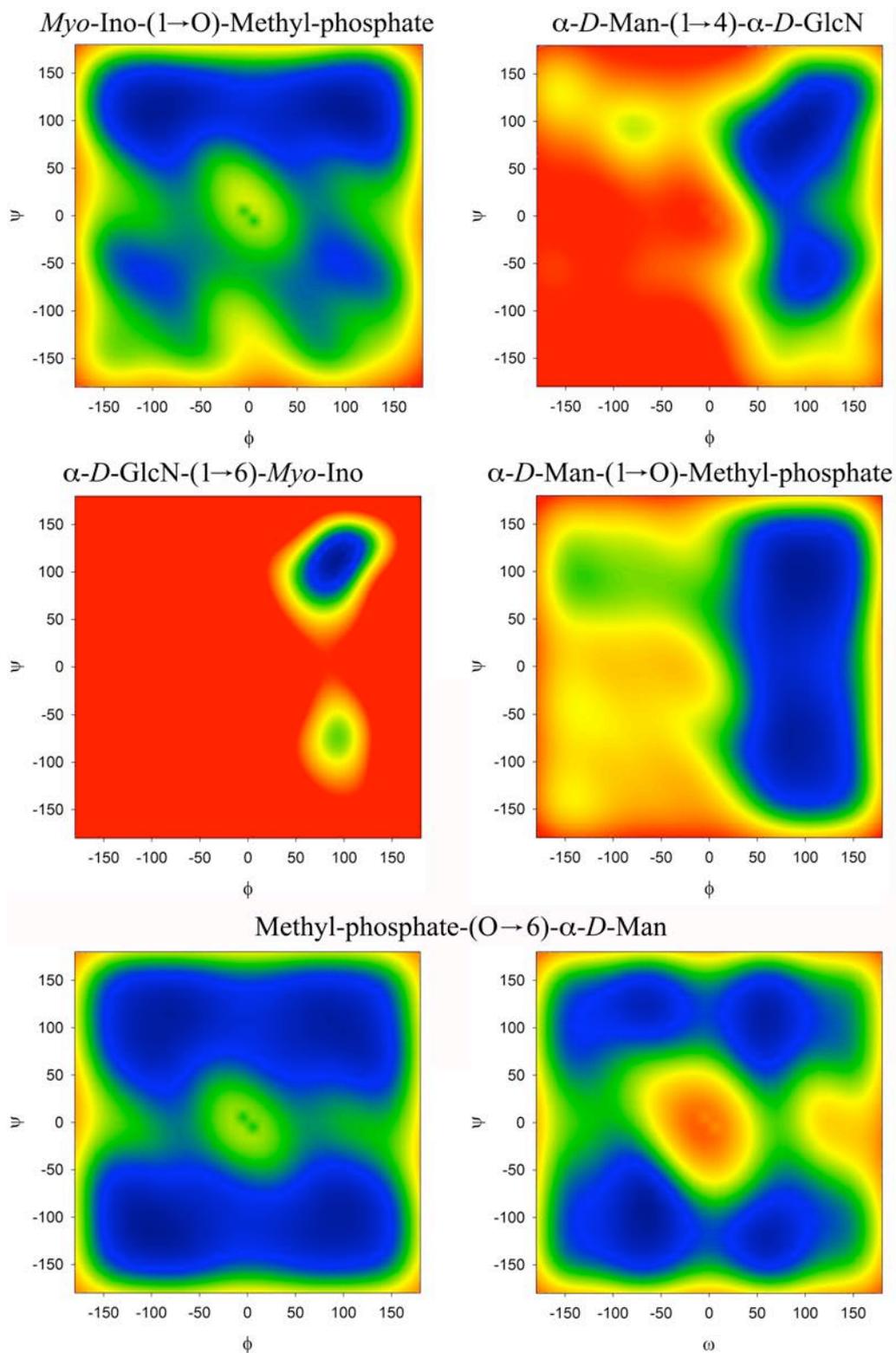
<sup>a</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento  
Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil.

carla.chiodi@gmail.com, hverli@cbiot.ufrgs.br

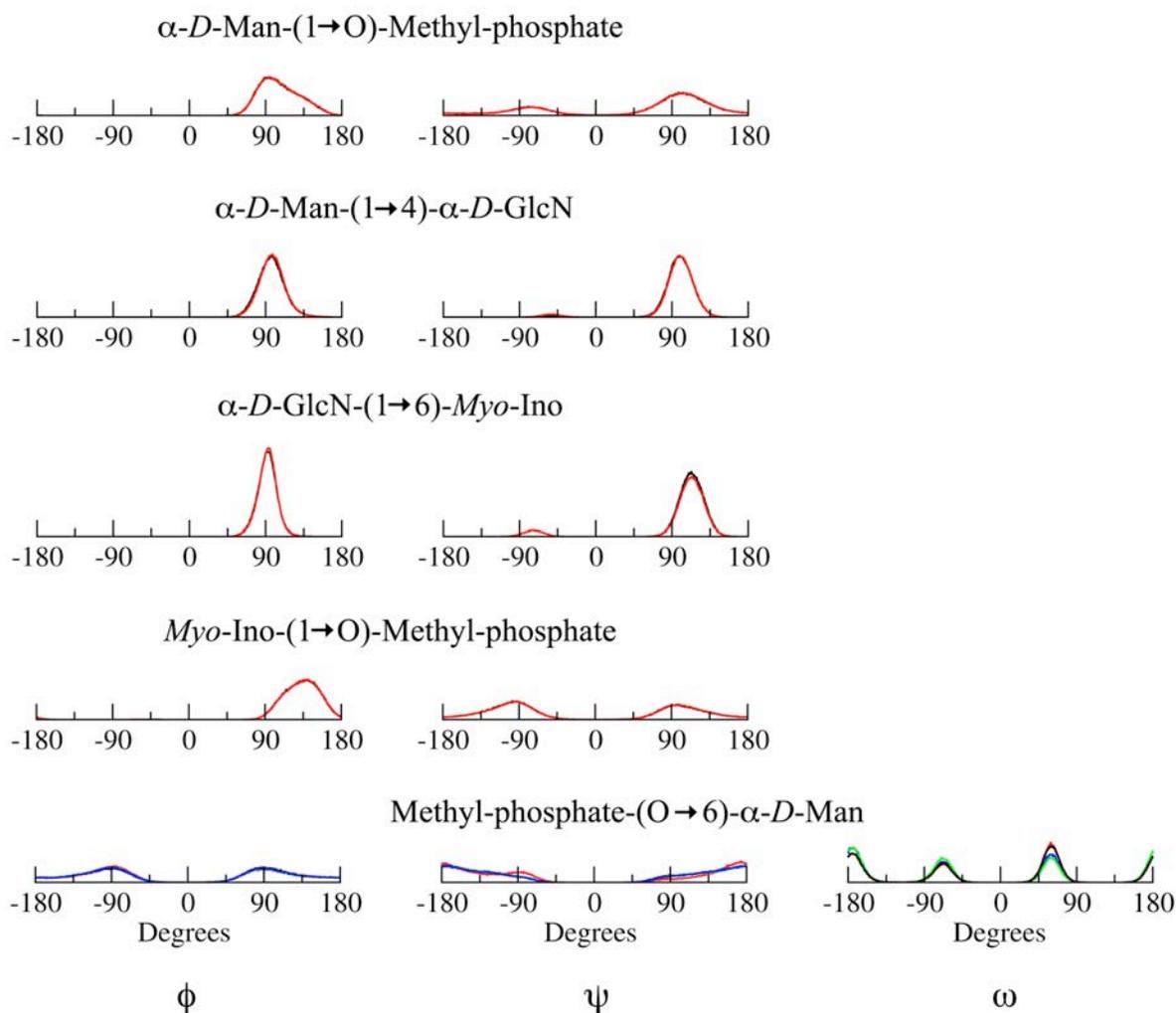
---

\*Corresponding author. Tel.: +55-51-3316-7770; fax: +55-51-3316-7309; e-mail  
address: hverli@cbiot.ufrgs.br. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Av Bento Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil

### Metadynamics conformational analysis

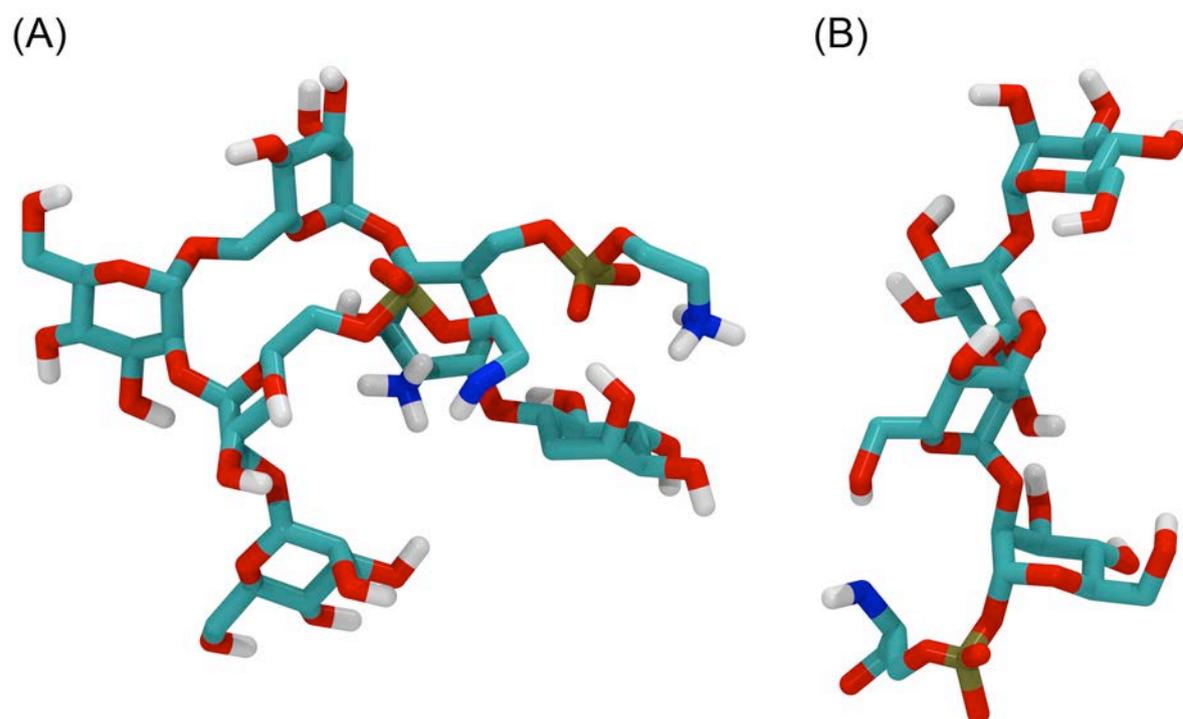


**Supplementary Figure 1.** Energy plots for dihedral angles  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\omega$  obtained from metadynamics.



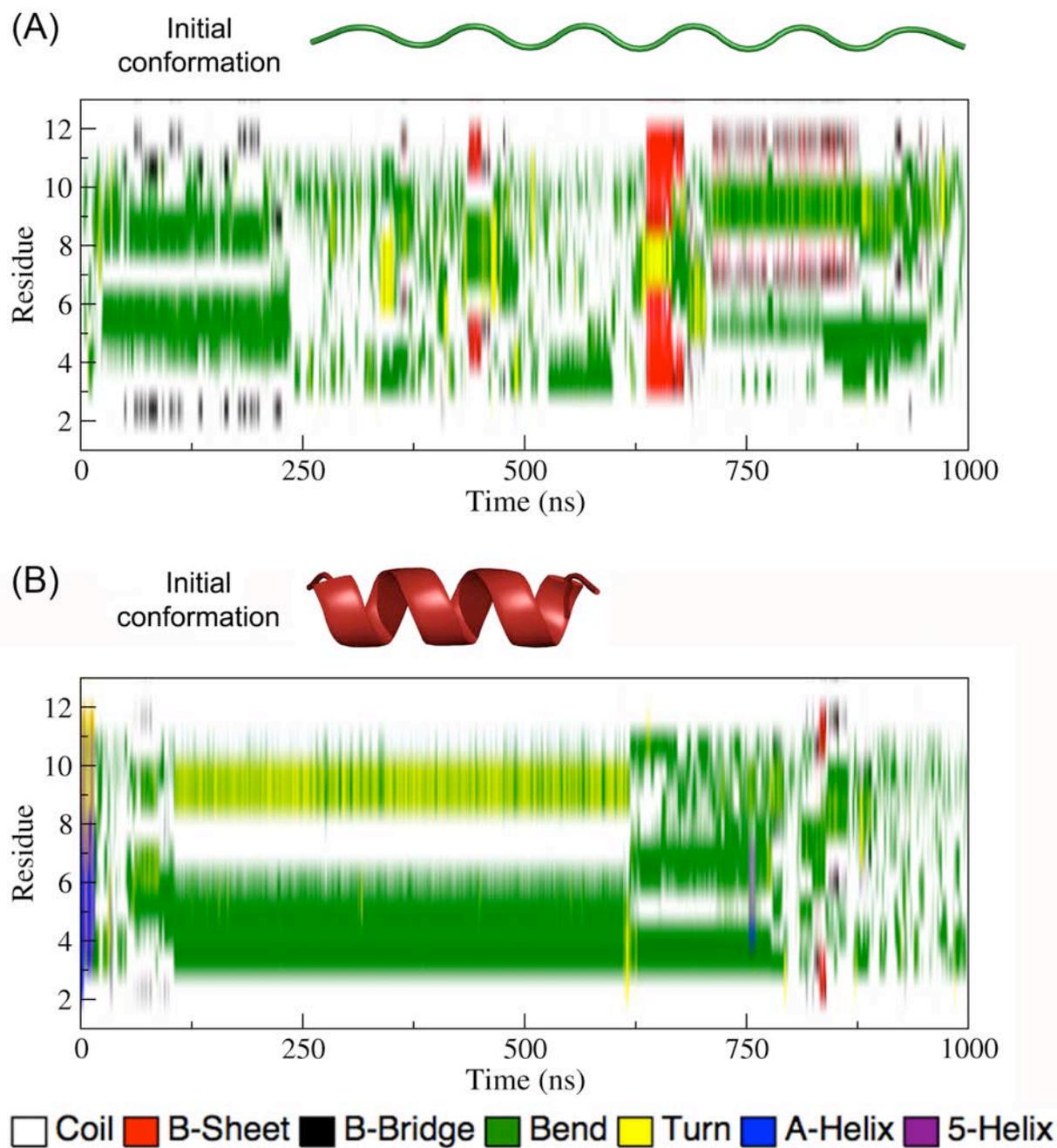
**Supplementary Figure 2.** Distribution of  $\phi$ ,  $\Psi$  and  $\omega$  dihedrals during MD simulations.

All minima energy conformations from metadynamics maps were used as starting points of MD simulations, that is, 4 different starting geometries for methyl-phosphate-(O $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Man and 2 different starting geometries for the other ones, that are:  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ O)-methyl-phosphate,  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcN,  $\alpha$ -D-GlcN-(1 $\rightarrow$ 6)-*myo*-Ino and *myo*-Ino-(1 $\rightarrow$ O)-methyl-phosphate. As can be observed there was a convergence of the structures in solution.



**Supplementary Figure 3.** (A) GPI and (B) P-glycosylation initial conformations based on the most abundant conformational states derived from MD simulations of metadynamics minima.

*Peptide conformation*



**Supplementary Figure 4.** Secondary structure assignment during MD simulations, as measured by DSSP, for NETNES. Two different simulations were performed, considering NETNES starting conformational state as (A) coil, and as (B) helix.

**Supplementary Table 1.** Secondary structure prediction of NETNES based on its amino acid sequence from different servers, where C means coil and E, a  $\beta$ -strand. Confidence values range from 0 (low confidence) to 9 (high).

		Peptide sequence												
		A	Q	E	N	E	T	N	E	S	G	S	I	D
<b>Phyre2<sup>a</sup></b>	Pred.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	E	E
	Conf.	9	8	6	5	6	6	6	5	6	7	7	3	3
<b>Psipred<sup>b</sup></b>	Pred.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	Conf.	9	6	5	4	3	4	6	6	6	7	3	0	0
<b>Jpred3<sup>c</sup></b>	Pred.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	Conf.	9	9	8	8	8	7	7	7	7	6	4	1	4
<b>Predict</b>	Pred.	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<b>Protein<sup>d</sup></b>	Conf.	9	5	4	4	4	5	7	5	5	4	3	2	4

<sup>a</sup> <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>

<sup>b</sup> <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

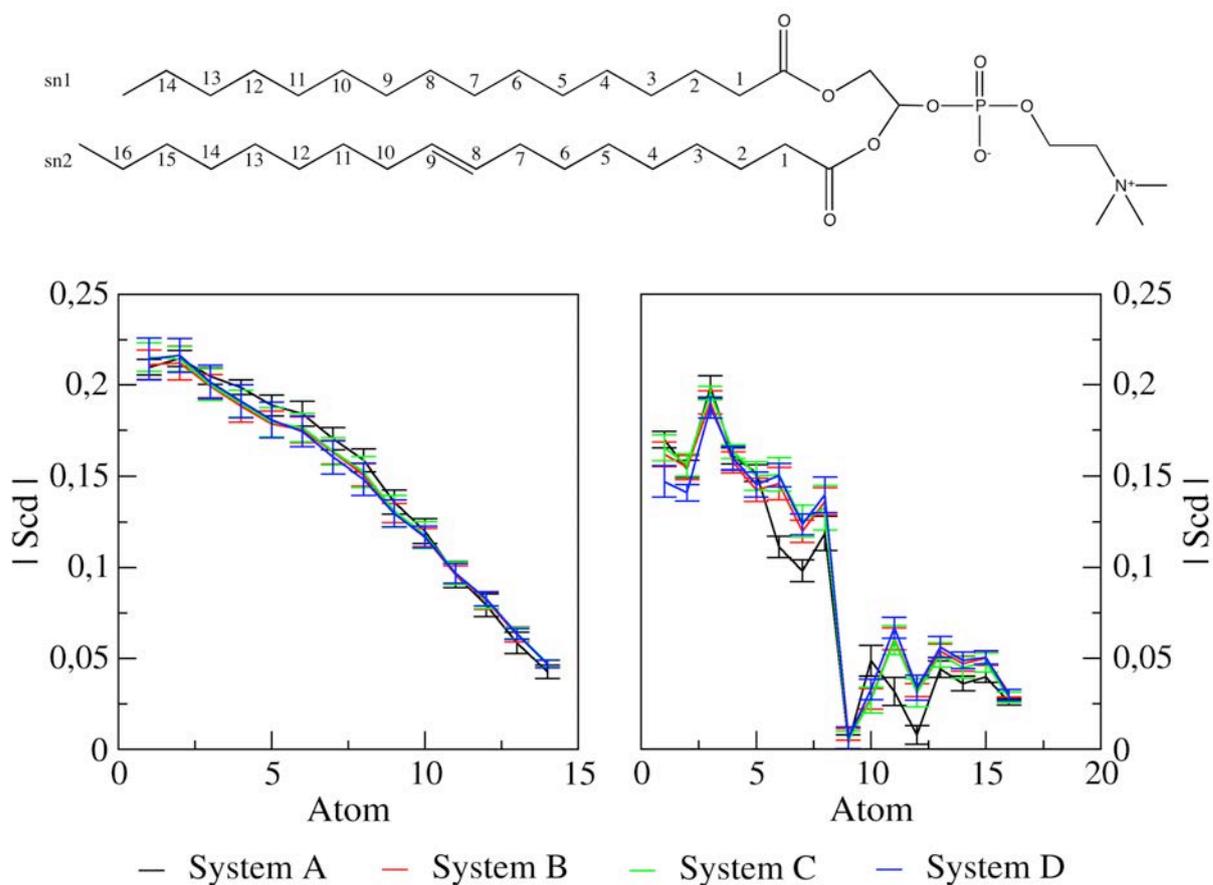
<sup>c</sup> <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>

<sup>d</sup> <http://www.predictprotein.org>

*Membrane analyses*

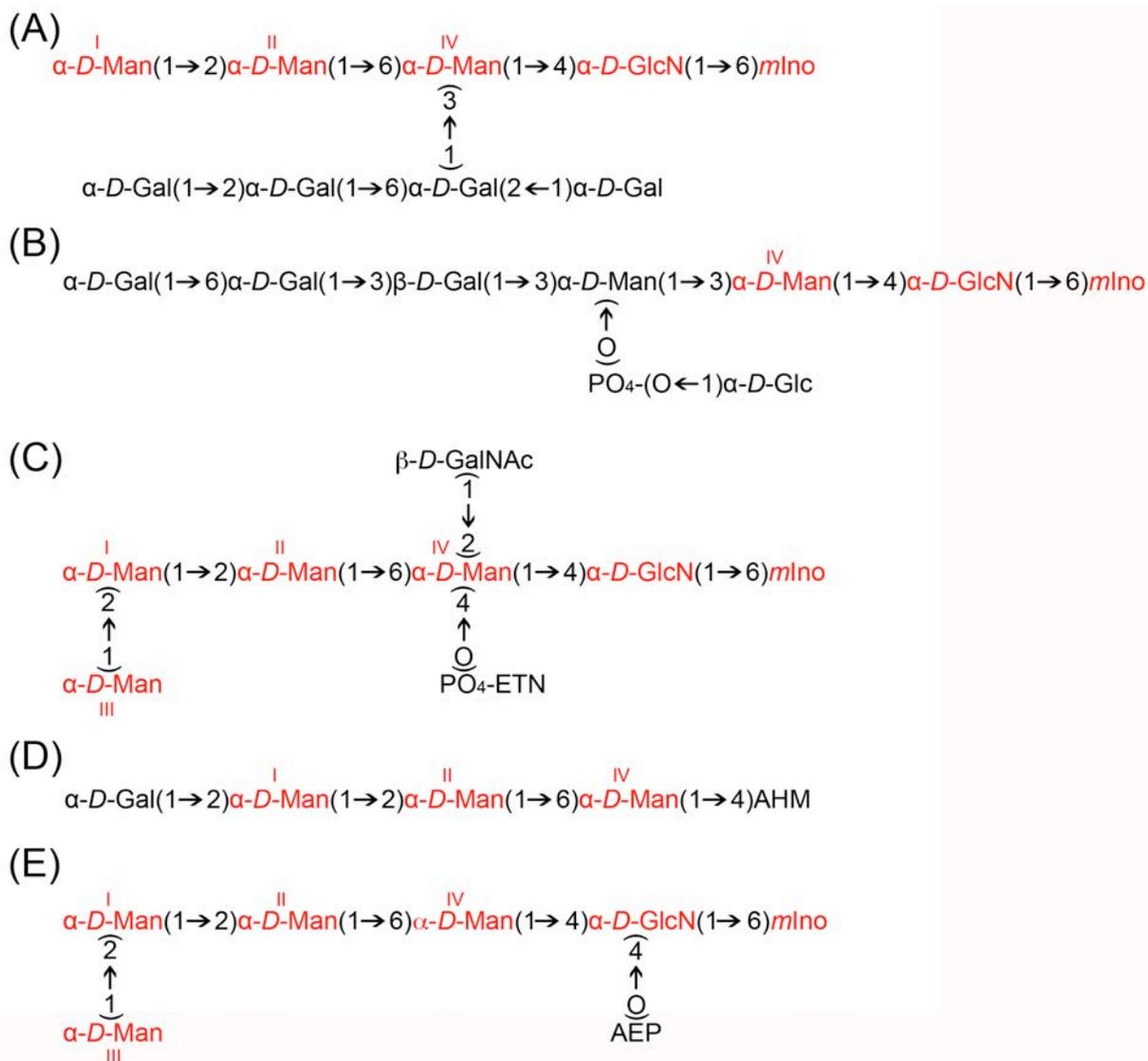
**Supplementary Table 2.** Area per lipid and thickness of POPC. The values obtained from the simulated systems were compared to previous experimental<sup>1</sup> and theoretical<sup>2</sup> data.

	<b>Area per Lipid (nm<sup>2</sup>)</b>	<b>Thickness (nm)</b>
Experimental <sup>1</sup>	0.683	3.70
Theoretical <sup>2</sup>	0.638	3.46
System A	0.703 ± 0.01	3.47 ± 0.05
System B	0.684 ± 0.01	3.53 ± 0.04
System C	0.684 ± 0.01	3.57 ± 0.05
System D	0.683 ± 0.01	3.53 ± 0.04



**Supplementary Figure 5.** Deuterium order parameters for POPC sn1 (left) and sn2 (right) chains. A POPC representation with the numbered carbons is above the graphs. This membrane propriety was measured each 20 ns of MD simulation in order to obtain the average curves with standard deviation. As can be seen, there is a good overall agreement among the order parameter profiles calculated.

### GPI-anchor analyses

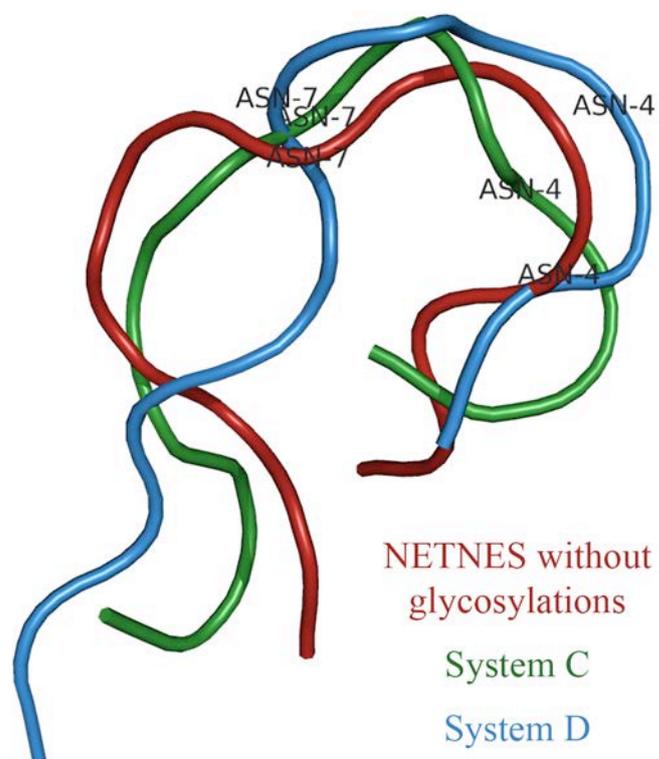


### Supplementary Figure 6. Scheme of GPI-anchor structures used for NOE comparisons.

Experimental NOE signals of the carbohydrates in red were used for NETNES GPI validation. Roman numbers were utilized in order to differentiate mannose residues. (A) *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein<sup>3</sup>, (B) *Leishmania major* GIPL-6<sup>4</sup>, (C) prion<sup>5</sup>, (D) *Trypanosoma brucei* class-2 variant surface glycoprotein<sup>6</sup>, and (E) *Trypanosoma cruzi* NETNES<sup>7</sup>.

**Supplementary Table 3.** Average  $\pm$  SD of  $\phi$ ,  $\Psi$  and  $\omega$  dihedrals from GPI glycosidic linkage. Torsion angles were measured for each carbohydrate of GPI glycan core and compared to another work with GPI MD simulations<sup>8</sup>.

Average $\pm$ SD of $\phi$ , $\Psi$ and $\omega$ dihedrals				
	ManI-(1 $\rightarrow$ 2)- ManII	ManII-(1 $\rightarrow$ 6)- ManIV	ManIV-(1 $\rightarrow$ 4)- GlcN	GlcN-(1 $\rightarrow$ 6)- mIno
Chevalier <i>et al.</i> <sup>8</sup>	$\phi$ : 90° $\Psi$ : 90° to 170° or 180° to 220°	$\phi$ : 60° or 70° $\Psi$ : 180° or 90°	$\phi$ : 100° or 90° $\Psi$ : 70° or 210°	$\phi$ : 80° $\Psi$ : 60° to 120° or 170° to 240°
System B	$\phi$ : 132° $\pm$ 20° $\Psi$ : -73° $\pm$ 17°	$\phi$ : 139° $\pm$ 22° $\Psi$ : 245° $\pm$ 54° $\omega$ : 188° $\pm$ 53°	$\phi$ : 78° $\pm$ 13° $\Psi$ : 79° $\pm$ 15°	$\phi$ : 111° $\pm$ 24° $\Psi$ : 117° $\pm$ 17°
System C	$\phi$ : 108° $\pm$ 28° $\Psi$ : -104° $\pm$ 26°	$\phi$ : 114° $\pm$ 31° $\Psi$ : 176° $\pm$ 22° $\omega$ : 157° $\pm$ 51°	$\phi$ : 83° $\pm$ 13° $\Psi$ : 83° $\pm$ 13°	$\phi$ : 104° $\pm$ 20° $\Psi$ : 119° $\pm$ 16°
System D	$\phi$ : 147° $\pm$ 21° $\Psi$ : -69° $\pm$ 12°	$\phi$ : 99° $\pm$ 22° $\Psi$ : 164° $\pm$ 30° $\omega$ : 180° $\pm$ 25°	$\phi$ : 78° $\pm$ 12° $\Psi$ : 81° $\pm$ 11°	$\phi$ : 75° $\pm$ 12° $\Psi$ : 95° $\pm$ 11°

*NETNES analyses*

**Supplementary Figure 7.** Peptide conformation. The whole peptide in the last frame of each MD simulations was represented as cartoon. All atoms of those frames were used for fitting, showing NETNES bends, mainly the one near the N-glycosylation sites.

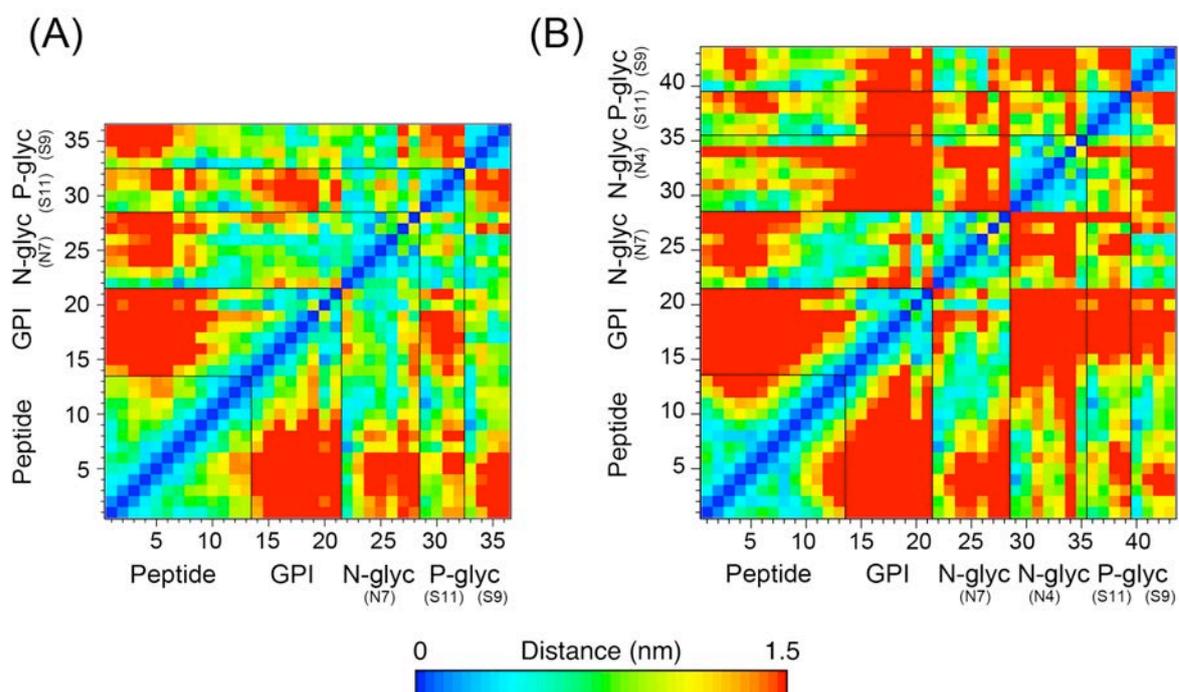
**Supplementary Table 4.** Structural description of glycosidic  $\phi$ ,  $\Psi$  and  $\omega$  dihedrals(average  $\pm$  SD) from N- and P-glycosylations.

Average $\pm$ SD of $\phi$ , $\Psi$ and $\omega$ dihedrals				
N-glyc.	System C		System D	
	ASN7	ASN4	ASN4	ASN7
GlcNAcII-	$\phi$ : $-82^\circ \pm 12^\circ$	$\phi$ : $-83^\circ \pm 14^\circ$	$\phi$ : $-90^\circ \pm 13^\circ$	
(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAcI	$\Psi$ : $111^\circ \pm 11^\circ$	$\Psi$ : $115^\circ \pm 13^\circ$	$\Psi$ : $106^\circ \pm 12^\circ$	
ManV-(1 $\rightarrow$ 4)-	$\phi$ : $-79^\circ \pm 14^\circ$	$\phi$ : $-93^\circ \pm 16^\circ$	$\phi$ : $-86^\circ \pm 15^\circ$	
GlcNAcII	$\Psi$ : $105^\circ \pm 11^\circ$	$\Psi$ : $89^\circ \pm 16^\circ$	$\Psi$ : $104^\circ \pm 12^\circ$	
ManVI-(1 $\rightarrow$ 3)-	$\phi$ : $132^\circ \pm 17^\circ$	$\phi$ : $141^\circ \pm 18^\circ$	$\phi$ : $135^\circ \pm 16^\circ$	
ManV	$\Psi$ : $-79^\circ \pm 14^\circ$	$\Psi$ : $-74^\circ \pm 14^\circ$	$\Psi$ : $-74^\circ \pm 13^\circ$	
ManVII-(1 $\rightarrow$ 6)-	$\phi$ : $79^\circ \pm 12^\circ$	$\phi$ : $82^\circ \pm 14^\circ$	$\phi$ : $113^\circ \pm 28^\circ$	
ManV	$\Psi$ : $-169^\circ \pm 11^\circ$	$\Psi$ : $-157^\circ \pm 15^\circ$	$\Psi$ : $-171^\circ \pm 15^\circ$	
	$\omega$ : $-177^\circ \pm 14^\circ$	$\omega$ : $-178^\circ \pm 14^\circ$	$\omega$ : $-165^\circ \pm 17^\circ$	
ManVIII-(1 $\rightarrow$ 3)-	$\phi$ : $146^\circ \pm 16^\circ$	$\phi$ : $140^\circ \pm 16^\circ$	$\phi$ : $137^\circ \pm 17^\circ$	
ManVII	$\Psi$ : $-74^\circ \pm 12^\circ$	$\Psi$ : $-74^\circ \pm 12^\circ$	$\Psi$ : $-74^\circ \pm 13^\circ$	
			$\phi$ : $105^\circ \pm 28^\circ$	
ManIX-(1 $\rightarrow$ 6)-	$\phi$ : $107^\circ \pm 27^\circ$	$\phi$ : $127^\circ \pm 31^\circ$	$\Psi$ : $-173^\circ \pm 31^\circ$	
ManVII	$\Psi$ : $-169^\circ \pm 41^\circ$	$\Psi$ : $-180^\circ \pm 35^\circ$	$\omega$ : $-14^\circ \pm 101^\circ$	
	$\omega$ : $-147^\circ \pm 40^\circ$	$\omega$ : $-140^\circ \pm 47^\circ$		

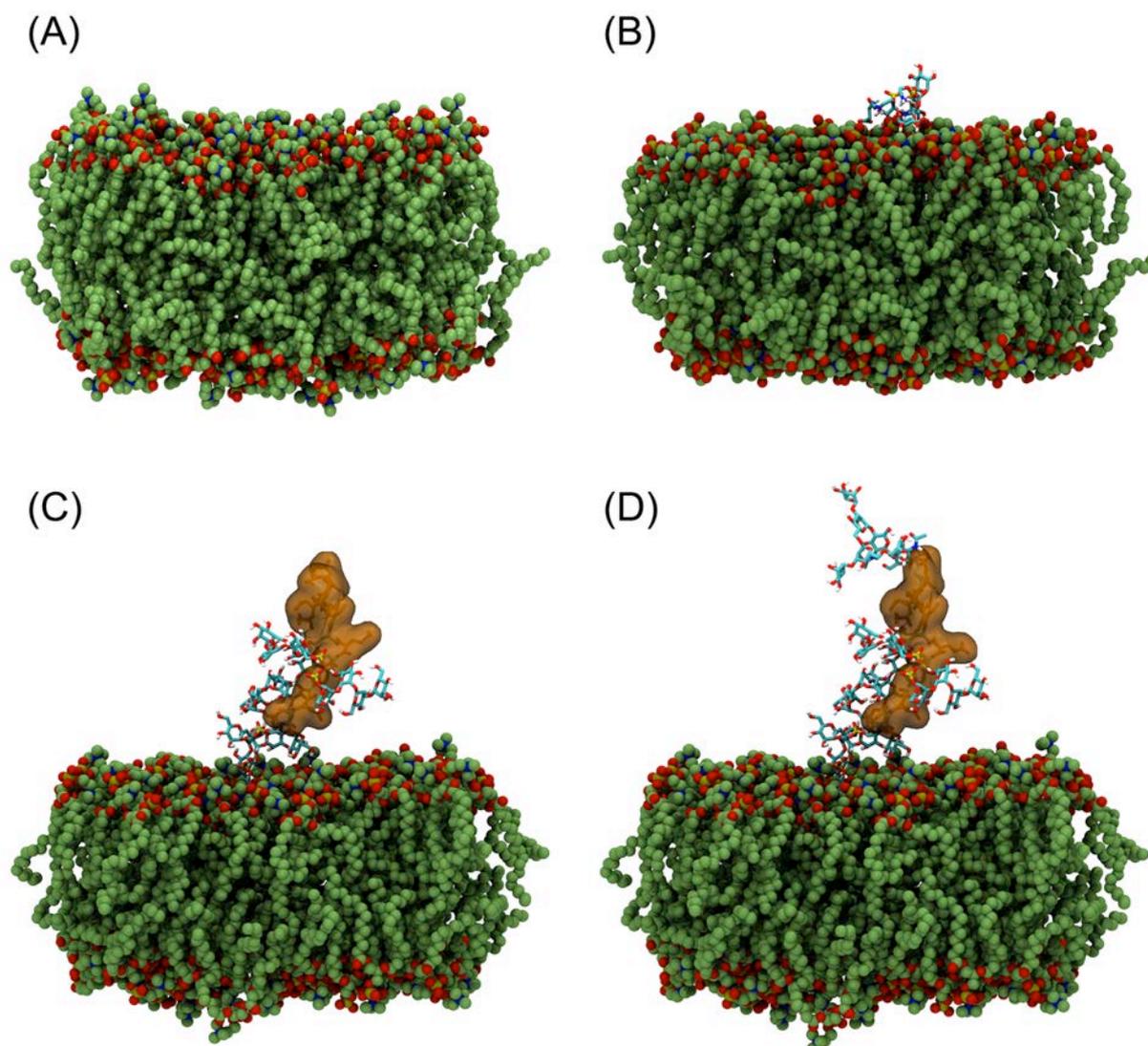
<b>P-glyc.</b>	SER9	SER11	SER9	SER11
ManXI-(1→2)-	$\phi: -69^\circ \pm 14^\circ$	$\phi: -64^\circ \pm 14^\circ$	$\phi: -68^\circ \pm 16^\circ$	$\phi: -81^\circ \pm 17^\circ$
ManX	$\Psi: -72^\circ \pm 13^\circ$	$\Psi: -71^\circ \pm 13^\circ$	$\Psi: -79^\circ \pm 16^\circ$	$\Psi: -84^\circ \pm 20^\circ$
ManXII-(1→2)-	$\phi: -85^\circ \pm 17^\circ$	$\phi: -85^\circ \pm 15^\circ$	$\phi: -84^\circ \pm 17^\circ$	$\phi: -87^\circ \pm 16^\circ$
ManXI	$\Psi: -122^\circ \pm 15^\circ$	$\Psi: -116^\circ \pm 16^\circ$	$\Psi: -120^\circ \pm 15^\circ$	$\Psi: -113^\circ \pm 13^\circ$
ManXIII-(1→2)-	$\phi: -87^\circ \pm 34^\circ$	$\phi: -92^\circ \pm 36^\circ$	$\phi: -89^\circ \pm 35^\circ$	$\phi: -69^\circ \pm 15^\circ$
ManXII	$\Psi: -109^\circ \pm 18^\circ$	$\Psi: -104^\circ \pm 19^\circ$	$\Psi: -110^\circ \pm 18^\circ$	$\Psi: -102^\circ \pm 14^\circ$

**Supplementary Table 5.** Contribution of the first five Principal Components and their respective cosine content. Only the protein backbone portion was used for principal component analysis.

		<b>System C</b>	<b>System D</b>
<b>PC 1</b>	Contribution	44.8%	64.9%
	Cosine Content	0.59	0.28
<b>PC 2</b>	Contribution	9.6%	10.2%
	Cosine Content	0.01	0.09
<b>PC 3</b>	Contribution	5.5%	5.8%
	Cosine Content	$2.4 \times 10^{-4}$	$2.3 \times 10^{-3}$
<b>PC 4</b>	Contribution	3.2%	3.1%
	Cosine Content	0.05	0.01
<b>PC 5</b>	Contribution	2.4%	2.7%
	Cosine Content	$1.9 \times 10^{-5}$	0.05



**Supplementary Figure 8.** Contact maps between peptide and glycans. These maps indicate the proximity of the residues in (A) system C and (B) system D, and were performed with an average over the entire simulation length. Maps of the last frames were made and the results were extremely similar; therefore, it is not shown here.



**Supplementary Figure 9.** The four systems submitted to MD simulations. (A) System A, composed of POPC (spheres). (B) System B, composed of POPC and GPI-anchor (sticks). (C) System C, comprised of POPC, GPI-anchor, one N- and two P-glycosylations (represented in sticks) and NETNES peptide (orange surface and sticks). (D) System D has a very similar composition of system C, the only difference is the presence of two N-glycosylations.

## References

1. Kučerka, N.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. *J. Membrane Biol.* **2005**, *208*, 193-202.
2. Poger, D.; Mark, A. E. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 325-336.
3. Homans, S. W.; Edge, S. C. J.; Ferguson, M. A. J.; Dwek, R. A.; Rademacher, T. W. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2881-2887.
4. Weller, C. T.; McConville, M.; Homans, S. W. *Biopolymers* **1994**, *34*, 1155-1163.
5. Zuegg, J.; Gready, J. E. *Glycobiol.* **2000**, *10*, 959-974.
6. Mehlert, A.; Richardson, J. M.; Ferguson, A. J. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 379-392.
7. MacRae, J. I.; Acosta-Serrano, A.; Morrice, N. A.; Mehlert, A.; Ferguson, M. A. J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12201-12111.
8. Chevalier, F.; Lopez-Prados, J.; Perez, S.; Martín-Lomas, M.; Nieto, P. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *15*, 3489-3498.

### 4.3 Trabalho II

## Conformational characterization of GM1, GD1b and GT1b gangliosides

Carla Gottschald Chiodi & Hugo Verli

*Carbohydr. Res. In preparation.*

Gangliosídeos são glicoesfingolípídeos ácidos, devido aos resíduos de ácido siálico, presentes em todas as células de mamíferos, particularmente abundantes no sistema nervoso, onde estão envolvidos em processos biológicos e relacionados a outras patologias. A fim de melhorar o entendimento das interações dessas moléculas, a caracterização da estrutura tridimensional é necessária, entretanto a grande flexibilidade, polaridade e proximidade com a superfície de membrana dificultam a obtenção de dados conformacionais por técnicas experimentais, fazendo com que os métodos teóricos se tornem uma ferramenta promissora. Nesse contexto, o presente trabalho objetiva caracterizar os gangliosídeos GM1, GD1b e GT1b, a nível atômico, empregando simulações de dinâmica molecular, considerando diferentes campos de força, meio, hidrogênios implícitos e explícitos e grandes escalas de tempo.

Os resultados mostram a dificuldade na reprodução dos dados experimentais e a complexidade estrutural dessas moléculas. Apesar disso, as simulações com o campo GLYCAM, quando associadas a restrições de distâncias, e com o GROMOS96 apresentaram valores de distância entre hidrogênios bem similares aos obtidos com as técnicas de RMN e cristalografia. Logo a metodologia utilizada se mostrou válida para descrição conformacional dos gangliosídeos GM1, GD1b e GT1b em solução.

# Structural glycobiology of gangliosides:

## A comparative molecular mechanics study of GM1, GD1b and GT1b

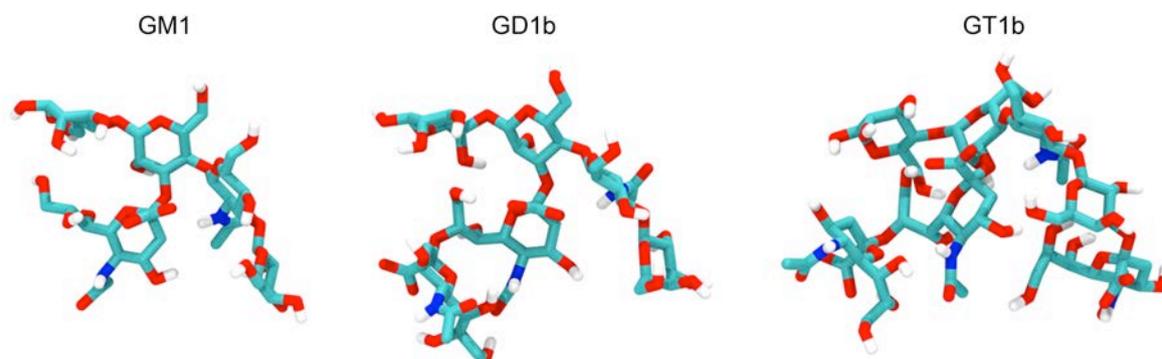
*Carla G. Chiodi<sup>a</sup>, Hugo Verli<sup>a\*</sup>*

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

---

\*Corresponding author. Tel.: +55-51-3316-7770; fax: +55-51-3316-7309; e-mail address:  
hverli@cbiot.ufrgs.br. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Av Bento Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil

### *Graphical Abstract*



### *Highlights*

- United atom force field simulations are in good agreement with experimental data;
- Using distance restraints, all-atom force field describe quite well gangliosides;
- One of the most elaborated work of gangliosides' conformational characterization;
- A reliable methodology to reproduce experimental data.

***Abstract***

Gangliosides are acid glycosphingolipids that exist predominantly in microdomains of mammal cells surface, playing important roles in normal biological and disease-related processes. The characterization of a three-dimensional model of those molecules is necessary in order to gain a better understanding of their functions and complexity. Since gangliosides present high flexibility, polarity and proximity to membrane surfaces, it is very difficult to obtain their structures using experimental techniques. In this context, the current work aims to employ MD simulations with different force fields, comparing the obtained data with previous experimental ones, in order to characterize GM1, GD1b and GT1b conformations in solution, evaluate the methodology and obtain a reliable model for them at the atomic level. Our results points out the structural complexity of gangliosides and the difficulty to reproduce the experimental data. In spite of that, GLYCAM, when simulated with distance restraints, and GROMOS96 showed to be prominent force fields to replicate NMR and X-ray crystallography techniques according to interresidues hydrogen distances. Overall, the employed methodology was capable of characterizing GM1, GD1b and GT1b conformation in solution.

***Keywords:*** Molecular Dynamics; Ganglioside; GLYCAM; GROMOS96; NOE signals.

## 1. Introduction

Gangliosides are highly polar acid glycosphingolipids, because their signature feature is the presence of at least one sialic acid on the structure besides all other carbohydrates<sup>1</sup>. Those molecules exist predominantly in microdomains of mammal cells surface<sup>2</sup>; therefore, they are responsible for cellular interactions with extracellular environment, playing important roles in normal biological functions, for example, neurodifferentiation, synaptogenesis, synaptic transmission<sup>3</sup>. In fact they are required for disease-related processes as well, because gangliosides are targets for some virus, like influenza<sup>4,5</sup>, rotavirus<sup>6</sup>, human immunodeficiency virus<sup>7</sup>, and bacterial toxins, as tetanospasmin, botulinum toxin, cholera toxin<sup>8</sup>. Thus, there is an increase of works trying to comprehend those molecules structural complexity, metabolism, biological functions, pathological implications, protein-carbohydrate interactions and drug design<sup>9,10</sup>.

In order to gain a better understanding of these cell-surface interactions, the characterization of a three-dimensional structure is necessary; however, the gangliosides' high flexibility, polarity and proximity to membrane surfaces hinder the structure obtainment by experimental techniques. Therefore, theoretical methods, as molecular dynamics (MD) simulations, combined with experimental data, are promising tools for conformational description of glycoconjugates in solution<sup>11,12</sup>. In this context, the current work aims to characterize, at the atomic level, the structure of gangliosides GM1, GD1b and GT1b, employing MD simulations with different force fields. Those simulations were compared to NOE signals from NMR experiments and to hydrogen distances in crystallographic data deposit on Protein Data Bank (PDB), in order to characterize their conformation in solution and validate the employed methodology.

## 2. Results

### 2.1. *Metadynamics conformational analysis*

Metadynamics method was employed in order to obtain the minimum energy conformation for the structures:  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -D-NeuAc,  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal,  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GalNAc,  $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glc, and  $\beta$ -D-GalNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Gal (Supplementary Figure S1 and Supplementary Figure S2). All minima orientations of each disaccharide were submitted to MD simulations after Metadynamics in order to obtain the most abundant dihedral for glycosidic linkage. Analyzing  $\phi$ ,  $\Psi$  and  $\omega$  dihedrals distribution, we could observe that most of them have converged during simulations, even when comparing the different force fields. In fact the only exceptions were the dihedrals  $\Psi$  and  $\omega$  of  $\alpha$ -D-NeuAc-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -D-NeuAc (Supplementary Figure S3). Initial structures of gangliosides were built with those most abundant dihedral angles and then submitted to MD simulations.

### 2.2 *MD simulations*

In order to analyze the gangliosides structures in solution, those molecules were submitted to 4 different MD simulations: 1) GROMOS96 force field and water environment; 2) GROMOS96 force field and DMSO with water environment; 3) GLYCAM force field and water environment; 4) GLYCAM force field, water environment and distance restraints. The DMSO:water was used because NMR experimental data were obtained in this environment. Distance restraints were employed in GLYCAM MD simulations in order to compel the structure to reproduce NMR NOE signals.

Distribution of glycosidic linkage dihedrals (Figure 1) and hydrogens distances (Tables 1, 2 and 3, and Supplementary Figure S4) were measured and analyzed in all

simulations. Moreover, the latter one was compared to previous NMR and crystallographic data, as can be seen below for each molecule.

### **2.2.1 GM1**

According to Table 1, in GROMOS96 simulations, most of the distances measured are in good agreement with experimental data, except for NOEs between: 1) SiaA H3 and GalD H4; and 2) SiaA H9 and GalE H1. However their values were very similar to the ones measured on crystal structures deposited on PDB and on GLYCAM simulation without restraints. The hydrogen distance between GalE H1 and GalNAc H4 decreased, becoming similar to NMR value, when GM1 was simulated with DMSO and water.

When comparing the force fields results, GLYCAM presented 3 more values out of the range of experimental ones. Using distance restraints, all NOE signals are good agreement with experimental data, except for the ones between GalNAC H1 and GalD H3, and between SiaA H3a and GalD H3. The latter one has a distance slightly bigger. The former, however, is in accordance with crystal structures.

### **2.2.2 GD1b**

As can be seen on Table 2, results for GD1b are not in a good agreement with NMR data. The presence of DMSO even worsened hydrogens distance on linkage II. The restraints made the values got better, but only 2 of them become in accordance with NMR. And again those distances out of NOE signals range are in agreement with crystallographic data.

### **2.2.3 GT1b**

Most of distances on GT1b simulations are in good agreement with NMR data and, once more, the other distances are in good agreement with the ones of the crystal structures. On GROMOS96 simulations, the presence of DMSO only made one value

better, differently from GLYCAM MD simulations with restraints, which had the best structural concordance between theoretical and experimental data.

#### **2.2.4 Dihedrals distribution**

According to Figure 1, dihedrals distribution of linkage GalD(1→4)Glc (linkage I) is very similar among all simulations, even for the different force fields. Analyzing GalNAc(1→4)GalD (linkage II), we can observe a change in  $\phi$  and  $\psi$  distributions in comparison to disaccharide simulations when GROMOS96 was used. However gangliosides simulated with GLYCAM force field presented similar dihedral distribution to disaccharide, excluding GT1b with restraints (violet curve), showing this distance limitation induced a change on  $\psi$  dihedral angle and maybe due to that the hydrogen distance increased (Table 3). Comparing both force fields, we can observe that  $\phi$  distributions are different, but the  $\psi$  are very similar.

GalE(1→3)GalNAc (linkage III) dihedrals have similar distributions for both force fields and between gangliosides and disaccharide. Again the only exception was GT1b simulation with restraints using GLYCAM (violet curve). Since the distance restriction imposed on GM1 and GD1b didn't change  $\phi$  and  $\psi$  angles, probably the one that caused that on GT1b was between SiaC H9 and GalNAc H1.

Disaccharide dihedral angles of SiaA(2→3)GalD (linkage IV) were very similar between the force fields, however they are dissimilar to the whole gangliosides simulations with GROMOS96. In addition, the presence of DMSO modified GD1b distribution (yellow curve on GROMOS96 graphs), becoming similar to distribution and hydrogen distance on GLYCAM GD1b simulation. Regarding GLYCAM,  $\phi$  dihedral is different for simulations employing restraints. In that case, GM1 (blue) is alike GROMOS96 curves and have better NOE accordance to experimental values (Table 1), indicating that this angle, which is

naturally populated on the united atom force field, is probably the most suitable for reproducing this molecule's experimental conformation. Concerning  $\phi$  dihedral of GD1b and GT1b simulations with distance restraints (yellow and violet curves), they are different from the other distributions for that molecule, yet those dihedral angles are also more appropriate in order to reproduce experimental conformation since, according to Tables 2 and 3, those GLYCAM simulations with restraints have all hydrogen distances in agreement with NMR data.

For SiaC(2→3)GalE (linkage VI) all distributions were very much alike, presenting slightly differences in  $\psi$  on GT1b with restraints and in  $\phi$  on GT1b of GROMOS96. Regarding  $\alpha$ -D-NeuAc-(2→8)- $\alpha$ -D-NeuAc (linkage V), dihedrals  $\Psi$  and  $\omega$  have different degrees on disaccharide simulations, as have already been mentioned on metadynamics analysis (item 2.1). Gangliosides dynamics with GLYCAM force field show almost the same distribution as the disaccharide. However this did not happen on GROMOS96, whose  $\Psi$  and  $\omega$  curves dislocate to values similar to GLYCAM. The only different dihedral between the force fields was  $\phi$ . Besides, according to linkage V hydrogen distances results (Table 2), GROMOS96 presented better values than GLYCAM, pointing out that  $\phi$  dihedral degrees, obtained on united atom simulations, are more suitable for reproducing this glycosidic linkage's NMR conformation.

### 3. Discussion

Gangliosides are negative charged glycolipids, whose saccharidic portion is highly polar and flexible. Those characteristics coupled with the fact of proximity to membrane surface hamper the conformation characterization by experimental techniques. Therefore,

theoretical methods, when in conjunction and validated with experimental information, is a promising tool for describe glycan structures<sup>12</sup>.

Methodology employed in this work for carbohydrates construction and simulation have already been used and validated in previous works<sup>13,14,15</sup>. Validation of saccharides MD simulations often consists in comparing interresidues hydrogen distances with NOE signals obtained on previous NMR. Accordingly, our results point out the structural complexity of gangliosides and the difficulty to reproduce experimental data, mainly the glycosidic linkages involving sialic acid residues. Nevertheless, MD simulations employing the united atom force field, GROMOS96, presented, in general, hydrogen distances more similar to the ones obtained from both NMR and X-ray crystallography techniques. However, this scenario changes when distance restraints are employed with GLYCAM force field, demonstrating the potential of this tool to reproduce experimental data. Moreover, this is the first work, and one of the most detailed, that evaluate gangliosides structure considering different force fields, solvation, implicit and explicit hydrogens, large time scales. Accordingly, our results proved the validity of the methodology in characterizing GM1, GD1b and GT1b conformation in solution.

## **4. Experimental**

### ***4.1 Computational methods***

#### ***4.1.1 Nomenclature and topology***

IUPAC nomenclature and symbols<sup>16</sup> and Svernerholm designation<sup>17</sup> have been adopted for disaccharides and the whole gangliosides, respectively. Five disaccharides were evaluated regarding the relative orientation, that is described by two or three torsional angles at the glycosidic linkages, in order to construct glycan moieties. The linkage types

studied in this work were: (1→X), where “X” was “3” or “4”, and (2→X), where “X” was “3” or “8”. The  $\phi$  and  $\psi$  were defined as:

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

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

For (1 → 6) linkage,  $\omega$  was defined as:

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

Each disaccharide was built in Molden<sup>18</sup>. Their respective GROMOS96 topologies were obtained from PRODRG server<sup>19</sup>. Improper dihedrals to preserve hexopyranose conformations in solution and HF/6-31\*\*<sup>20</sup>-derived Löwdin charges were included in those topologies as described previously<sup>13,14,20</sup>. Regarding GLYCAM topologies, disaccharides and the whole gangliosides were built on the server *Online Carbohydrate Builder*<sup>21</sup> and their parameters, given in AMBER format, were converted to GROMACS format using the Python tool ACPYPE<sup>22</sup>.

#### **4.1.2 Metadynamics energy contour maps**

Metadynamics energy sampling explores the free energy surface according to a set of collective variables, which can be angles, distances, potential energies, coordinates and others<sup>23,24</sup>. These calculations were performed using GROMACS 4.5.4 simulation suite<sup>25</sup> with PLUMED implementation<sup>26</sup>. Two different force fields were employed separately: GROMOS96 43a1<sup>27</sup> and GLYCAM06<sup>28</sup>. Independent simulations were carried out evaluating  $\phi$  and  $\psi$  or  $\omega$  and  $\psi$  dihedrals as collective variables in a 10 ns based sampling. These variables were written every 10 ps, and the gaussian potentials were added every 200 ps with a height of 0.1 kcal mol<sup>-1</sup> and a width of 0.5 radians. The disaccharides were solvated with either SPC<sup>29</sup> or TIP3P<sup>30</sup> water models in triclinic boxes using periodic boundary conditions. Temperature and pressure were kept constant at 298 K and 1 atm

using Nosé-Hoover thermostat<sup>31,32</sup>, Parrinello-Rahman barostat<sup>33,34</sup> and coupling constants of  $\tau = 0.1$  and  $1.0$  ps, respectively. The Lincs method<sup>35</sup> was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of  $2$  fs. Electrostatic interactions were calculated using Reaction Field<sup>36</sup>. The dielectric constant was treated as  $\epsilon = 66$ , and the calculations for the optimal fast Fourier transform plan for the grid was enabled. The energy minima were submitted to conventional MD simulation, using GROMOS96 43a1<sup>27</sup> and GLYCAM force fields<sup>28</sup> and a protocol previously described<sup>13,14</sup>. The most abundant dihedrals in solution were used to build GM1, GD1b and GT1b ganglioside initial structures.

#### **4.1.3 MD simulations**

In order to perform the MD simulations with GROMACS 4.5.4 package<sup>25</sup> using GROMOS96 43a1<sup>27</sup> and GLYCAM06<sup>28</sup>, the systems were solvated with SPC<sup>29</sup> and TIP3P<sup>30</sup> water models, respectively, and neutralized with ions in a triclinic box using periodic boundary conditions. For some GROMOS96 simulations, the box was solvated with a mixture of DMSO<sup>37</sup> and SPC water (98:2 v/v). Temperature and pressure were kept constant at  $310$  K and  $1$  atm using Velocity Rescale thermostat<sup>38</sup>, Berendsen barostat<sup>39</sup> and coupling constants of  $\tau = 0.1$  and  $0.5$  ps, respectively. The Lincs method<sup>35</sup> was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of  $2$  fs after a Steepest Descents minimization. Electrostatic interactions were calculated using Particle Mesh Ewald<sup>40</sup>.

Some GLYCAM MD simulations were performed with distance restraints of  $1\ 000$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  on the hydrogen atoms in order to reproduce NOE signals from experimental data. Regarding the analysis, distance calculations were performed with `g_mindist` of GROMACS package on the whole trajectory of  $200\ 000$  frames.

## Acknowledgments

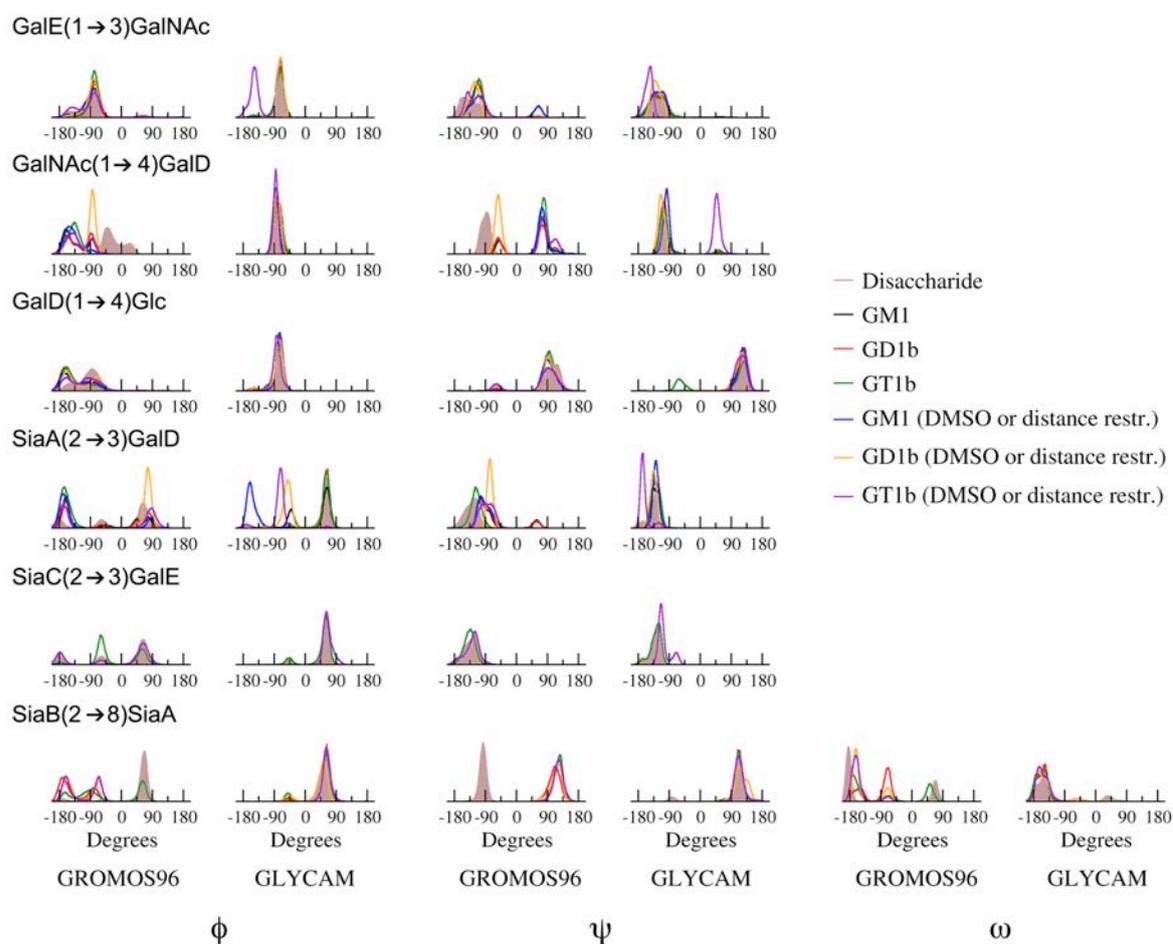
This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), MCT, by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), MEC, Brasília, DF, Brazil, and by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

## References

1. Cantù, L.; Del Favero, E.; Sonnino, S.; Prinetti, A. *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164*, 796-810.
2. DeMarco, M. L.; Woods, R. J. *Glycobiology* **2009**, *19*, 344-355.
3. Mandal, P. K.; Pettegrew, J. W. *Neurochem. Res.* **2004**, *29*, 447-453.
4. Suzuki, Y.; Nakao, T.; Ito T.; Watanabe, N.; Toda, Y.; Guiyun, X.; Suzuki, T.; Kobayashi, T.; Kimura, Y.; Yamada, A.; Sugawara, K.; Nishimura, H.; Kitame, F.; Nakamura, K.; Deya, E.; Kiso, M.; Hasegawa, A. *Virology* **1992**, *189*, 121-131.
5. Sato, T.; Serizawa, T.; Okahata, Y. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1996**, *1285*, 14-20.
6. Guo, C.-T.; Nakagomi, O.; Mochizuki, M.; Ishida, H.; Kiso, M.; Ohta, Y.; Suzuki, T.; Miyamoto, D.; Hidari, R. I. P. J.; Suzuki, Y. *J. Biochem.* **1999**, *126*, 683-688.
7. Hug, P.; Lin, H. M.; Korte, T.; Xiao, X.; Dimitrov, D. S.; Wang, J. M.; Puri, A.; Blumenthal, R. *J. Virol.* **2000**, *74*, 6377-6385.
8. Eidels, L.; Proia, R. L.; Hart, D. A. *Microbiol. Rev.* **1983**, *47*, 596-620.
9. Zhang, X.; Kiechle, F. L. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **2004**, *34*, 3-13.
10. Sonnino, S.; Mauri, L.; Chigorno, V.; Prinetti, A. *Glycobiology* **2006**, *17*, 1R-13R.
11. van Gunsteren, W.F.; Mark, A.E. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 947-961.
12. Pol-Fachin, L.; Verli, H. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2011**, *8*, 229-238.

13. Pol-Fachin, L.; Fernandes, C. L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 491-500.
14. Fernandes, C. L.; Sachett, L. G.; Pol-Fachin, L.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 663-671.
15. Pedebos, C.; Pol-Fachin, L.; Verli, H. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1196-1200.
16. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *Pure Appl. Chem.*, **1996**, *68*, 1919-2008.
17. Svennerholm, L. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1980**, *125*, 11-19.
18. Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 123-134.
19. Schüttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F. *Acta Crystallogr.* **2004**, *D60*, 1355-1363.
20. Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Verli, H. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1499-1507.
21. Woods Group. Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, GA, **2005-2013**.
22. Sousa da Silva, A. W.; Vranken, W. F. *BMC Research Notes* **2012**, *5*, 367-374.
23. Laio, A.; Parrinello, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 12562-12566.
24. Laio, A.; Gervasio, F. L. *Rep. Prog. Phys.* **2008**, *71*, 126601-126622.
25. van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. *C. J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701-1718.
26. Bonomi, M.; Branduardi, D.; Bussi, G.; Camilloni, C.; Provasi, D.; Raiteri, P.; Donadio, D.; Marinelli, F.; Pietrucci, F.; Broglia R. A.; Parrinello, M. *Comp. Phys. Comm.* **2009**, *180*, 1961-1972.
27. van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krueger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G. Vdf Hochschulverlag AG, Zurich, Suíça, **1996**.

28. Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschampel, S. M.; Gonzalez-Outeirino, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 622-655.
29. Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269-6271.
30. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R.W.; Klein, M. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.
31. Nosé, S. *Mol. Phys.* **1984**, *52*, 255-68.
32. Hoover, W. G. *Phys Rev. A* **1985**, *31*, 1695-1697.
33. Parrinello, M.; Rahman, A. *J. Appl. Phys.* **1981**, *52*, 7182-7190.
34. Nosé, S.; Klein, M. L. *Mol. Phys.* **1983**, *50*, 1055-1076.
35. Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463-1472.
36. Tironi, I. G.; Sperb, R.; Smith, P. E.; van Gunsteren, W. F. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 5451-5459.
37. Vishnyakov, A.; Lyubartsev, A. P.; Laaksonen A. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 1702-1710.
38. Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101.
39. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.
40. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089-10092.



**Figure 1.** Dihedrals distributions in each MD simulation. Glycosidic linkage's  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\omega$  dihedrals were analyzed for all molecules, including the disaccharides, even for those simulated under different conditions, that is, GROMOS96 force field with DMSO and water environment and GLYCAM force field with distance restraints.

**Table 1.** Hydrogens distances measured on GM1 MD simulations and compared to experimental data. Roman numbers indicate molecules involved in glycosidic bond, according to Supplementary Figure S4. Results in red are not in agreement with NMR values range.

	Theoretical						Experimental			
	GM1						GM1			
	NOE	H <sub>2</sub> O MD GROMOS96	DMSO/H <sub>2</sub> O MD GROMOS96	H <sub>2</sub> O MD Glycam	H <sub>2</sub> O MD Glycam restr		DMSO/H <sub>2</sub> O NMR	3BWR Crystal	3CHB Crystal	3AYC Crystal
I	GalD(H1)-(H4)Glc	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2		2.2 (±0.0)	3.1 ± 0.8	2.4 ± 0.1	2.4
	GalD(H1)-(H6a)Glc	4.2 ± 0.8	4.2 ± 0.8	3.1 ± 0.6	2.9 ± 0.6		3.3 (-0.2)(+0.4)	3.3 ± 1.2	3.7 ± 1.0	2.3
	GalD(H1)-(H6b)Glc	4.5 ± 1.0	4.3 ± 0.9	3.3 ± 0.8	3.0 ± 0.6		≥4.0	4.6 ± 0.8	4.7 ± 1.4	3.8
II	GalNAc(H1)-(H3)GalD	3.0 ± 0.6	3.4 ± 0.4	3.9 ± 0.2	3.8 ± 0.2		3.0 (±0.1)	3.9 ± 0.0	4.0 ± 0.1	3.6
	GalNAc(H1)-(H4)GalD	2.7 ± 0.5	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.2		2.4 (±0.1)	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.2
	GalNAc(H1)-(H5)GalD	4.0 ± 0.6	4.3 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.5 ± 0.1		≥4.0	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.5
III	GalE(H1)-(H3)GalNAc	2.3 ± 0.3	2.8 ± 0.7	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.2		2.5 (±0.1)	2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.1
	GalE(H1)-(H4)GalNAc	4.3 ± 0.3	3.3 ± 1.1	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.4		3.1 (-0.1)(+0.3)	3.2 ± 0.1	3.9 ± 0.1	2.9
	SiaA(H3a)-(H3)GalD	3.1 ± 0.9	2.6 ± 0.3	3.6 ± 0.9	2.7 ± 0.3		2.3 (±0.0)	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0
IV	SiaA(H3e)-(H3)GalD	3.0 ± 1.0	2.1 ± 0.3	4.2 ± 0.4	2.2 ± 0.2		2.7 (+0.1)	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.2
	SiaA(H3a)-(H4)GalD	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.3	4.7 ± 0.4	2.3 ± 0.3		3.4 (-0.3)(+0.4)	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.9
	SiaA(H3e)-(H4)GalD	4.9 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4.6 ± 0.4	3.2 ± 0.5		3.2 (-0.2)(+0.3)	4.9 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.9
SiaA(H9b)-(H1)GalE	7.2 ± 2.6	9.8 ± 2.9	9.1 ± 1.9	2.9 ± 1.0		3.0 (±0.2)	6.5 ± 0.2	7.2 ± 0.5	7.7	

**Table 2.** Hydrogens distances measured on GD1b MD simulations and compared to experimental data. Roman numbers indicate molecules involved in glycosidic bond, according to Supplementary Figure S4. Results in red are not in agreement with NMR values range.

		Theoretical				Experimental			
		GD1b				GD1b	GD2	GD1a	GD1a
NOE		H <sub>2</sub> O	DMSO/H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	DMSO/H <sub>2</sub> O	2HRL	2VU9	3N0I
		MD GROMOS96	MD GROMOS96	MD Glycam	MD Glycam restr	NMR	Crystal	Crystal	Crystal
I	GalD(H1)-(H4)Glc	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2	<3.3	2.1	2.2	3.6
II	GalNAc(H1)-(H4)GalD	2.7 ± 0.6	3.5 ± 0.1	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.2	<3.3	2.2	2.1	2.1
III	GalE(H1)-(H3)GalNAc	2.3 ± 0.4	2.3 ± 0.5	2.4 ± 0.2	2.6 ± 0.2	2.5	-	2.1	2.0
IV	SiaA(H3a)-(H3)GalD	3.1 ± 0.9	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.1	4.2	4.2	4.1
V	SiaA(H6)-(H3a)SiaB	4.1 ± 1.0	3.6 ± 1.0	6.0 ± 0.5	5.8 ± 0.6	2.4	5.3	-	-
	SiaA(H8)-(H3e)SiaB	2.5 ± 0.4	2.5 ± 0.5	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3	2.4	3.8	-	-
	SiaB(H3e)-(H1)GalNAc	7.8 ± 1.8	8.9 ± 1.0	11.1 ± 0.5	7.8 ± 0.9	2.9	11.2	-	-
	SiaB(H3e)-(H5)GalNAc	8.0 ± 2.0	9.9 ± 1.2	12.8 ± 0.9	6.5 ± 0.9	2.9	13.2	-	-
	SiaB(H5)-(H63)GalE	11.2 ± 4.6	15.1 ± 3.3	17.0 ± 1.9	4.1 ± 1.3	<3.3	-	-	-

**Table 3.** Hydrogens distances measured on GT1b MD simulations and compared to experimental data. Roman numbers indicate molecules involved in glycosidic bond, according to Supplementary Figure S4. Results in red are not in agreement with NMR values range.

	Theoretical						Experimental				
	GT1b						GM1b	GD1a	GT1b	GD1a	GD1a
	NOE	H <sub>2</sub> O MD GROMOS96	DMSO/H <sub>2</sub> O MD GROMOS96	H <sub>2</sub> O MD Glycam	H <sub>2</sub> O MD MD Glycam restr		DMSO/H <sub>2</sub> O NMR	DMSO/H <sub>2</sub> O NMR	1FV2 Crystal	2VU9 Crystal	3N0I Crystal
I	GalD(H1)-(H4)Glc	2.2 ± 0.4	2.4 ± 0.6	2.7 ± 0.6	2.2 ± 0.2		2.1	2.2 (+0.1)	<b>2.5</b>	2.2	<b>3.6</b>
	GalD(H1)-(H6a)Glc	4.2 ± 0.8	4.2 ± 0.9	3.7 ± 0.9	3.0 ± 0.6		3.3 (-0.3)(+0.7)	2.9 ± 0.2	1.9	2.5	<b>4.2</b>
	GalD(H1)-(H6b)Glc	<b>4.6 ± 1.0</b>	<b>4.2 ± 0.9</b>	3.4 ± 1.0	3.1 ± 0.5		2.8 (-0.1)(+0.2)	3.1 (-0.3)(+0.5)	3.6	<b>3.9</b>	<b>5.4</b>
II	GalNAc(H1)-(H3)GalD	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.4	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2		≥4.0	2.8 (-0.1)(+0.2)	4.3	<b>3.8</b>	<b>3.8</b>
	GalNAc(H1)-(H4)GalD	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.5	<b>3.7 ± 0.1</b>		2.2 (-0.1)	2.3	<b>2.9</b>	2.1	2.1
	GalNAc(H1)-(H5)GalD	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.5 ± 0.3	3.9 ± 0.1		2.8 (-0.2)(+0.3)	≥4.0	5.0	4.5	4.5
III	GalE(H1)-(H3)GalNAc	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3		2.2 (-0.1)	2.4 (+0.1)	1.7	2.1	2.0
	GalE(H1)-(H4)GalNAc	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.4	3.7 ± 0.6	2.4 ± 0.2		3.3 (-0.4)(+0.7)	3.1 (-0.2)(+0.5)	3.0	2.9	2.6
IV	SiaA(H3a)-(H3)GalD	<b>3.8 ± 0.2</b>	2.6 ± 0.3	<b>4.1 ± 0.4</b>	2.2 ± 0.4		-	2.4 (+0.1)	<b>3.2</b>	<b>4.2</b>	-

SiaA(H3e)-(H3)GalD	2.6 ± 0.4	2.0 ± 0.2	4.4 ± 0.2	2.8 ± 0.4	-	2.9 (-0.2)(+0.1)	1.6	4.4	-
SiaA(H3a)-(H4)GalD	5.9 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.9 ± 0.2	2.5 ± 0.5	-	3.1 (-0.2)(+0.4)	4.7	5.0	-
SiaA(H3e)-(H4)GalD	4.8 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.3	3.8 ± 0.4	-	≥4.0	3.4	4.2	-
SiaA(H9b)-(H1)GalE	5.7 ± 1.4	7.8 ± 1.9	10.0 ± 1.1	6.6 ± 0.9	-	3.1 (-0.2)(+0.5)	6.8	10.0	-
SiaC(H3a)-(H3)GalE	2.8 ± 1.1	3.2 ± 1.0	3.9 ± 0.7	4.3 ± 0.2	≥4.0	≥4.0	4.5	4.2	2.6
SiaC(H3e)-(H3)GalE	3.6 ± 0.7	3.6 ± 0.9	4.3 ± 0.4	4.3 ± 0.2	2.7 (-0.3)(+0.8)	≥4.0	4.6	4.2	3.7
SiaC(H9b)-(H1)GalNAc	10.7 ± 2.1	10.8 ± 2.4	8.0 ± 1.5	3.1 ± 0.6	≥4.0	2.5 ± 0.1	9.7	10.6	11.2

VI

## Supplementary Data

### Structural glycobiology of gangliosides:

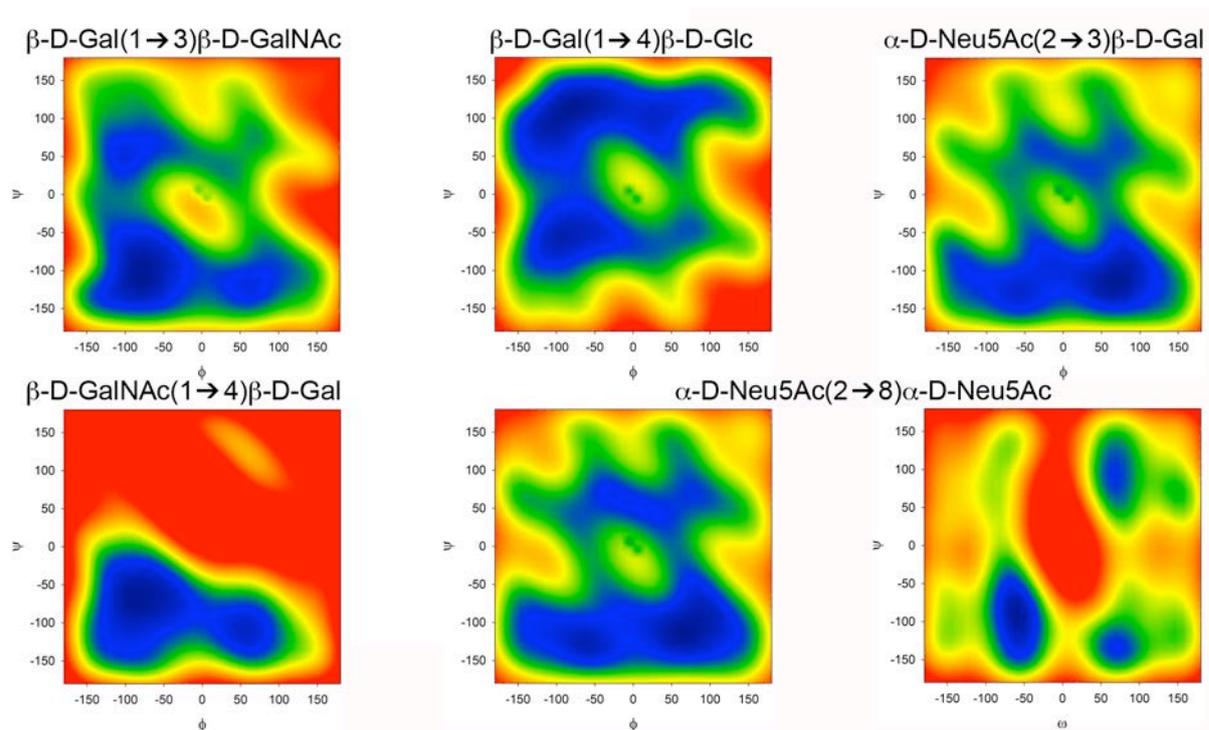
A comparative molecular mechanics study of GM1, GD1b and  
GT1b

*Carla G. Chiodi<sup>a</sup>, Hugo Verli<sup>a</sup>*

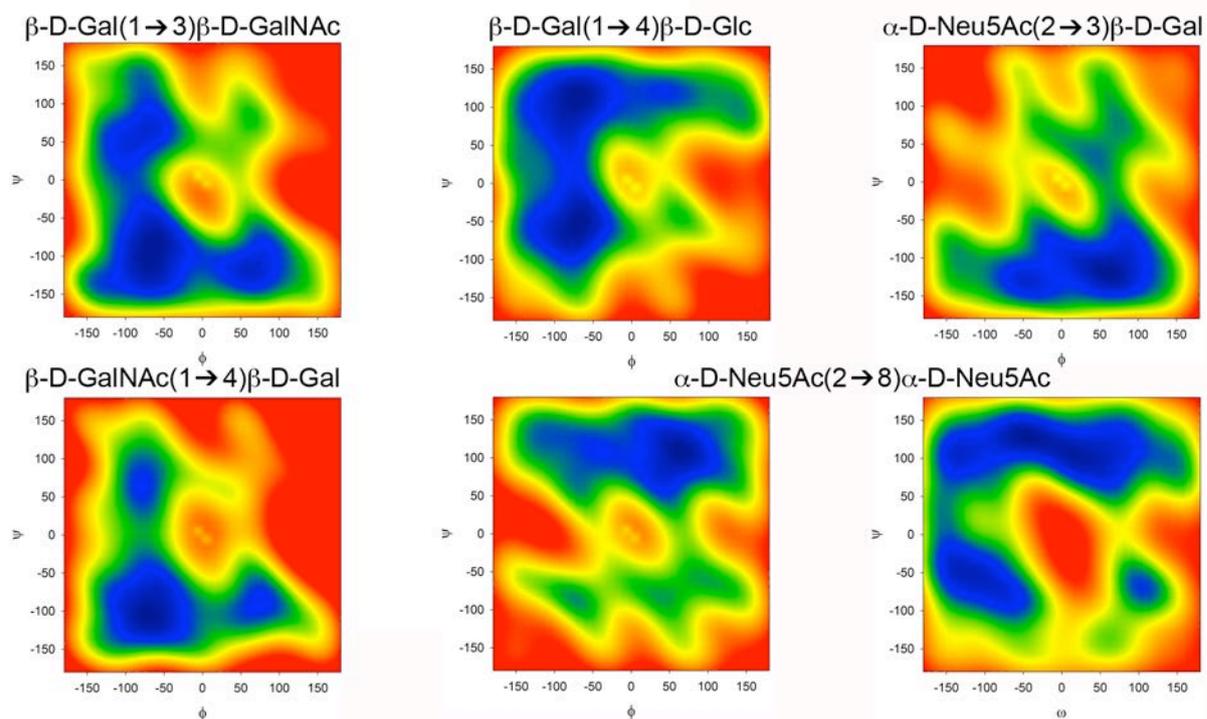
<sup>a</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento  
Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil.

---

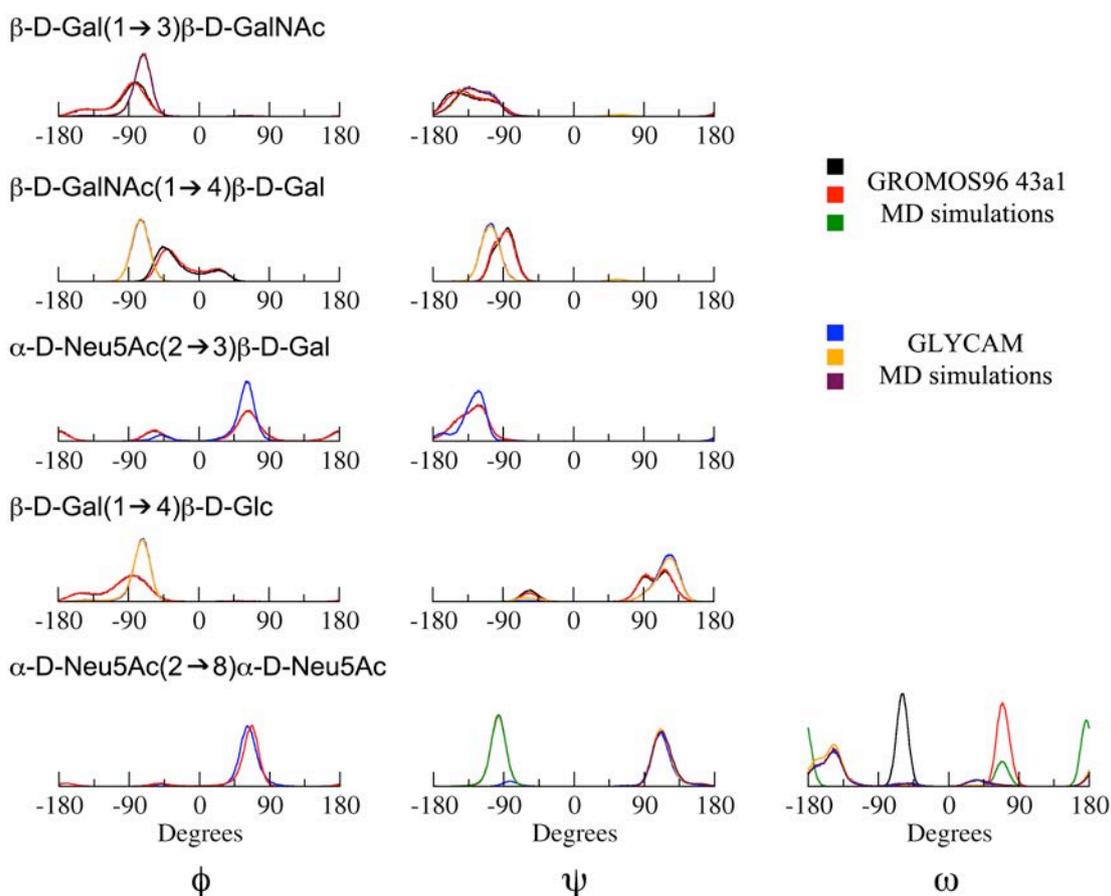
\*Corresponding author. Tel.: +55-51-3316-7770; fax: +55-51-3316-7309; e-mail address:  
hverli@cbiot.ufrgs.br. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Av Bento Gonçalves 9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil

*Metadynamics conformational analysis*

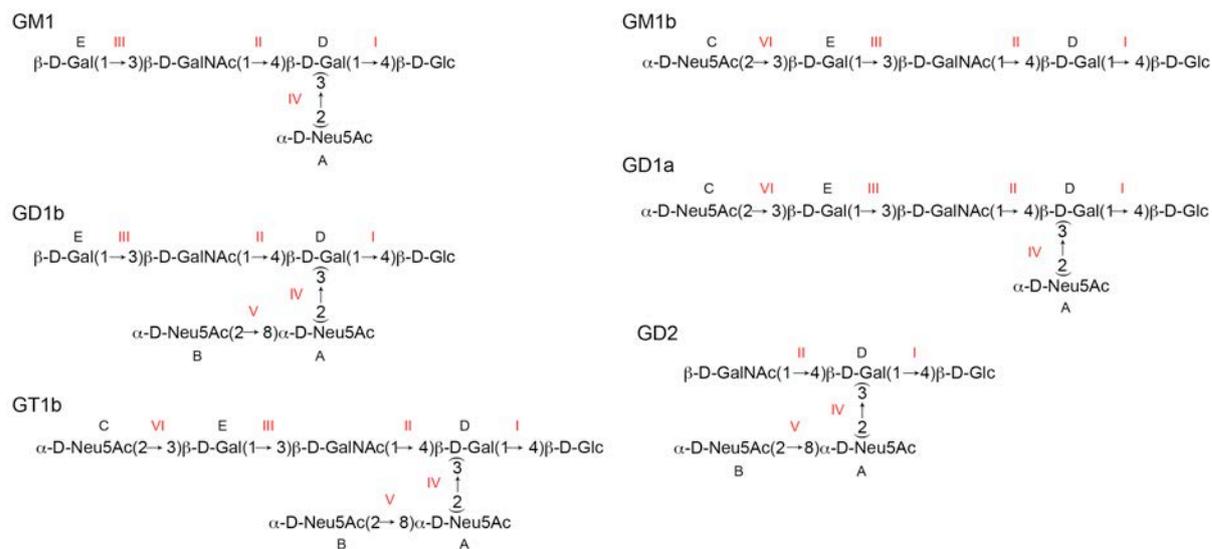
**Supplementary Figure S1.** Energy plots for dihedral angles  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\omega$  obtained from metadynamics, using GROMOS96 43a1 force field.



**Supplementary Figure S2.** Energy plots for dihedral angles  $\phi$ ,  $\psi$  and  $\omega$  obtained from metadynamics, using GLYCAM force field.



**Supplementary Figure S3.** Distribution of  $\Phi$ ,  $\Psi$  and  $\omega$  dihedrals during MD simulations. All minima energy conformations from metadynamics maps, for both force fields, were used as starting points of MD simulations. As can be observed there was a convergence of the structures in solution even when comparing different force fields, except for  $\Psi$  and  $\omega$  dihedrals of 2 $\rightarrow$ 8 linkage.



**Supplementary Figure S4.** Representation of the structures, whose hydrogen distance were analyzed theoretical and experimentally. Glycosidic bonds are marked with roman numbers in red (I to VI). Galactose and sialic acid residues were differentiated using letters (A to E).

## 5 Conclusões

A partir dos objetivos traçados, o presente trabalho permitiu:

- Modelos estruturais, em nível atômico, foram construídos para o NETNES, em sua forma completamente glicosidala e inserida em membrana;
- A estrutura e dinâmica da âncora de GPI acoplada ao NETNES foi construída e validada empregando-se dados de NOE;
- Os dados obtidos indicam a capacidade de âncoras de GPI de modular a fluidez de membranas, particularmente a cadeia sn2;
- O peptídeo não apresenta estrutura secundária em solução, salvo algumas regiões de *bends* e *turns*, sendo, portanto, muito flexível;
- Ambas formas do NETNES curvam-se sobre a superfície da membrana, expondo a parte peptídica e algumas glicanas ao meio extracelular;
- De forma semelhante, a estrutura de gangliosídeos selecionados foi construída e validada;
- Houve algumas divergências nas distâncias entre hidrogênios dos dados teóricos, em ambos campos de força, e experimentais. Os dados teóricos sugerem uma conformação um pouco diferente do que a encontrada nos experimentos de RMN.

O presente trabalho permitiu a obtenção de um modelo atômico para o NETNES ancorado à superfície de membrana, o que possibilitou a elaboração de inferências quanto a função biológica dessa molécula e maior conhecimento acerca da glicobiologia estrutural da forma epimastigota do *T. cruzi*. Além disso também foi possível caracterizar a estrutura dos gangliosídeos por métodos de dinâmica molecular de acordo com dados experimentais prévios. Algumas distâncias entre hidrogênios não estavam de acordo com as de RMN, mas sim com as de estruturas cristalográficas. Essas simulações permitiram a avaliação do campo de força átomo unido, demonstrando o potencial dessa metodologia com GROMOS96 para descrição dessas moléculas.

De forma geral, os resultados obtidos podem ser úteis para outros estudos, que avaliam a interação entre o NETNES ou entre os gangliosídeos com outras moléculas, oferecendo *insights* sobre processos biológicos importantes. Além disso, confirmam o potencial das ferramentas computacionais no estudo de sistemas biológicos, combinadas com dados experimentais prévios, especialmente na reprodução e predição de propriedades conformacionais de glicoconjugados inseridos em membrana.

## 6 Perspectivas

Considerando-se os resultados obtidos, principalmente a obtenção de modelos atômicos confiáveis, as seguintes perspectivas podem ser traçadas:

- Caracterização estrutural e conformacional de outras moléculas ancoradas por GPI;
- Inserção dos gangliosídeos em membrana e comparação de suas dinâmicas entre os estados livre e ancorado;
- Caracterização da interação dos gangliosídeos com a urease de *Canavalia ensiformis* por meio de estudos de docagem.

## 7 Referências Bibliográficas

### Referências citadas no texto e nos artigos publicados

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. Estrutura da Membrana. In: *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Artmed, Cap. 10, p. 617-650, 2010.
- ALLEN, W. J.; LEMKUL, J. A.; Bevan, D. R. GridMAT-MD: A Grid-based Membrane Analysis Tool for Use With Molecular Dynamics. *J. Comput. Chem.*, 30: 1952-1958, 2009.
- ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J. Leukocyte Biol.*, 70: 467-477, 2001.
- ANDREOTTI, A. H.; KAHNE, D. Effects of Glycosylation on Peptide Backbone. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 3352-3353, 1993.
- BARBONI, R.; RIVERO, B. P.; GEORGE, A. J.; MARTIN S. R.; RENOUP, D. V.; HOUNSELL, E. F.; BARBER, P. C. & MORRIS, R. J. The glycosylphosphatidylinositol anchor affects the conformation of Thy-1 protein. *J. Cell Sci.*, 108: 487-497, 1995.
- BAUSE, E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.*, 209: 331-336, 1983.
- BECKER, C. F. Caracterização do Reconhecimento Molecular de Polissacarídeos de Ouriço-do-mar pela Antitrombina. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- BECKER, C. F.; GUIMARÃES, J. A.; MOURÃO, P. A. S.; VERLI, H. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: Implications to their anticoagulant activities. *J. Mol. Graph. Model.*, 26: 391-399, 2007.
- BECKER, C. F.; GUIMARÃES, J. A.; VERLI, H. Molecular dynamics and atomic charge calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, 340: 1499-1507, 2005.

- BEINTEMA, J. J. Do Asparagine-Linked Carbohydrate Chains in Glycoproteins Have a Preference for  $\beta$ -Bends? *Bioscience Rep.*, 6: 709-714, 1986.
- BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, 91: 6269-6271, 1987.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, 81: 3684-3690, 1984.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Glicídeos. In: *Bioquímica*. 6<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Cap. 11, p. 307-330, 2007.
- BERNARDI, A.; POTENZA, D.; CAPELLI, A. M.; GARCÍA-HERRERO, A.; CAÑADA, F. J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. Second-Generation Mimics of Ganglioside GM1 Oligosaccharide: A Three-Dimensional View of Their Interactions with Bacterial Enterotoxins by NMR and Computational Methods. *Chem. Eur. J.*, 8: 4597-4612, 2002.
- BOHNE-LANG, A.; VON DER LIETH, C. W. GlyProt: in silico glycosylation of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 33: W214-W219, 2005.
- BONOMI, M.; BRANDUARDI, D.; BUSSI, G.; CAMILLONI, C.; PROVASKI, D.; RAITERI, P.; DONADIO, D.; MARINELLI, F.; PIETRUCCHI, F.; BROGLIA R. A.; PARRINELLO, M. PLUMED: a portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics. *Comp. Phys. Comm.*, 180: 1961-1972, 2009.
- BRAZ, S. C. M.; MELO, M. F. A. D.; LORENA, V. M. B.; SOUZA W. V.; GOMES, Y. M. Chagas disease in the State of Pernambuco, Brazil: analysis of admissions and mortality time series. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 44: 318-323, 2011.
- BUCHAN, D. W.; WARD, S. M.; LOBLEY, A. E.; NUGENT, T. C.; BRYSON, K.; JONES, D. T. Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucleic Acids Res.*, 38: W563-W568, 2010.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 175-200, 1995.
- BUSKAS, T.; INGALE, S.; BOONS, G. J. Glycopeptides as versatile tools for glycobiology. *Glycobiol.*, 16: 113R-136R, 2006.

- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.*, 126: 014101, 2007.
- BUTIKOFER, P.; MALHERBE, T.; BOSCHUNG, M. & RODITI, I. GPI-anchored proteins: now you see 'em, now you don't. *FASEB J.*, 15: 545-548, 2001.
- CAFFREY, M. Membrane protein crystallization. *J. Struct. Biol.*, 142: 108-132, 2003.
- CANTÙ, L.; DEL FAVERO, E.; SONNINO, S.; PRINETTI, A. Gangliosides and the multiscale modulation of membrane structure. *Chem. Phys. Lipids*, 164: 796-810, 2011.
- CASE, D. A.; CHEATHAM, T. E. 3<sup>rd</sup>; DARDEN, T.; GOHLKE, H.; LUO, R.; MERZ, K. M. JR.; ONUFRIEV, A.; SIMMERLING, C.; WANG, B.; WOODS, R. J. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.*, 26: 1668-1688, 2005.
- CHATTERJEE, S.; MAYOR, S. The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58: 1969-1987, 2001.
- CHAVELIER, F.; LOPEZ-PRADOS, J.; PEREZ, S.; MARTÍN-LOMAS, M.; NIETO, P. M. Conformational Study of GPI Anchors: the Common Oligosaccharide GPI Anchor Backbone. *Eur. J. Org. Chem.*, 15: 3489-3498, 2005.
- CHIGORNO, V.; SONNINO, S.; GHIDONI, R.; TETTAMANTI, G. Isolation and characterization of a tetrasialoganglioside from mouse brain, containing 9-O-acetyl, N-acetylneuraminic acid. *Neurobiochem. Int.*, 4: 531-539, 1982.
- CLARK, M.; CRAMER, R. D.; VAN OPDENBOSCH, N. Validation of the general-purpose Tripos 5.2 force-field. *J. Comput. Chem.*, 10: 982-1012, 1989.
- COLE, C.; BARBER, J. D.; BARTON, G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.*, 35: W197-W201, 2008.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 3-24, 2002.
- CRISPIN, M.; STUART, D.I.; JONES, E.Y. Building meaningful models of glycoproteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14: 354-355, 2007.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle Mesh Ewald – an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98: 10089-10092, 1993.

- DAURA, X.; JAUN, B.; SEEBACH, D.; VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. Reversible Peptide Folding in Solution by Molecular Dynamics Simulation. *J. Mol. Biol.*, 280: 925-932, 1998.
- DE GROOT, B. L.; GRUBMÜLLER, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 294: 2353-2357, 2001.
- DE SANT'ANNA, C. M. R.: Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações IUPAC 1997). *Quim. Nova*, 25: 505-512, 2002.
- DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, Sao Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.pymol.org>
- DEMARCO, M. L.; DAGGETT, V. Characterization of cell-surface prion protein relative to its recombinant analogue: Insights from molecular dynamics simulations of diglycosylated, membrane-bound human prion protein. *J. Neurochem.*, 109: 60-73, 2009.
- DEMARCO, M. L.; WOODS, R. J. Atomic-resolution conformational analysis of the GM3 ganglioside in a lipid bilayer and its implications for ganglioside-protein recognition at membrane surfaces. *Glycobiology*, 19: 344-355, 2009.
- DINGLASAN, R. R.; JACOBS-LORENA, M. Insight into a Conserved Lifestyle: Protein-Carbohydrate Adhesion. Strategies of Vector-Borne Pathogens. *Infect. Immun.*, 73: 7797-7807, 2005.
- DUAN, Y.; KOLLMAN, P. A. Pathways to a Protein Folding Intermediate Observed in a 1-Microsecond Simulation in Aqueous Solution. *Science*, 282: 740-744, 1998.
- EIDELS, L.; PROIA, R. L.; HART, D. A. Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.*, 47: 596-620, 1983.
- FAGONE, P.; JACKOWSKI, S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.*, 50: S311-S316, 2009.
- FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and function of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell. Sci.*, 112: 2799-2809, 1999.

- FERGUSON, M. A. J.; LOW, M. G. & CROSS, G. A. M. Glycosyl-sn-1,2-dimyristoylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 260: 14547-14555, 1985.
- FERNANDES, C. L.; SACHETT, L. G.; POL-FACHIN, L.; VERLI, H. GGROMOS96 43a1 performance in predicting oligosaccharide conformational ensembles within glycoproteins. *Carbohydr. Res.*, 345: 663-671, 2010.
- FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; DE ISOLA, E. D.; LAMMEL, E.; MEINARDI, E.; BRENNER, R. R.; RASMUSSEN, L. Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 88: 25-33, 1997.
- FRASCH, A. C. C. Funcional Diversity in the Trans-sialidase and Mucin Families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, 16: 282-286, 2000.
- FREDDOLINO, P. L.; LIU, F.; GRUEBELE, M.; SCHULTEN, K. Ten-Microsecond Molecular Dynamics Simulation of a Fast-Folding WW Domain. *Biophys. J.*, 94: L75-L77, 2008.
- FUSHINOBU, S.; MERTZ, B.; HILL, A. D.; HIDAKA, M.; KITAOKA, M. & REILLY, P. J. Computational analyses of the conformational itinerary along the reaction pathway of GH94 cellobiose phosphorylase. *Carbohydr. Res.*, 343: 1023-1033, 2008.
- GAVEL, Y. & VON HEIJNE, G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: Implications for protein engineering. *Protein Eng.*, 3: 433-442, 1990.
- GHIDONI, R.; SONNINO, S.; TETTAMANTI, G.; BAUMANN, N.; REUTER, G.; SCHAURER, R. Isolation and characterization of a trisialoganglioside from mouse brain, containing 9-O-acetil-N-acetilneuraminic acid. *J. Biol. Chem.*, 225: 6990-6995, 1980.
- GIESEL, G. M.; LIMA, L. M. T. R.; FABER-BARATA, J.; GUIMARÃES, J. A.; VERLI, H. Characterization of the papillomavirus  $\alpha_1E2$  peptide unfolded to folded transition upon DNA binding. *FEBS Letters*, 582: 3619-3624, 2008.
- GLENNON, T. M.; ZHENG, Y. J.; LEGRAND, S. M.; SHUTZBERG, B. A.; MERZ, K. M. JR. A force field for monosaccharides and (1 4) linked polysaccharides. *J. Comput. Chem.*, 15: 1019-1040, 1994.

- GUHA-NIYOGI, A., SULLIVAN, D. R. & TURCO, S. J. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*, 11: 45R-59R, 2001.
- GUO, C.-T.; NAKAGOMI, O.; MOCHIZUKI, M.; ISHIDA, H.; KISO, M.; OHTA, Y.; SUZUKI, T.; MIYAMOTO, D.; HIDARI, R. I. P. J.; SUZUKI, Y. Ganglioside GM1a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J. Biochem.*, 126: 683-688, 1999.
- HAYNES, P. A. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology*, 8: 1-5, 1998.
- HELENIUS, A.; AEBI, M.: Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science*, 291: 2364-2369, 2001.
- HELENIUS, J., NG, D. T. W., MAROLDA, C., WALTER, P., VALVANO, M. A. & AEBI, M. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature*, 415: 447-450, 2002.
- HELLER, H.; SCHAEFER, M.; SCHULTEN, K. Molecular Dynamics Simulation of a Bilayer of 200 Lipids in the Gel and in the Liquid-Crystal Phases. *J. Phys. Chem.*, 97: 8343-8360, 1993.
- HESS, B. Convergence of sampling in protein simulations. *Phys. Rev. E*, 65: 031910-1-10, 2002.
- HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, 18: 1463-1472, 1997.
- HOMANS, S. W.; EDGE, C. J., FERGUSON, M. A. J., DWEK, R. A. & RADEMACHER, T. W. Solution structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochemistry*, 28: 2881-2887, 1989.
- HOMANS, S. W.; FERGUSON, M. A. J.; DWEK, R. A.; RADEMACHER, T. W.; ANAND R. & WILLIAMS, A. F. Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature*, 333: 269-272, 1988.
- HOOVER, W. G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Phys Rev. A*, 31: 1695-1697, 1985.

- HUG, P.; LIN, H. M.; KORTE, T.; XIAO, X.; DIMITROV, D. S.; WANG, J. M.; PURI, A.; BLUMENTHAL, R. Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J. Virol.*, 74: 6377-6385, 2000.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*, 14: 33-38, 1996. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
- ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol. Today*, 16: 489-497, 2000.
- IMPERIALI, B., SHANNON, K. L., UNNO, M. & RICKERT, K. W. A mechanistic proposal for asparagine-linked glycosylation. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 7944-7945, 1992.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature: Conformational nomenclature for five- and six-membered ring forms of monosaccharides and their derivatives (Recommendations 1980). *Eur. J. Biochem.*, 111: 295-298, 1980.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature: Nomenclature for carbohydrates. *Pure Appl. Chem.*, 68: 1919-2008, 1996.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature: Symbols for specifying the conformation of polysaccharide chains. *Pure Appl. Chem.*, 55: 1269-1272, 1983.
- JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J. Am. Chem. Soc.*, 110: 1657-1666, 1988.
- KARPLUS, M.; PETSKO, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, 347: 631-639, 1990.
- KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protoc.*, 4: 363-371, 2009.
- KIRSCHNER, K. N.; YONGYE, A. B.; TSCHAMPEL, S. M.; GONZALEZ-OUTEIRINO, J.; DANIELS, C. R.; FOLEY, B. L.; WOODS, R. J. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. *J. Comput. Chem.*, 29: 622-655, 2008.

- KITSON, D. H.; HAGLER, A. T. Theoretical-studies of the structure and molecular-dynamics of a peptide crystal. *Biochemistry*, 27: 5246-5257, 1988.
- KUČERKA, N.; TRISTRAM-NAGLE, S.; NAGLE, J. F. Structure of Fully Hydrated Fluid Phase Lipid Bilayers with Monounsaturated Chains. *J. Membrane Biol.*, 208: 193-202, 2005.
- KUKOL, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *J. Chem. Theory Comput.*, 5: 615-526, 2009.
- KUSUMI, A.; KOYAMA-HONDA, I.; SUZUKI, K. Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic*, 5: 213–230, 2004.
- LAIO, A. & GERVASIO, F. L. Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct free energy in biophysics, chemistry and material science. *Rep. Prog. Phys.*, 71: 126601-126622, 2008.
- LAIO, A. & PARRINELLO, M. Escaping free-energy minima. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99: 12562-12566, 2002.
- LANG, L.; COUSO, R. & KORNFELD, S. Glycoprotein phosphorylation in simple eukaryotic organisms. Identification of UDP-GlcNAc:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase activity and analysis of substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 261: 6320-6325, 1986.
- LARKIN, A. & IMPERIALI, B. The Expanding Horizons of Asparagine-Linked Glycosylation. *Biochemistry*, 50: 4411-4426, 2011.
- LEACH, A. R. *Molecular Modelling Principles and Applications*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cingapura, Longman, 2001.
- LEHTO, M. T. & SHAROM, F. J. Proximity of the protein moiety of a GPI-anchored protein to the membrane surface: a FRET study. *Biochemistry*, 41: 8368-8376, 2002.
- LEVITT, M.; HIRSHBERG M, SHARON R, DAGGETT V. Potential-Energy Function and Parameters for Simulations of the Molecular-Dynamics of Proteins and Nucleic-Acids in Solution. *Comput. Phys. Commun.*, 91: 215-231, 1995.

- LINS, R. D.; HÜNENBERGER, P. H. A New GROMOS Force Field for Hexopyranose-Based Carbohydrates. *J. Comput. Chem.*, 26: 1400-1412, 2005.
- LIS, H; SHARON, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.*, 218: 1-27, 1993.
- LOLL, P. J. Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. *J. Struct. Biol.*, 142: 144-153, 2003.
- LOW, M. G. & SALTIEL, A. R. Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. *Science*, 239: 268-275, 1988.
- LÜTTEKE, T.; BOHNE-LANG, A.; LOSS, A.; GOETZ, T.; FRANK, M.; VON DER LIETH, C.-W. GLYCOSCIENCES.de: an Internet portal to support glycomics and glycobiology research. *Glycobiology*, 16: 71R-81R, 2006.
- LÜTTEKE, T.; FRANK, M.; VON DER LIETH, C.-W. Data mining the protein data bank: automatic detection and assignment of carbohydrate structures. *Carbohydr. Res.*, 339: 1015-1020, 2004.
- MACKERELL, A. D. JR.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK, R. L. JR.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T. K.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D. T.; PRODHOM, B.; REIHER, W. E. 3<sup>RD</sup>; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J. C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WIÓRKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D.; KARPLUS, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins *J. Phys. Chem. B*, 102: 3586-3616, 1998.
- MACRAE, J. I.; ACOSTA-SERRANO, A.; MORRICE, N. A.; MEHLERT, A.; FERGUSON, M. A. J. Structural Characterization of NETNES, a Novel Glycoconjugate in *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *J. Biol. Chem.*, 280: 12201-12211, 2005.
- MAJUMDAR, D.; ELSAYED, G. A.; BUSKAS, T. & BOONS, G. J. Synthesis of Proteophosphoglycans of *Leishmania major* and *Leishmania mexicana*. *J. Org. Chem.*, 70: 1691-1697, 2005.

- MANDAL, P. K.; PETTEGREW, J. W. Alzheimer's Disease: NMR Studies of Asialo (GM1) and Trisialo (GT1b) Ganglioside Interactions with A $\beta$ (1-40) Peptide in a Membrane Mimic Environment. *Neurochem. Res.*, 29: 447-453, 2004.
- MARQUINA, G.; WAKI, H.; FERNANDEZ, L. E.; KON, K.; CARR, A.; VALIENTE, O.; PEREZ, R.; ANDO, S. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res.*, 56: 5165-5171, 1996.
- MARSHALL, R. D.: Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 41: 673-702, 1972.
- MARTÍN-LOMAS, M.; KHIAR, N.; GARCÍA, S.; KOESSLER, J. L.; NIETO, P. M.; RADEMACHER, T. W. Inositolphosphoglycan Mediators Structurally Related to Glycosyl Phosphatidylinositol Anchors: Synthesis, Structure and Biological Activity. *Chem. Eur. J.*, 6: 3608-3621, 2000.
- MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267: 585-590, 1977.
- MEHLERT, A.; RICHARDSON, J. M.; FERGUSON, M. A. J. Structure of the Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchor Glycan of a Class-2 Variant Surface Glycoprotein from *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.*, 277: 379-392, 1998.
- MEHTA, D. P.; ICHIKAWA, M.; SALIMATH, P. V.; ETCHISON, J. R.; HAAK, R.; MANZI, A. & FREEZE, H. H. A Lysosomal Cysteine Proteinase from *Dictyostelium discoideum* Contains *N*-Acetylglucosamine-1-phosphate Bound to Serine but Not Mannose-6-phosphate on *N*-linked Oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 271: 10897-10903, 1996.
- MEHTA, D.; ETCHISON, J. R.; WU, R. & FREEZE, H. H. UDP-GlcNAc:Ser-Protein *N*-Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase from *Dictyostelium discoideum* Recognizes Serine-containing Peptides and Eukaryotic Cysteine Proteinases. *J. Biol. Chem.*, 272: 28638-28645, 1997.
- MENDONÇA-PREVIATO, L.; TODESCHINI, A. R.; HEISE, N.; PREVIATO, J. O. Protozoan parasite-specific carbohydrate structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15: 499-505, 2005.
- MERELLO, S.; PARODI, A. J.; COUSO, R. Characterization and Partial Purification of a Novel Enzymatic Activity: UDP-GlcNAc:Ser-PROTEIN *N*-

- acetylglucosamine-1-phosphotransferase from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.*, 270: 7281-7287, 1995.
- MESCHER, M. F. & STROMINGER, J. L. Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarum*. *J. Biol. Chem.*, 251: 2005-2014, 1976.
- MISHRA, S.; JOSHI, P. G. Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J. Neurochem.*, 103: 135-142, 2007.
- MOSS, J. M.; REID, G. E.; MULLIN, K. A.; ZAWADSKI, J. L.; SIMPSON, R. J. & MCCONVILLE, M. J. Characterization of a novel GDP-mannose:serine protein mannose-1-phosphotransferase from *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.*, 274: 6678-6688, 1999.
- NAKAYASU, E. S.; YASHUNSKY, D. V.; NOHARA, L. L.; TORRECILHAS, A. C. T.; NIKOLAEV, A. V.; ALMEIDA, I. C. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Syst. Biol.*, 5: 261, 2009.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5<sup>a</sup> ed. New York, W. H. Freeman and Company, 2008.
- NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.*, 52: 255-68, 1984.
- NOSÉ, S.; KLEIN, M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol. Phys.*, 50: 1055-1076, 1983.
- NOTHAFT, H. & SZYMANSKI, C. M. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8: 765-778, 2010.
- O'CONNOR, S. E.; IMPERIALI, B. Conformational switching by asparagine-linked glycosylation. *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 2295-2296, 1997.
- O'CONNOR, S. E.; IMPERIALI, B. Modulation of protein structure and function by asparagine-linked glycosylation. *Chem. Biol.*, 3: 803-812, 1996.
- OLIVEIRA, B. G.; ABREU, M. N. S.; ABREU, C. D. G. A.; ROCHA, M. O. C.; RIBEIRO, A. L. Health-related quality of life in patients with Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44: 150-156, 2011.

- OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.*, 25: 1656-1676, 2004.
- ORLEAN, P.; MENON, A. K. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J. Lipid Res.*, 48: 993:1011, 2007.
- OTT, K. H.; MEYER, B. J. Parametrization of GROMOS force field for oligosaccharides and assessment of efficiency of molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, 17: 1068-1084, 1996.
- PARODI, A. J. N-Glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*, 2: 193-199, 1993.
- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.*, 52: 7182-7190, 1981.
- PAULICK, M. G.; BERTOZZI, C. R. The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry*, 47: 6991-7000, 2008.
- PEDEBOS, C.; POL-FACHIN, L.; VERLI, H. Unrestrained Conformational Characterization of *Stenocereus eruca* Saponins in Aqueous and Nonaqueous Solvents. *J. Nat. Prod.*, 75: 1196-1200, 2012.
- PÉREZ, S.; IMBERTY, A.; ENGELSEN, S. B.; GRUZA, J.; MAZEAU, K.; JIMENEZ-BARBERO, J.; POVEDA, A.; ESPINOSA, J.-F.; VAN EYCK, B. P.; JOHNSON, G.; FRENCH, A. D.; KOUWIJZER, M. L. C. E.; GROOTENUIS, P. D. J.; BERNARDI, A.; RAIMONDI, L.; SENDEROWITZ, H.; DURIER, V.; VERGOTEN, G.; RASMUSSEN, K. A comparison and chemometric analysis of several molecular mechanics force fields and parameter sets applied to carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 314: 141-155, 1998.
- PETRESCU, A. J.; WORMALD, M. R.; DWEK, R. A. Structural aspects of glycomes with a focus on N-glycosylation and glycoprotein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 16: 600-607, 2006.

- POGER, D.; MARK, A. E. On the Validation of Molecular Dynamics Simulations of Saturated and cis-Minounsaturated Phosphatidylcholine Lipid Bilayers: A Comparison with Experiment. *J. Chem. Theory Comput.*, 6: 325-336, 2010.
- POL-FACHIN, L. Descrição conformacional de carboidratos e glicoproteínas: validação de protocolo baseado em dinâmica molecular e implicações funcionais. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2009.
- POL-FACHIN, L.; FERNANDES, C. L.; VERLI, H. GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoprotein conformational ensembles through molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Res.*, 344: 491-500, 2009.
- POL-FACHIN, L.; RUSU, V. H.; VERLI, H.; LINS, R. D. GROMOS53A6<sub>GLYC</sub>, an Improved GROMOS Force Field for Hexopyranose-Based Carbohydrates. *J. Chem. Theory Comput.*, 8: 4681-4690, 2012.
- POL-FACHIN, L.; SERRATO, R.V.; VERLI, H. Solution conformation and dynamics of exopolysaccharides from *Burkholderia* species. *Carbohydr. Res.*, 345: 1922-1931, 2010.
- POL-FACHIN, L.; VERLI, H. Assessment of Glycoproteins Dynamics from Computer Simulations. *Mini-Rev. Org. Chem.*, 8: 229-238, 2011.
- POL-FACHIN, L.; VERLI, H. Molecular modeling on the characterization of glycoproteins conformation. In: Strategies for the Determination of Carbohydrates Structure and Conformation. 1<sup>a</sup> ed. Kerala, Transworld Research Network, Cap. 4, p. 103-131, 2010.
- POL-FACHIN, L.; VERLI, H. Structural glycobiology of the major allergen of *Artemisia vulgaris*, Art v 1: O-glycosylation influence on the protein dynamics and allergenicity. *Glycobiology*, 22: 817-825, 2012.
- PONDER, J. W.; CASE, D. A. Force fields for protein simulations. In: Richards, F. M.; Eisenberg, D. S.; Kuriyan, J. *Advances in protein chemistry*. San Diego, Elsevier Academic Press, cap. 2, p. 27-86, 2003.
- RODGERS, W.; ZAVZAVADJIAN, J. Glycolipid-enriched membrane domains are assembled into membrane patches by associating with the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.*, 267: 173-183, 2001.

- RODRIGUES, R. F.; CASTRO-PINTO, D.; ECHEVARRIA, A.; DOS REIS, C. M.; CISTIA, C. N. D.; SANT'ANNA, C. M. R.; TEIXEIRA, F.; CASTRO, H.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; LEON, L. L.; TOMÁS, A. Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 1760-1766, 2012.
- ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.*, 3: 395-403, 2000.
- ROSEMAN, S. Reflections on Glycobiology. *J. Biol. Chem.*, 276: 41527-41542, 2001.
- ROST, B.; YACHDAV, G.; LIU, J. The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Res.*, 32: W321-W326, 2003.
- SACHETT, L. Caracterização Estrutural e Conformacional de Prostaglandina Endoperóxido Sintases. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- SAMUELSON, J., BANERJEE, S., MAGNELLI, P., CUI, J., KELLEHER, D. J., GILMORE, R.; ROBBINS, P. W. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 1548-1553, 2005.
- SATO, T.; SERIZAWA, T.; OKAHATA, Y. Binding of influenza A virus to monosialoganglioside (GM3) reconstituted in glucosylceramide and sphingomyelin membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1285: 14-20, 1996.
- SCHAFTENAAR, G. MOLDEN. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, 1997.
- SCHAFTENAAR, G.; NOORDIK, J. H. MOLDEN: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 14: 123-134, 2000.
- SCHLICK, T. Molecular Modeling and Simulation: an Interdisciplinary Guide, 1ª ed, New York, Springer, 2006.

- SCHMIDT, M. W.; BALDRIDGE, K. K.; BOATZ, J. A.; ELBERT, S. T.; GORDON, M. S.; JENSEN, J. H.; KOSEKI, S.; MATSUNAGA, N.; NGUYEN, K. A.; SU, S. J.; WINDUS, T. L.; DUPUIS, M.; MONTGOMERY, J. A. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comp. Chem.*, 14: 1347-1363, 1993.
- SCHÜTTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. F. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr.*, D60: 1355-1363, 2004.
- SCOTT, W. R. P.; HÜNENBERGER, P. H.; TIRONI, I. G.; MARK, A. E.; BILLETER, S. R.; FENNEN, J.; TORDA, A. E.; HUBER, T.; KRÜGER, P.; VAN GUNSTEREN, W. F. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A*, 103: 3596-3607, 1999.
- SEELIG, J.; WAESPE-ŠARČEVIĆ, N. Molecular Order in Cis and Trans Unsaturated Phospholipid Bilayers. *Biochemistry* 17: 3310-3315, 1978.
- SENDEROWITZ, H.; PARISH, C.; STILL, W. Carbohydrates: united atom AMBER\* parametrization of pyranoses and simulations yielding anomeric free energies. *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 2078-2086, 1996.
- SENDEROWITZ, H.; STILL, W. C. A Quantum Mechanically Derived All-Atom Force Field for Pyranose Oligosaccharides. AMBER\* Parameters and Free Energy Simulations. *J. Org. Chem.*, 62: 1427-1438, 1997.
- SIMMERLING, C.; STROCKBINE, B.; ROITBERG, A. E. All-Atom Structure Prediction and Folding Simulations of a Stable Protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 11258-11259, 2002.
- SLEYTR, U. B. Heterologous reattachment of regular arrays of glycoproteins on bacterial surfaces. *Nature*, 257: 400-402, 1975.
- SLEYTR, U. B.; THORNE, K. J. Chemical characterization of the regularly arranged surface layers of *Clostridium thermosaccharolyticum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.*, 126: 377-383, 1976.
- SONNINO, S.; MAURI, L.; CHIGORNO, V.; PRINETTI, A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17: 1R-13R, 2006.
- SOUSA DA SILVA, A. W.; VRANKEN, W. F. ACPYPE – AnteChamber Python Parser interface. *BMC Res. Notes*, 5: 367-374, 2012.

- SPELLMANN, D.; BURGER, M. M. Carbohydrate-Carbohydrate Interactions in Adhesion. *J. Cell. Biochem.*, 61: 562-568, 1996.
- SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12: 43R-56R, 2002.
- STEPPER, J.; SHASTRI, S.; LOO, T. S.; PRESTON, J. C.; NOVAK, P.; MAN, P.; MOORE, C. H.; HAVLÍČEK, V.; PATCHETT, M. L.; NORRIS, G. E. Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Letters*, 585: 645-650, 2011.
- SUZUKI, Y.; NAKAO, T.; ITO T.; WATANABE, N.; TODA, Y.; GUIYUN, X.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, T.; KIMURA, Y.; YAMADA, A.; SUGAWARA, K.; NISHIMURA, H.; KITAME, F.; NAKAMURA, K.; DEYA, E.; KISO, M.; HASEGAWA, A. Structural determination of gangliosides that bind to influenza A, B, and C viruses by an improved binding assay: Strain-specific receptor epitopes in sialo-sugar chains. *Virology*, 189: 121-131, 1992.
- SVENNERHOLM, L. Ganglioside designation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 125: 11-19, 1980.
- TERRA, R. M.; GUIMARÃES, J. A.; VERLI, H. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *J. Mol. Graphics Modell.*, 25: 767-772, 2007.
- THE WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Factsheet nº340, 2010. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.
- TIRONI, I. G.; SPERB, R.; SMITH, P. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.*, 102: 5451-5459, 1995.
- VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C. GROMACS: fast, flexible and free. *J. Comput. Chem.*, 26: 1701-1718, 2005.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29: 992-1023, 1990.

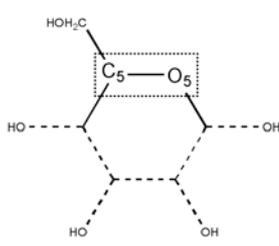
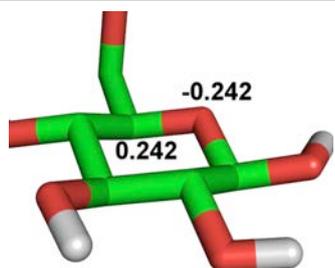
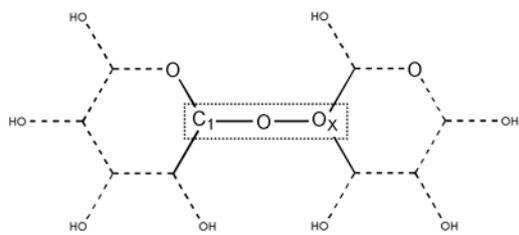
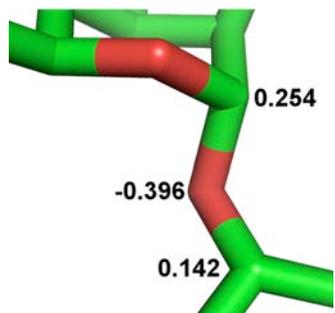
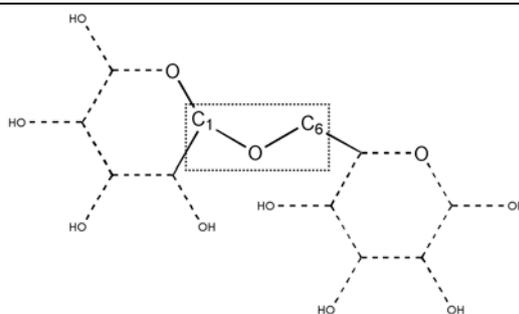
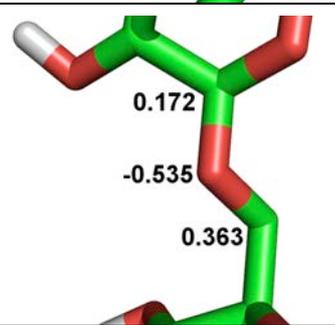
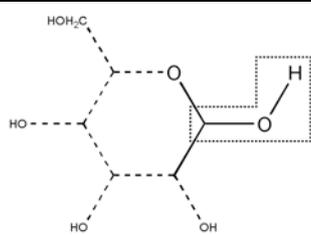
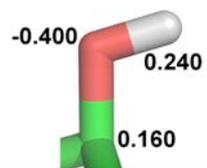
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HUENENBERGER, P. H.; KRUEGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I. G. Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. Vdf Hochschulverlag AG, Zurique, Suíça, 1996.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. Validation of molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.*, 108: 6109-6116, 1998.
- VAN GUNSTEREN, W.F.; MARK, A.E. On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics computer simulation. *Eur. J. Biochem.*, 204: 947-961, 1992.
- VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3: 97-130, 1993.
- VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. *Essentials of Glycobiology*. 2<sup>a</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor, 2009.
- VERLI, H. Interação Heparina-Antitrombina: Reconhecimento Molecular Caracterizado por Ferramentas de Modelagem Molecular. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2005.
- VERLI, H.; GUIMARÃES, J. A. Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, 339: 281-290, 2004.
- VISHNYAKOV, A.; LYUBARTSEV, A. P.; LAAKSONEN A. Molecular Dynamics Simulations of Dimethyl Sulfoxide and Dimethyl Sulfoxide-Water Mixture. *J. Phys. Chem. A*, 105: 1702-1710, 2001.
- WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S.; WEINER P. A new force Field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 765-784, 1984.
- WELLER, C. T.; MCCONVILLE, M.; HOMANS, S. W. Solution structure and dynamics of a glycoinositol phospholipid (GIPL-6) from *Leishmania major*. *Biopolymers*, 34: 1155-1163, 1994.

- WILKINSON, S. R.; TAYLOR, M. C.; HORN, D.; KELLY, J. M.; CHEESEMAN, I. A. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 5022-5027, 2008.
- WOODS GROUP. GLYCAM Web. Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, GA, 2005-2013. <http://www.glycam.com>
- WOODS, R. J. Computational carbohydrate chemistry: what theoretical methods can tell us. *Glycoconj. J.*, 15: 209-216, 1998.
- WOODS, R. J.; DWEK, R. A.; RAYMOND, A.; EDGE, C. J. Molecular mechanical and molecular dynamical simulations of glycoproteins and oligosaccharides. 1. GLYCAM\_93 parameter development. *J. Phys. Chem.*, 99: 3832-3846, 1995.
- WORMALD, M. R.; PETRESCU, A. J.; PAO, Y.-L.; GLITHERO, A.; ELLIOTT, T.; DWEK, R. A. Conformational Studies of Oligosaccharides and Glycopeptides: Complementarity of NMR, X-ray Crystallography, and Molecular Modelling. *Chem. Rev.*, 102: 371-386, 2002.
- YU, R. K.; LEDEEN, R. W. Gangliosides of human, bovine and rabbit plasma. *J. Lipid Res.*, 13: 680-686, 1972.
- ZHANG, X.; KIECHLE, F. L. Glycosphingolipids in Health and Disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 34: 3-13, 2004.
- ZUEGG, J.; GREASY, J. E. Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor. *Glycobiol.*, 10: 959-974, 2000.

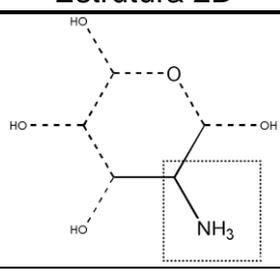
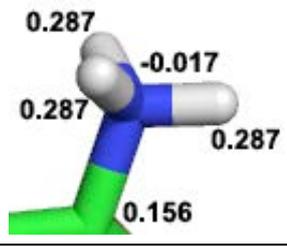
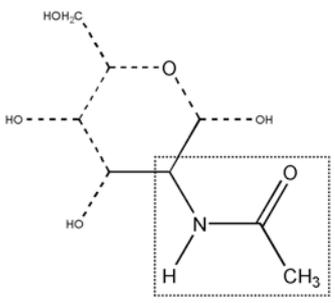
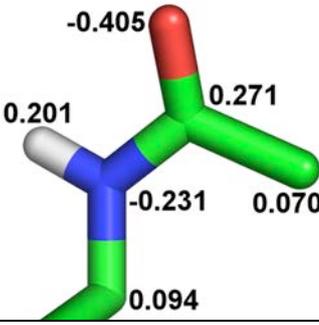
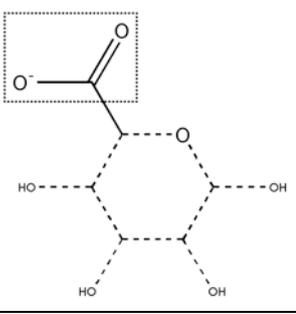
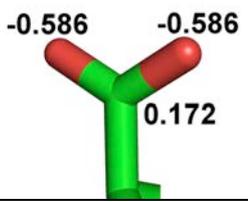
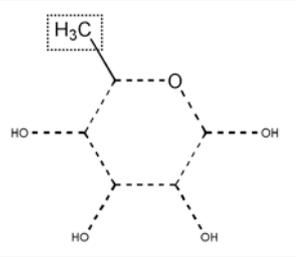
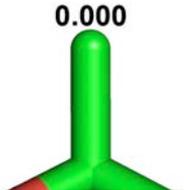
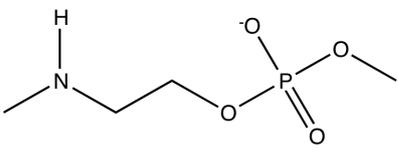
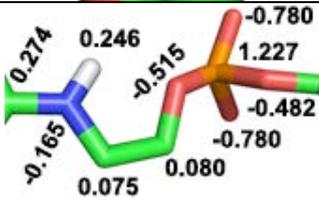
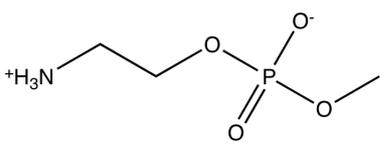
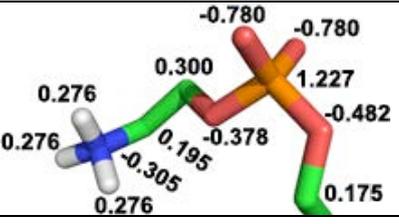
## 8 Anexos

### 8.1 Cargas atômicas de Löwdin

As cargas de Löwdin foram divididas em grupos de carga, para que possam ser aplicadas para diferentes resíduos de carboidratos e campos de força.

Grupamento	Estrutura 2D	Estrutura 3D e cargas	Ref.
C5-O5 do anel piranosídico			Pol-Fachin, 2009
Ligações glicosídicas 1→X*			Pol-Fachin, 2009
Ligação glicosídica 1→6			Pol-Fachin, 2009
Hidroxila			Pol-Fachin, 2009

\* X= 2, 3 ou 4

Grupamento	Estrutura 2D	Estrutura 3D e cargas	Ref.
Amina			Pol-Fachin, 2009
Acetoamido			Pol-Fachin, 2009
Carboxilato			Pol-Fachin, 2009
Metila			Pol-Fachin, 2009
Etanolamina			
Aminoetil fosfato			

## 8.2 Topologias dos resíduos do NETNES para GROMOS96 53a6

Esses arquivos contêm os parâmetros de ligação, ângulo de ligação e diedros para as moléculas em estudo. Essas topologias do campo de força GROMOS96 53a6, utilizado com o pacote GROMACS, fazem parte de um arquivo com extensão “rtp”, localizado em uma pasta de topologias compartilhadas do programa.

Abaixo, seguem os parâmetros para os monossacarídeos, aminoácidos ligados aos oligossacarídeos e fosfolipídeos constituintes das moléculas estudadas.

### $\beta$ -GlcNAc-(1→N)-Asn

```
[ ASN2 ]
[ atoms ]
  N      N      -0.31000    0
  H      H      0.31000    0
  CA     CH1     0.00000    1
  CB     CH2     0.00000    1
  CG     C       0.45000    2
  OD1    O      -0.45000    2
  ND2    NT     -0.26500    3
  HD2    H       0.15500    3
  C      C       0.450     4
  O      O      -0.450     4

[ bonds ]
  N      H      gb_2
  N      CA     gb_21
  CA     C      gb_27
  C      O      gb_5
  C      +N     gb_10
  CA     CB     gb_27
  CB     CG     gb_27
  CG     OD1    gb_5
  CG     ND2    gb_9
  ND2    HD2    gb_2

[ angles ]
; ai    aj    ak    gromos type
  -C    N     H     ga_32
  H     N     CA    ga_18
  -C    N     CA    ga_31

  N      CA     C     ga_13
  CA     C      +N    ga_19
  CA     C      O     ga_30
  O      C      +N    ga_33
  N      CA     CB     ga_13
  C      CA     CB     ga_13
  CA     CB     CG     ga_15
  CB     CG     OD1    ga_30
  CB     CG     ND2    ga_19
  OD1    CG     ND2    ga_33
  CG     ND2    HD2    ga_23

[ impropers ]
; ai    aj    ak    al    gromos type
  N     -C    CA    H     gi_1
  C     CA    +N    O     gi_1
  CA    N     C     CB    gi_2
  CG    OD1  ND2   CB    gi_1

[ dihedrals ]
; ai    aj    ak    al    gromos type
  -CA   -C    N     CA    gd_14
  -C    N     CA    C     gd_39
  N     CA    C     +N    gd_40
  N     CA    CB    CG    gd_34
  CA    CB    CG    ND2   gd_40
  CB    CG    ND2   HD2   gd_14
```

$\beta$ -GlcNAc-(1→4)- $\beta$ -GlcNAc-(1→N)-Asn

```

[ NAG1 ]
[ atoms ]
  C8  CH3    0.07000    0
  C7   C     0.27100    0
  O7   O    -0.40500    0
  N2   N    -0.23100    0
  H22  H     0.20100    0
  C2   CH1   0.09400    0
  C1   CH1   0.11000    1
  O5   OA   -0.24200    2
  C5   CH1   0.24200    2
  C6   CH2   0.16000    3
  O6   OA   -0.40000    3
  H63  H     0.24000    3
  C4   CH1   0.14200    4
  O4   OA   -0.39600    4
  C3   CH1   0.16000    5
  O3   OA   -0.40000    5
  H32  H     0.24000    5
[ bonds ]
  C8  C7      gb_27
  C7  O7      gb_5
  C7  N2      gb_11
  N2  H22     gb_2
  N2  C2      gb_21
  C2  C1      gb_26
  C2  C3      gb_26
  C1  O5      gb_20
  O5  C5      gb_20
  C5  C6      gb_26
  C5  C4      gb_26
  C6  O6      gb_20
  O6  H63     gb_1
  C4  O4      gb_20
  C4  C3      gb_26
  O4  +C1     gb_20
  C3  O3      gb_20
  O3  H32     gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C8  C7  O7      ga_30
  C8  C7  N2      ga_19
  O7  C7  N2      ga_33
  C7  N2  H22     ga_32
  C7  N2  C2      ga_31
  H22 N2  C2      ga_25
  N2  C2  C1      ga_13
  N2  C2  C3      ga_13
  C1  C2  C3      ga_8
  C2  C1  O5      ga_9
  C1  O5  C5      ga_10
  O5  C5  C6      ga_9
  O5  C5  C4      ga_9
  C6  C5  C4      ga_8
  C5  C6  O6      ga_9
  C5  C4  O4      ga_9
  C6  O6  H63     ga_12
  C5  C4  C3      ga_8
  O4  C4  C3      ga_9
  C4  O4  +C1     ga_10
  C2  C3  C4      ga_8
  C2  C3  O3      ga_9
  C4  C3  O3      ga_9
  C3  O3  H32     ga_12
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C7  C8  O7      N2      gi_1
  N2  C7  H22     C2      gi_1
  C2  N2  C3      C1      gi_2
  C5  O5  C6      C4      gi_2
  C4  C5  C3      O4      gi_2
  C3  O3  C2      C4      gi_2
  C5  C2  C4      C1      gi_7
  C5  C2  C3      C1      gi_8
  C5  C2  C3      O5      gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C8  C7  N2      C2      gd_14
  C3  C2  N2      C7      gd_29
  O5  C1  C2      N2      gd_18
  O3  C3  C2      N2      gd_18
  C2  C1  O5      C5      gd_29
  C4  C5  O5      C1      gd_29
  O6  C6  C5      O5      gd_18
  C3  C4  C5      O5      gd_17
  O3  C3  C4      C5      gd_17
  C2  C3  O3      H32     gd_23
  C3  C4  O4      +C1     gd_29
  C2  C3  C4      C5      gd_34
  C6  C5  C4      C3      gd_34
  C6  C5  C4      O4      gd_17
  N2  C2  C3      C4      gd_17
  C1  C2  C3      O3      gd_17
  O3  C3  C4      O4      gd_18
  O5  C5  C4      O4      gd_18
  C4  C5  C6      O6      gd_17
  C4  C5  C6      O6      gd_34
  O5  C1  C2      C3      gd_17
  C1  C2  C3      C4      gd_34
  C2  C3  C4      O4      gd_17
  C5  C6  O6      H63     gd_23

```

$\beta$ -Man-(1→4)- $\beta$ -GlcNAc-(1→4)- $\beta$ -GlcNAc

```

[ NAG2 ]
[ atoms ]
  C8  CH3    0.07000    0
  C7   C     0.27100    0
  O7   O    -0.40500    0
  N2   N    -0.23100    0
  H22  H     0.20100    0
  C2   CH1   0.09400    0
  C1   CH1   0.25400    1
  O5   OA   -0.24200    2
  C5   CH1   0.24200    2
  C6   CH2   0.16000    3
  O6   OA   -0.40000    3
  H63  H     0.24000    3
  C4   CH1   0.14200    4
  O4   OA   -0.39600    4
  C3   CH1   0.16000    5
  O3   OA   -0.40000    5
  H32  H     0.24000    5
[ bonds ]
  C8  C7      gb_27
  C7  O7      gb_5
  C7  N2      gb_11
  N2  H22     gb_2
  N2  C2      gb_21
  C2  C1      gb_26
  C2  C3      gb_26
  C1  O5      gb_20
  O5  C5      gb_20
  C5  C6      gb_26
  C5  C4      gb_26
  C6  O6      gb_20
  O6  H63     gb_1
  C4  O4      gb_20
  C4  C3      gb_26
  O4  +C1     gb_20
  C3  O3      gb_20
  O3  H32     gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C8  C7  O7      ga_30
  C8  C7  N2      ga_19
  O7  C7  N2      ga_33
  C7  N2  H22     ga_32
  C7  N2  C2      ga_31
  H22 N2  C2      ga_25
  N2  C2  C1      ga_13
  N2  C2  C3      ga_13
  C1  C2  C3      ga_8
  C2  C1  O5      ga_9
  C1  O5  C5      ga_10
 -O4  C1  O5      ga_9
 -O4  C1  C2      ga_9
  O5  C5  C6      ga_9
  O5  C5  C4      ga_9
  C6  C5  C4      ga_8
  C5  C6  O6      ga_9
  C6  O6  H63     ga_12
  C5  C4  O4      ga_9
  C5  C4  C3      ga_8
  C4  O4  +C1     ga_10
  O4  C4  C3      ga_9
  C2  C3  C4      ga_8
  C2  C3  O3      ga_9
  C4  C3  O3      ga_9
  C3  O3  H32     ga_12
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C1  -O4  O5  C2  gi_2
  C7  C8  O7  N2  gi_1
  N2  C7  H22  C2  gi_1
  C2  N2  C3  C1  gi_2
  C5  O5  C6  C4  gi_2
  C4  C5  C3  O4  gi_2
  C3  O3  C2  C4  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_7
  C5  C2  C3  C1  gi_8
  C5  C2  C3  O5  gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C8  C7  N2  C2  gd_14
  C3  C2  N2  C7  gd_29
  O5  C1  C2  N2  gd_18
  O3  C3  C2  N2  gd_18
  C2  C1  O5  C5  gd_29
  C4  C5  O5  C1  gd_29
 -C4  -O4  C1  C2  gd_29
 -O4  C1  C2  C3  gd_34
 -O4  C1  C2  C3  gd_17
 -O4  C1  C2  O2  gd_18
  O6  C6  C5  O5  gd_18
  C3  C4  C5  O5  gd_17
  O3  C3  C4  C5  gd_17
  C2  C3  O3  H32  gd_23
  C3  C4  O4  +C1  gd_29
  H63  O6  C6  C5  gd_23
  C2  C3  C4  C5  gd_34
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C6  C5  C4  O4  gd_17
  N2  C2  C3  C4  gd_17
  C1  C2  C3  O3  gd_17
  O3  C3  C4  O4  gd_18
  O5  C5  C4  O4  gd_18
  C4  C5  C6  O6  gd_17
  C4  C5  C6  O6  gd_34
  O5  C1  C2  C3  gd_17
  C1  C2  C3  C4  gd_34
  C2  C3  C4  O4  gd_17

```

$\alpha$ -Man-(1→6)- $\beta$ -Man-(1→4)- $\beta$ -GlcNAc

```

[ BMA1 ]
[ atoms ]
C6  CH2      0.36300    0
O6  OA      -0.53500    0
C5  CH1      0.24200    1
O5  OA      -0.24200    1
C1  CH1      0.25400    2
C2  CH1      0.16000    3
O2  OA      -0.40000    3
H22 H        0.24000    3
C3  CH1      0.14200    4
O3  OA      -0.39600    4
C4  CH1      0.16000    5
O4  OA      -0.40000    5
H42 H        0.24000    5
[ bonds ]
C6  C5      gb_26
C5  O5      gb_20
C5  C4      gb_26
O5  C1      gb_20
C1  C2      gb_26
C2  O2      gb_20
C2  C3      gb_26
O2  H22     gb_1
C3  O3      gb_20
C3  C4      gb_26
C4  O4      gb_20
O4  H42     gb_1
C6  O6      gb_20
O6  +C1     gb_20
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
C6  C5  O5    ga_9
C6  C5  C4    ga_8
O5  C5  C4    ga_9
C5  O5  C1    ga_10
O5  C1  C2    ga_9
-04 C1  O5    ga_9
-04 C1  C2    ga_9
C1  C2  C3    ga_8
O2  C2  C3    ga_9
C2  O2  H22   ga_12
C2  C3  O3    ga_9
C2  C3  C4    ga_8
O3  C3  C4    ga_9
C5  C4  C3    ga_8
C5  C4  O4    ga_9
C3  C4  O4    ga_9
C4  O4  H42   ga_12
C5  C6  O6    ga_9
C6  O6  +C1   ga_10
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
C1  -O4  O5  C2  gi_2
C5  C6  C4  O5  gi_2
C2  C3  O2  C1  gi_2
C3  C4  O3  C2  gi_2
C4  O4  C5  C3  gi_2
C5  C2  C4  C1  gi_7
C5  C2  C3  C1  gi_8
C5  C2  C3  O5  gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
C2  C1  O5  C5  gd_29
C3  C2  C1  O5  gd_17
C1  C2  O2  H22  gd_23
C4  C3  C2  C1  gd_34
O4  C4  C3  C2  gd_17
C5  C4  O4  H42  gd_23
C2  C3  C4  C5  gd_34
C1  O5  C5  C4  gd_29
-C4  -O4  C1  C2  gd_29
-04  C1  C2  C3  gd_34
-04  C1  C2  C3  gd_17
-04  C1  C2  O2  gd_18
O5  C5  C4  C3  gd_17
C6  C5  C4  C3  gd_34
C6  C5  C4  O4  gd_17
C5  C6  O6  +C1  gd_29
O5  C1  C2  O2  gd_18
O2  C2  C3  C4  gd_17
O2  C2  C3  O3  gd_18
C1  C2  C3  O3  gd_17
O3  C3  C4  C5  gd_17
O3  C3  C4  O4  gd_18
O5  C5  C4  O4  gd_18
C4  C5  C6  O6  gd_17
C4  C5  C6  O6  gd_34
O5  C5  C6  O6  gd_18

```

$\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -Man

```

[ MAN7 ]
[ atoms ]
C6  CH2      0.36300    0
O6  OA      -0.53500    0
C5  CH1      0.24200    1
O5  OA      -0.24200    1
C1  CH1      0.17200    2
C2  CH1      0.16000    3
O2  OA      -0.40000    3
H22 H        0.24000    3
C3  CH1      0.14200    4
O3  OA      -0.39600    4
C4  CH1      0.16000    5
O4  OA      -0.40000    5
H42 H        0.24000    5
[ bonds ]
C6  C5      gb_26
C5  O5      gb_20
C5  C4      gb_26
O5  C1      gb_20
C1  C2      gb_26
C2  O2      gb_20
C2  C3      gb_26
O2  H22     gb_1
C3  O3      gb_20
C3  C4      gb_26
C4  O4      gb_20
O4  H42     gb_1
C6  O6      gb_20
O6  +C1     gb_20
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
C6  C5  O5      ga_9
C6  C5  C4      ga_8
O5  C5  C4      ga_9
C5  O5  C1      ga_10
O5  C1  C2      ga_9
C1  C2  O2      ga_9
-06 C1  O5      ga_9
-06 C1  C2      ga_9
C1  C2  C3      ga_8
O2  C2  C3      ga_9
C2  O2  H22     ga_12
C2  C3  O3      ga_9
C2  C3  C4      ga_8
O3  C3  C4      ga_9
C5  C4  C3      ga_8
C5  C4  O4      ga_9
C3  C4  O4      ga_12
C5  C6  O6      ga_9
C6  O6  +C1     ga_10
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
C1  -O6  C2  O5      gi_2
C5  C6  C4  O5      gi_2
C2  C3  O2  C1      gi_2
C3  C4  O3  C2      gi_2
C4  O4  C5  C3      gi_2
C5  C2  C4  C1      gi_7
C5  C2  C3  C1      gi_8
C5  C2  C3  O5      gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
C2  C1  O5  C5      gd_29
C3  C2  C1  O5      gd_17
C1  C2  O2  H22     gd_23
C4  C3  C2  C1      gd_34
O4  C4  C3  C2      gd_17
C5  C4  O4  H42     gd_23
C2  C3  C4  C5      gd_34
C1  O5  C5  C4      gd_29
-06 -06  C1  C2      gd_29
-06 C1  C2  C3      gd_34
-06 C1  C2  C3      gd_17
-06 C1  C2  O2      gd_18
O5  C5  C4  C3      gd_17
C6  C5  C4  C3      gd_34
C6  C5  C4  O4      gd_17
C5  C6  O6  +C1     gd_29
O5  C1  C2  O2      gd_18
O2  C2  C3  C4      gd_17
O2  C2  C3  O3      gd_18
C1  C2  C3  O3      gd_17
O3  C3  C4  C5      gd_17
O3  C3  C4  O4      gd_18
O5  C5  C4  O4      gd_18
C4  C5  C6  O6      gd_17
C4  C5  C6  O6      gd_34
O5  C5  C6  O6      gd_9

```

$\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -Man

```

[ MANX ]
[ atoms ]
  C6  CH2    0.16000    0
  O6  OA    -0.40000    0
H63  H      0.24000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.25400    2
  C2  CH1    0.16000    3
  O2  OA    -0.40000    3
H22  H      0.24000    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
H32  H      0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
H42  H      0.24000    5
[ bonds ]
  C6  C5    gb_26
  C5  O5    gb_20
  C5  C4    gb_26
  O5  C1    gb_20
  C1  C2    gb_26
  C2  O2    gb_20
  C2  C3    gb_26
  O2  H22   gb_1
  C3  O3    gb_20
  C3  C4    gb_26
  O3  H32   gb_1
  C4  O4    gb_20
  O4  H42   gb_1
  C6  O6    gb_20
  O6  H63   gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5    ga_9
  C6  C5  C4    ga_8
  O5  C5  C4    ga_9
  C5  O5  C1    ga_10
  O5  C1  C2    ga_9
  C1  C2  O2    ga_9
  C1  C2  C3    ga_8
  O2  C2  C3    ga_9
-03  C1  O5    ga_9
-03  C1  C2    ga_9
  C2  O2  H22   ga_12
  C2  C3  O3    ga_9
  C2  C3  C4    ga_8
  O3  C3  C4    ga_9
  C3  O3  H32   ga_12
  C5  C4  O4    ga_9
  C3  C4  O4    ga_9
  C4  O4  H42   ga_12
  C5  C6  O6    ga_9
  C6  O6  H63   ga_12
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C1  -O3  C2  O5    gi_2
  C5  C6  C4  O5    gi_2
  C2  C3  O2  C1    gi_2
  C3  C4  O3  C2    gi_2
  C4  O4  C5  C3    gi_2
  C5  C2  C4  C1    gi_7
  C5  C2  C3  C1    gi_8
  C5  C2  C3  O5    gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C2  C1  O5  C5    gd_29
  C3  C2  C1  O5    gd_17
  C1  C2  O2  H22   gd_23
  C4  C3  C2  C1    gd_34
  C2  C3  O3  H32   gd_23
  O4  C4  C3  C2    gd_17
  C5  C4  O4  H42   gd_23
  C2  C3  C4  C5    gd_34
  C1  O5  C5  C4    gd_29
  O5  C5  C4  C3    gd_17
  C6  C5  C4  C3    gd_34
  C6  C5  C4  O4    gd_17
  O5  C1  C2  O2    gd_18
  O2  C2  C3  C4    gd_17
  O2  C2  C3  O3    gd_18
-C3  -O3  C1  C2    gd_29
-03  C1  C2  C3    gd_34
-03  C1  C2  C3    gd_17
-03  C1  C2  O2    gd_18
  C1  C2  C3  O3    gd_17
  O3  C3  C4  C5    gd_17
  O3  C3  C4  O4    gd_18
  O5  C5  C4  O4    gd_18
  C4  C5  C6  O6    gd_17
  C4  C5  C6  O6    gd_34
  O5  C5  C6  O6    gd_18
  C5  C6  O6  H63   gd_23

```

$\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -Man

```

[ MANY ]
[ atoms ]
  C6  CH2    0.16000    0
  O6  OA    -0.40000    0
H63  H      0.24000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.17200    2
  C2  CH1    0.16000    3
  O2  OA    -0.40000    3
H22  H      0.24000    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
H32  H      0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
H42  H      0.24000    5

[ bonds ]
  C6  C5    gb_26
  C5  O5    gb_20
  C5  C4    gb_26
  O5  C1    gb_20
  C1  C2    gb_26
  C2  O2    gb_20
  C2  C3    gb_26
  O2  H22   gb_1
  C3  O3    gb_20
  C3  C4    gb_26
  O3  H32   gb_1
  C4  O4    gb_20
  O4  H42   gb_1
  C6  O6    gb_20
  O6  H63   gb_1

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5    ga_9
  C6  C5  C4    ga_8
  O5  C5  C4    ga_9
  C5  O5  C1    ga_10
  O5  C1  C2    ga_9
  C1  C2  O2    ga_9
  C1  C2  C3    ga_8
  O2  C2  C3    ga_9
 -O6  C1  O5    ga_9
 -O6  C1  C2    ga_9
  C2  O2  H22   ga_12
  C2  C3  O3    ga_9
  C2  C3  C4    ga_8

  O3  C3  C4    ga_9
  C3  O3  H32   ga_12
  C5  C4  C3    ga_8
  C5  C4  O4    ga_9
  C3  C4  O4    ga_9
  C4  O4  H42   ga_12
  C5  C6  O6    ga_9
  C6  O6  H63   ga_12

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C1  -O6  C2  O5    gi_2
  C5  C6  C4  O5    gi_2
  C2  C3  O2  C1    gi_2
  C3  C4  O3  C2    gi_2
  C4  O4  C5  C3    gi_2
  C5  C2  C4  C1    gi_7
  C5  C2  C3  C1    gi_8
  C5  C2  C3  O5    gi_9

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C2  C1  O5  C5    gd_29
  C3  C2  C1  O5    gd_17
  C1  C2  O2  H22   gd_23
  C4  C3  C2  C1    gd_34
  C2  C3  O3  H32   gd_23
  O4  C4  C3  C2    gd_17
  C5  C4  O4  H42   gd_23
  C2  C3  C4  C5    gd_34
  C1  O5  C5  C4    gd_29
  O5  C5  C4  C3    gd_17
  C6  C5  C4  C3    gd_34
  C6  C5  C4  O4    gd_17
  O5  C1  C2  O2    gd_18
  O2  C2  C3  C4    gd_17
  O2  C2  C3  O3    gd_18
 -C6  -O6  C1  C2    gd_29
 -O6  C1  C2  C3    gd_34
 -O6  C1  C2  C3    gd_17
 -O6  C1  C2  O2    gd_18
  C1  C2  C3  O3    gd_17
  O3  C3  C4  C5    gd_17
  O3  C3  C4  O4    gd_18
  O5  C5  C4  O4    gd_18
  C4  C5  C6  O6    gd_17
  C4  C5  C6  O6    gd_34
  O5  C5  C6  O6    gd_18
  C5  C6  O6  H63   gd_23

```

*$\alpha$ -Man-(1→O)-PO<sub>4</sub>-Ser*

[ SER2 ]								
[ atoms ]								
N	N	-0.31000	0	-C	N	CA	ga_31	
H	H	0.31000	0	N	CA	C	ga_13	
CA	CH1	0.00000	1	N	CA	CB	ga_13	
CB	CH2	0.15500	2	C	CA	CB	ga_13	
OG	OA	-0.51500	2	CA	CB	OG	ga_13	
C	C	0.450	3	CA	C	O	ga_30	
O	O	-0.450	3	CA	C	+N	ga_19	
				O	C	+N	ga_33	
[ bonds ]				[ impropers ]				
N	H	gb_2		; ai	aj	ak	al	gromos type
N	CA	gb_21		N	-C	CA	H	gi_1
CA	C	gb_27		C	CA	+N	O	gi_1
C	O	gb_5		CA	N	C	CB	gi_2
C	+N	gb_10		[ dihedrals ]				
CA	CB	gb_27		; ai	aj	ak	al	gromos type
CB	OG	gb_18		-CA	-C	N	CA	gd_14
[ angles ]				-C	N	CA	C	gd_39
; ai	aj	ak	gromos type	N	CA	C	+N	gd_40
-C	N	H	ga_32	N	CA	CB	OG	gd_34
H	N	CA	ga_18					

*Asp-ETNP*

[ ASP2 ]								
[ atoms ]								
N	NL	-0.31000	0	-C	N	CA	ga_31	
H	H	0.31000	0	N	CA	C	ga_13	
CA	CH1	0.00000	1	N	CA	CB	ga_13	
CB	CH2	0.00000	1	C	CA	CB	ga_13	
CG	C	0.27000	2	CA	CB	CG	ga_15	
OD1	OM	-0.63500	2	CB	CG	OD1	ga_22	
OD2	OM	-0.63500	2	CB	CG	OD2	ga_22	
C	C	0.27400	3	OD1	CG	OD2	ga_38	
O	O	-0.35500	3	CA	C	O	ga_30	
				CA	C	+N	ga_19	
[ bonds ]				O	C	+N	ga_33	
N	H	gb_2		[ impropers ]				
N	CA	gb_21		; ai	aj	ak	al	gromos type
CA	C	gb_27		N	-C	CA	H	gi_1
C	O	gb_5		C	CA	+N	O	gi_1
C	+N	gb_10		CA	N	C	CB	gi_2
CA	CB	gb_27		CG	OD1	OD2	CB	gi_1
CB	CG	gb_27		[ dihedrals ]				
CG	OD1	gd_6		; ai	aj	ak	al	gromos type
CG	OD2	gd_6		-CA	-C	N	CA	gd_14
[ angles ]				-C	N	CA	C	gd_39
; ai	aj	ak	gromos type	N	CA	C	+N	gd_40
-C	N	H	ga_32	N	CA	CB	CG	gd_34
H	N	CA	ga_18	CA	CB	CG	OD1	gd_40

$\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ O)-PO<sub>4</sub>-Ser

```

[ MANP ]
[ atoms ]
  C6  CH2    0.16000    0
  O6  OA    -0.40000    0
H63  H      0.24000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.17500    2
  O1  OA    -0.48200    2
OAI  OM    -0.78000    2
OAQ  OM    -0.78000    2
PAH  P      1.22700    2
  C2  CH1    0.14200    3
  O2  OA    -0.39600    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
H32  H      0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
H42  H      0.24000    5
[ bonds ]
  C6  C5      gb_26
  C5  O5      gb_20
  C5  C4      gb_26
  O5  C1      gb_20
  C1  C2      gb_26
  C2  O2      gb_20
  C2  C3      gb_26
  C3  O3      gb_20
  C3  C4      gb_26
  O3  H32     gb_1
  C4  O4      gb_20
  O4  H42     gb_1
  C6  O6      gb_20
  O6  H63     gb_1
  C1  O1      gb_20
  O1  PAH     gb_28
PAH  OAQ     gb_24
PAH  OAI     gb_24
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5      ga_9
  C6  C5  C4      ga_8
  O5  C5  C4      ga_9
  C5  O5  C1      ga_10
  O5  C1  C2      ga_9
  C1  C2  O2      ga_9
  C1  C2  C3      ga_8
  O2  C2  C3      ga_9
  O1  C1  O5      ga_9
  O1  C1  C2      ga_13
  C2  C3  O3      ga_9
  C2  C3  C4      ga_8
  O3  C3  C4      ga_9
  C3  O3  H32     ga_12
  C3  O3  H32     ga_12
  C5  C4  C3      ga_8
  C5  C4  O4      ga_9
  C3  C4  O4      ga_9
  C4  O4  H42     ga_12
  C5  C6  O6      ga_9
  C6  O6  H63     ga_12
  C1  O1  PAH     ga_26
  O1  PAH  OAQ     ga_14
  O1  PAH  OAI     ga_14
  OAQ  PAH  OAI     ga_29
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C5  C6  C4  O5      gi_2
  C2  C3  O2  C1      gi_2
  C3  C4  O3  C2      gi_2
  C4  O4  C5  C3      gi_2
  PAH  O1  OAQ  OAI     gi_2
  C5  C2  C4  C1      gi_7
  C5  C2  C3  C1      gi_8
  C5  C2  C3  O5      gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C2  C1  O5  C5      gd_29
  C3  C2  C1  O5      gd_17
  C4  C3  C2  C1      gd_34
  C2  C3  O3  H32     gd_23
  O4  C4  C3  C2      gd_17
  C5  C4  O4  H42     gd_23
  C2  C3  C4  C5      gd_34
  C1  O5  C5  C4      gd_29
  O5  C5  C4  C3      gd_17
  C6  C5  C4  C3      gd_34
  C6  C5  C4  O4      gd_17
  O5  C1  C2  O2      gd_18
  O2  C2  C3  C4      gd_17
  O2  C2  C3  O3      gd_18
PAH  O1  C1  O5      gd_29
  O1  C1  C2  C3      gd_17
  O1  C1  C2  O2      gd_18
  C1  O1  PAH  OAQ     gd_19
  C1  O1  PAH  OAQ     gd_22
  C1  O1  PAH  OAI     gd_19
  C1  O1  PAH  OAI     gd_22
  C1  C2  C3  O3      gd_17
  O3  C3  C4  C5      gd_17
  O3  C3  C4  O4      gd_18
  O5  C5  C4  O4      gd_18
  C4  C5  C6  O6      gd_17
  C4  C5  C6  O6      gd_34
  O5  C5  C6  O6      gd_18
  C5  C6  O6  H63     gd_23

```

$\alpha$ -Man-(1→2)- $\alpha$ -Man-(1→2)- $\alpha$ -Man

```

[ MAN5 ]
[ atoms ]
  C6  CH2    0.16000    0
  O6  OA    -0.40000    0
H63   H     0.24000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.25400    2
  C2  CH1    0.14200    3
  O2  OA    -0.39600    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
H32   H     0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
H42   H     0.24000    5
[ bonds ]
  C6  C5      gb_26
  C5  O5      gb_20
  C5  C4      gb_26
  O5  C1      gb_20
  C1  C2      gb_26
  C2  O2      gb_20
  C2  C3      gb_26
  C3  O3      gb_20
  C3  C4      gb_26
  O3  H32     gb_1
  C4  O4      gb_20
  O4  H42     gb_1
  C6  O6      gb_20
  O6  H63     gb_1
[ angles ]
; ai   aj   ak   gromos type
  C6   C5   O5    ga_9
  C6   C5   C4    ga_8
  O5   C5   C4    ga_9
  C5   O5   C1    ga_10
  O5   C1   C2    ga_9
  C1   C2   O2    ga_9
  C1   C2   C3    ga_8
  O2   C2   C3    ga_9
 -O2   C1   O5    ga_9
 -O2   C1   C2    ga_9
  C2   C3   O3    ga_9
  C2   C3   C4    ga_8
  O3   C3   C4    ga_9
  C3   O3   H32    ga_12

  C5  C4  C3      ga_8
  C5  C4  O4      ga_9
  C3  C4  O4      ga_9
  C4  O4  H42     ga_12
  C5  C6  O6      ga_9
  C6  O6  H63     ga_12
[ impropers ]
; ai   aj   ak   al   gromos type
  C1  -O2  C2    O5    gi_2
  C5  C6   C4    O5    gi_2
  C2  C3   O2    C1    gi_2
  C3  C4   O3    C2    gi_2
  C4  O4   C5    C3    gi_2
  C5  C2   C4    C1    gi_7
  C5  C2   C3    C1    gi_8
  C5  C2   C3    O5    gi_9
[ dihedrals ]
; ai   aj   ak   al   gromos type
  C2  C1   O5    C5    gd_29
  C3  C2   C1    O5    gd_17
  C4  C3   C2    C1    gd_34
  C2  C3   O3    H32   gd_23
  O4  C4   C3    C2    gd_17
  C5  C4   O4    H42   gd_23
  C2  C3   C4    C5    gd_34
  C1  O5   C5    C4    gd_29
  O5  C5   C4    C3    gd_17
  C6  C5   C4    C3    gd_34
  C6  C5   C4    O4    gd_17
  O5  C1   C2    O2    gd_18
  O2  C2   C3    C4    gd_17
  O2  C2   C3    O3    gd_18
 -C2 -O2   C1    C2    gd_29
 -O2  C1   C2    C3    gd_34
 -O2  C1   C2    C3    gd_17
 -O2  C1   C2    O2    gd_18
  C1  C2   C3    O3    gd_17
  O3  C3   C4    C5    gd_17
  O3  C3   C4    O4    gd_18
  O5  C5   C4    O4    gd_18
  C4  C5   C6    O6    gd_17
  C4  C5   C6    O6    gd_34
  O5  C5   C6    O6    gd_18
  C5  C6   O6    H63   gd_23

```

$\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Man

```

[ MAN6 ]
[ atoms ]
  C6  CH2    0.16000    0
  O6  OA    -0.40000    0
H63  H      0.24000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.25400    2
  C2  CH1    0.16000    3
  O2  OA    -0.40000    3
H22  H      0.24000    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
H32  H      0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
H42  H      0.24000    5
[ bonds ]
  C6  C5    gb_26
  C5  O5    gb_20
  C5  C4    gb_26
  O5  C1    gb_20
  C1  C2    gb_26
  C2  O2    gb_20
  C2  C3    gb_26
  O2  H22   gb_1
  C3  O3    gb_20
  C3  C4    gb_26
  O3  H32   gb_1
  C4  O4    gb_20
  O4  H42   gb_1
  C6  O6    gb_20
  O6  H63   gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5    ga_9
  C6  C5  C4    ga_8
  O5  C5  C4    ga_9
  C5  O5  C1    ga_10
  O5  C1  C2    ga_9
  C1  C2  O2    ga_9
  C1  C2  C3    ga_8
  O2  C2  C3    ga_9
-02  C1  O5    ga_9
-02  C1  C2    ga_9
  C2  O2  H22   ga_12
  C2  C3  O3    ga_9
  C2  C3  C4    ga_8
  O3  C3  C4    ga_9
  C3  O3  H32   ga_12
  C5  C6  O6    ga_9
  C6  O6  H63   ga_12
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C1  -O2  C2    O5    gi_2
  C5  C6  C4    O5    gi_2
  C2  C3  O2    C1    gi_2
  C3  C4  O3    C2    gi_2
  C4  O4  C5    C3    gi_2
  C5  C2  C4    C1    gi_7
  C5  C2  C3    C1    gi_8
  C5  C2  C3    O5    gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C2  C1  O5    C5    gd_29
  C3  C2  C1    O5    gd_17
  C1  C2  O2    H22   gd_23
  C4  C3  C2    C1    gd_34
  C2  C3  O3    H32   gd_23
  O4  C4  C3    C2    gd_17
  C5  C4  O4    H42   gd_23
  C2  C3  C4    C5    gd_34
  C1  O5  C5    C4    gd_29
  O5  C5  C4    C3    gd_17
  C6  C5  C4    C3    gd_34
  C6  C5  C4    O4    gd_17
  O5  C1  C2    O2    gd_18
  O2  C2  C3    C4    gd_17
  O2  C2  C3    O3    gd_18
-C2  -O2  C1    C2    gd_29
-02  C1  C2    C3    gd_34
-02  C1  C2    C3    gd_17
-02  C1  C2    O2    gd_18
  C1  C2  C3    O3    gd_17
  O3  C3  C4    C5    gd_17
  O3  C3  C4    O4    gd_18
  O5  C5  C4    O4    gd_18
  C4  C5  C6    O6    gd_17
  C4  C5  C6    O6    gd_34
  O5  C5  C6    O6    gd_18
  C5  C6  O6    H63   gd_23

```

**Asp-ETNP-(O→6)-α-Man**

<pre>[ ETNP ] [ atoms ]   N      N      -0.16500    0   H      H      0.24600    0   CAF    CH2    0.07500    1   CAQ    CH2    0.08000    1   OAO    OA     -0.51500    2   P      P      1.22700    2   OAT    OM     -0.78000    2   OAP    OM     -0.78000    2 [ bonds ]   N      H      gb_2   N      CAF    gb_21   CAF    CAQ    gb_27   CAQ    OAO    gb_18   OAO    P      gb_28   P      OAT    gb_24   P      OAP    gb_24   P      +O6    gb_28 [ angles ] ; ai  aj  ak  gromos type   -C  N   H   ga_32   -C  N   CAF  ga_31</pre>		<pre>  H      N      CAF      ga_18   N      CAF    CAQ      ga_13   CAF    CAQ    OAO      ga_13   CAQ    OAO    P        ga_26   OAO    P      OAT      ga_14   OAO    P      OAP      ga_14   OAO    P      +O6      ga_5   OAT    P      OAP      ga_29   OAT    P      +O6      ga_14   OAP    P      +O6      ga_14 [ impropers ] ; ai  aj  ak  al  gromos type   N   -C  CAF  H   gi_1   P   OAO OAP  OAT  gi_2 [ dihedrals ] ; ai  aj  ak  al  gromos type   -CA -C   N   CAF  gd_14   -C   N   CAF  CAQ  gd_39   N   CAF  CAQ  OAO  gd_4   CAF  CAQ  OAO  P    gd_22   CAQ  OAO  P    +O6  gd_19   OAO  P    +O6  +C6  gd_19</pre>
--	--	---

**AEP-(O→6)-α-GlcN**

<pre>[ AEP ] [ atoms ]   P      P      1.22700    0   OAR    OM     -0.78000    0   OAJ    OM     -0.78000    0   OAP    OA     -0.37800    0   CAO    CH2    0.30000    1   CAP    CH2    0.19500    2   NAS    NL     -0.30500    3   H1     H      0.27600    3   H2     H      0.27600    3   H3     H      0.27600    3 [ bonds ]   P      OAR    gb_24   P      OAJ    gb_24   P      OAP    gb_28   OAP    CAO    gb_18   CAO    CAP    gb_27   CAP    NAS    gb_21   NAS    H1     gb_2   NAS    H2     gb_2   NAS    H3     gb_2</pre>		<pre>[ angles ] ; ai  aj  ak  gromos type   OAP  P   OAR  ga_14   OAP  P   OAJ  ga_14   OAR  P   OAJ  ga_29   P    OAP  CAO  ga_26   OAP  CAO  CAP  ga_13   CAO  CAP  NAS  ga_15   CAP  NAS  H1   ga_18   CAP  NAS  H2   ga_18   CAP  NAS  H3   ga_18   H1   NAS  H2   ga_10   H1   NAS  H3   ga_10   H2   NAS  H3   ga_10 [ impropers ] ; ai  aj  ak  al  gromos type   P    OAP  OAR  OAJ  gi_2   NAS  CAP  H1   H2   gi_2 [ dihedrals ] ; ai  aj  ak  al  gromos type   CAP  CAO  OAP  P    gd_22   NAS  CAP  CAO  OAP  gd_34   CAO  CAP  NAS  H1   gd_29   OAR  P    OAP  CAO  gd_19</pre>
---	--	--

ETNP-(O→6)- $\alpha$ -Man-(1→2)- $\alpha$ -Man

```

[ MAN1 ]
[ atoms ]
  C6  CH2      0.17500    0
  O6  OA      -0.48200    0
  C5  CH1      0.24200    1
  O5  OA      -0.24200    1
  C1  CH1      0.25400    2
  C2  CH1      0.14200    3
  O2  OA      -0.39600    3
  C3  CH1      0.16000    4
  O3  OA      -0.40000    4
  H32  H       0.24000    4
  C4  CH1      0.16000    5
  O4  OA      -0.40000    5
  H42  H       0.24000    5
[ bonds ]
  C6  C5      gb_26
  C5  O5      gb_20
  C5  C4      gb_26
  O5  C1      gb_20
  C1  C2      gb_26
  C2  O2      gb_20
  C2  C3      gb_26
  C3  O3      gb_20
  C3  C4      gb_26
  O3  H32     gb_1
  C4  O4      gb_20
  O4  H42     gb_1
  C6  O6      gb_20
  O6  -P      gb_28
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5  ga_9
  C6  C5  C4  ga_8
  O5  C5  C4  ga_9
  C5  O5  C1  ga_10
  O5  C1  C2  ga_9
  C1  C2  O2  ga_9
+O2  C1  O5  ga_9
+O2  C1  C2  ga_9
  C1  C2  C3  ga_8
  O2  C2  C3  ga_9
  C2  C3  O3  ga_9
  C2  C3  C4  ga_8
  O3  C3  C4  ga_9
  C6  O6  -P  ga_26
  C3  O3  H32  ga_12
  C5  C4  C3  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C3  C4  O4  ga_9
  C4  O4  H42  ga_12
  C5  C6  O6  ga_9
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C1  +O2  O5  C2  gi_2
  C5  C6  C4  O5  gi_2
  C2  C3  O2  C1  gi_2
  C3  C4  O3  C2  gi_2
  C4  O4  C5  C3  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_7
  C5  C2  C3  C1  gi_8
  C5  C2  C3  O5  gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C2  C1  O5  C5  gd_29
  C3  C2  C1  O5  gd_17
  C4  C3  C2  C1  gd_34
  C2  C3  O3  H32  gd_23
  O4  C4  C3  C2  gd_17
  C5  C4  O4  H42  gd_23
  C2  C3  C4  C5  gd_34
  C1  O5  C5  C4  gd_29
+C2  +O2  C1  C2  gd_29
+O2  C1  C2  C3  gd_17
+O2  C1  C2  C3  gd_34
+O2  C1  C2  O2  gd_18
  O5  C5  C4  C3  gd_17
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C6  C5  C4  O4  gd_17
  C5  C6  O6  -P  gd_23
  O5  C1  C2  O2  gd_18
  O2  C2  C3  C4  gd_17
  O2  C2  C3  O3  gd_18
  C1  C2  C3  O3  gd_17
  O3  C3  C4  C5  gd_17
  O3  C3  C4  O4  gd_18
  O5  C5  C4  O4  gd_18
  C4  C5  C6  O6  gd_17
  C4  C5  C6  O6  gd_34
  O5  C5  C6  O6  gd_18

```

*$\alpha$ -Man-(1→2)- $\alpha$ -Man-(1→6)- $\alpha$ -Man*

```

[ MAN2 ]
[ atoms ]
  C6  CH2    0.16000    0
  O6  OA    -0.40000    0
H63  H      0.24000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.17200    2
  C2  CH1    0.14200    3
  O2  OA    -0.39600    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
H32  H      0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
H42  H      0.24000    5
[ bonds ]
  C6  C5    gb_26
  C5  O5    gb_20
  C5  C4    gb_26
  O5  C1    gb_20
  C1  C2    gb_26
  C2  O2    gb_20
  O2  -C1   gb_20
  C2  C3    gb_26
  C3  O3    gb_20
  C3  C4    gb_26
  O3  H32   gb_1
  C4  O4    gb_20
  O4  H42   gb_1
  C6  O6    gb_20
  O6  H63   gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5  ga_9
  C6  C5  C4  ga_8
  O5  C5  C4  ga_9
  C5  O5  C1  ga_10
  O5  C1  C2  ga_9
  C1  C2  O2  ga_9
  C1  C2  C3  ga_8
+O6  C1  O5  ga_9
+O6  C1  C2  ga_9
  O2  C2  C3  ga_9
  C2  O2  -C1  ga_10
  C2  C3  O3  ga_9
  C2  C3  C4  ga_8
  O3  C3  C4  ga_9
  C3  O3  H32  ga_12
  C5  C4  C3  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C3  C4  O4  ga_9
  C4  O4  H42  ga_12
  C5  C6  O6  ga_9
  C6  O6  H63  ga_12
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C1  +O6  C2  O5  gi_2
  C5  C6  C4  O5  gi_2
  C2  C3  O2  C1  gi_2
  C3  C4  O3  C2  gi_2
  C4  O4  C5  C3  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_7
  C5  C2  C3  C1  gi_8
  C5  C2  C3  O5  gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C2  C1  O5  C5  gd_29
  C3  C2  C1  O5  gd_17
  C3  C2  O2  -C1  gd_29
  C4  C3  C2  C1  gd_34
  C2  C3  O3  H32  gd_23
  O4  C4  C3  C2  gd_17
  C5  C4  O4  H42  gd_23
  C2  C3  C4  C5  gd_34
  C1  O5  C5  C4  gd_29
  O5  C5  C4  C3  gd_17
+C6  +O6  C1  C2  gd_29
+O6  C1  C2  C3  gd_34
+O6  C1  C2  C3  gd_17
+O6  C1  C2  O2  gd_18
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C6  C5  C4  O4  gd_17
  O5  C1  C2  O2  gd_18
  O2  C2  C3  C4  gd_17
  O2  C2  C3  O3  gd_18
  C1  C2  C3  O3  gd_17
  O3  C3  C4  C5  gd_17
  O3  C3  C4  O4  gd_18
  O5  C5  C4  O4  gd_18
  C4  C5  C6  O6  gd_17
  C4  C5  C6  O6  gd_34
  O5  C5  C6  O6  gd_18
  C5  C6  O6  H63  gd_23

```

$\alpha$ -Man-(1→6)- $\alpha$ -Man-(1→4)- $\alpha$ -GlcN

```

[ MAN4 ]
[ atoms ]
  C6  CH2    0.36300    0
  O6  OA    -0.53500    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.25400    2
  C2  CH1    0.16000    3
  O2  OA    -0.40000    3
  H22 H      0.24000    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
  H32 H      0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
  H42 H      0.24000    5
[ bonds ]
  C6  C5    gb_26
  C5  O5    gb_20
  C5  C4    gb_26
  O5  C1    gb_20
  C1  C2    gb_26
  C2  O2    gb_20
  O2  H22   gb_1
  C2  C3    gb_26
  C3  O3    gb_20
  C3  C4    gb_26
  O3  H32   gb_1
  C4  O4    gb_20
  O4  H42   gb_1
  C6  O6    gb_20
  O6  -C1   gb_20
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5  ga_9
  C6  C5  C4  ga_8
  O5  C5  C4  ga_9
  C5  O5  C1  ga_10
  O5  C1  C2  ga_9
  C1  C2  O2  ga_9
+O4  C1  O5  ga_9
+O4  C1  C2  ga_9
  C1  C2  C3  ga_8
  O2  C2  C3  ga_9
  C2  O2  H22  ga_12
  C2  C3  O3  ga_9
  C2  C3  C4  ga_8
  O3  C3  C4  ga_9
  C3  O3  H32  ga_12
  C5  C4  C3  ga_8
  C5  C4  O4  ga_9
  C3  C4  O4  ga_9
  C4  O4  H42  ga_12
  C5  C6  O6  ga_9
  C6  O6  -C1  ga_10
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C1  +O4  C2  O5  gi_2
  C5  C6  C4  O5  gi_2
  C2  C3  O2  C1  gi_2
  C3  C4  O3  C2  gi_2
  C4  O4  C5  C3  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_7
  C5  C2  C3  C1  gi_8
  C5  C2  C3  O5  gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C2  C1  O5  C5  gd_29
  C3  C2  C1  O5  gd_17
  C1  C2  O2  H22  gd_23
  C4  C3  C2  C1  gd_34
  C2  C3  O3  H32  gd_23
  O4  C4  C3  C2  gd_17
  C5  C4  O4  H42  gd_23
  C2  C3  C4  C5  gd_34
  C1  O5  C5  C4  gd_29
+C4  +O4  C1  C2  gd_29
+O4  C1  C2  C3  gd_17
+O4  C1  C2  C3  gd_34
+O4  C1  C2  O2  gd_18
  O5  C5  C4  C3  gd_17
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C6  C5  C4  O4  gd_17
  C5  C6  O6  -C1  gd_29
  O5  C1  C2  O2  gd_18
  O2  C2  C3  C4  gd_17
  O2  C2  C3  O3  gd_18
  C1  C2  C3  O3  gd_17
  O3  C3  C4  C5  gd_17
  O3  C3  C4  O4  gd_18
  O5  C5  C4  O4  gd_18
  C4  C5  C6  O6  gd_17
  C4  C5  C6  O6  gd_34
  O5  C5  C6  O6  gd_18

```

$\alpha$ -Man-(1→4)- $\alpha$ -GlcN-(1→6)-mlno

6  
↑  
AEP

```
[ GLCN ]
[ atoms ]
  C1  CH1    0.25400    0
  C2  CH1    0.15600    1
  N2   NL   -0.01700    1
  H22  H     0.28700    1
  H23  H     0.28700    1
  H24  H     0.28700    1
  C3  CH1    0.16000    2
  O3   OA   -0.40000    2
  H32  H     0.24000    2
  C4  CH1    0.14200    3
  O4   OA   -0.39600    3
  C5  CH1    0.24200    4
  O5   OA   -0.24200    4
  C6  CH1    0.17500    5
  O6   OA   -0.48200    5

[ bonds ]
  C6  C5    gb_26
  C5  O5    gb_20
  C5  C4    gb_26
  O5  C1    gb_20
  C1  C2    gb_26
  C2  N2    gb_21
  C2  C3    gb_26
  N2  H22   gb_2
  N2  H23   gb_2
  N2  H24   gb_2
  C3  O3    gb_20
  C3  C4    gb_26
  O3  H32   gb_1
  C4  O4    gb_20
  O4  -C1   gb_20
  C6  O6    gb_20

[ angles ]
  C6  C5    O5    ga_9
  C6  C5    C4    ga_8
  O5  C5    C4    ga_9
  C5  O5    C1    ga_10
  O5  C1    C2    ga_9
  C1  C2    N2    ga_15
+O6  C1    O5    ga_9
+O6  C1    C2    ga_9
  C1  C2    C3    ga_8
  N2  C2    C3    ga_15
  C2  N2    H22   ga_11
  C2  N2    H23   ga_11
  C2  N2    H24   ga_11
  H22 N2    H23   ga_10
  H23 N2    H24   ga_10
  H22 N2    H24   ga_10
  C2  C3    O3    ga_9
  C2  C3    C4    ga_8

  O3  C3    C4    ga_9
  C3  O3    H32   ga_12
  C5  C4    C3    ga_8
  C5  C4    O4    ga_9
  C3  C4    O4    ga_9
  C5  C6    O6    ga_9
  C4  O4    -C1   ga_10

[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C1  +O6  C2  O5  gi_2
  C5  C6  C4  O5  gi_2
  C2  C3  N2  C1  gi_2
  C3  C4  O3  C2  gi_2
  C4  O4  C5  C3  gi_2
  N2  C2  H23  H24  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_7
  C5  C2  C3  C1  gi_8
  C5  C2  C3  O5  gi_9

[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C2  C1  O5  C5  gd_29
  C3  C2  C1  O5  gd_17
  C4  C3  C2  C1  gd_34
  C2  C3  O3  H32  gd_23
  O4  C4  C3  C2  gd_17
  C2  C3  C4  C5  gd_34
  C1  O5  C5  C4  gd_29
+C6  +O6  C1  C2  gd_29
+O6  C1  C2  C3  gd_17
+O6  C1  C2  C3  gd_34
+O6  C1  C2  N2  gd_18
  O5  C5  C4  C3  gd_17
  C6  C5  C4  C3  gd_34
  C6  C5  C4  O4  gd_17
  C3  C4  O4  -C1  gd_29
  O5  C1  C2  N2  gd_18
  N2  C2  C3  C4  gd_34
  N2  C2  C3  O3  gd_18
  C1  C2  C3  O3  gd_17
  O3  C3  C4  C5  gd_17
  O3  C3  C4  O4  gd_18
  O5  C5  C4  O4  gd_18
  C4  C5  C6  O6  gd_17
  C4  C5  C6  O6  gd_34
  O5  C5  C6  O6  gd_18
  O5  C1  C2  N2  gd_18
  C1  C2  N2  H22  gd_29
  C6  C5  O5  C1  gd_29
  C1  O5  C5  C4  gd_29
  C3  C2  C1  O1  gd_17
  C6  C5  C4  O4  gd_17
  O1  C1  O5  C5  gd_18
```

*$\alpha$ -GlcN-(1 $\rightarrow$ 6)-mlno-(5 $\rightarrow$ 0)POP1*

```

[ INO1 ]
[ atoms ]
  C1  CH1  0.16000  0
  O1  OA   -0.40000  0
  H12 H     0.24000  0
  C2  CH1  0.16000  1
  O2  OA   -0.40000  1
  H22 H     0.24000  1
  C3  CH1  0.16000  2
  O3  OA   -0.40000  2
  H32 H     0.24000  2
  C4  CH1  0.16000  3
  O4  OA   -0.40000  3
  H42 H     0.24000  3
  C5  CH1  0.17500  4
  C6  CH1  0.14200  5
  O6  OA   -0.39600  5
[ bonds ]
  C5  C6  gb_26
  C5  C4  gb_26
  C6  O6  gb_20
  C6  C1  gb_26
  C1  O1  gb_20
  C1  C2  gb_26
  O1  H12 gb_1
  C2  O2  gb_20
  C2  C3  gb_26
  O2  H22 gb_1
  C3  O3  gb_20
  C3  C4  gb_26
  O3  H32 gb_1
  C4  O4  gb_20
  O4  H42 gb_1
  O6  -C1 gb_20
[ angles ]
+O7  C5  C6  ga_13
+O7  C5  C4  ga_13
  C6  C5  C4  ga_13
  C5  C6  O6  ga_13
  C5  C6  C1  ga_13
  O6  C6  C1  ga_13
  C6  O6  -C1 ga_10
  C6  C1  O1  ga_13
  C6  C1  C2  ga_13
  O1  C1  C2  ga_13
  C1  O1  H12 ga_12
  C1  C2  O2  ga_13
  C1  C2  C3  ga_13
  O2  C2  C3  ga_13
  C2  O2  H22 ga_12
  C3  O3  H32 ga_12
  C4  O4  H42 ga_12
  C2  C3  O3  ga_13
  C2  C3  C4  ga_13
  O3  C3  C4  ga_13
  C5  C4  C3  ga_13
  C5  C4  O4  ga_13
  C3  C4  O4  ga_13
[ impropers ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C5  +O7  C4  C6  gi_2
  C6  C5  O6  C1  gi_2
  C1  C6  C2  O1  gi_2
  C2  C1  O2  C3  gi_2
  C3  C2  C4  O3  gi_2
  C4  O4  C3  C5  gi_2
  C5  C2  C4  C1  gi_7
  C5  C2  C3  C1  gi_8
  C5  C2  C3  O5  gi_9
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  gromos type
  C4  C5  +O7  +P8  gd_23
  C1  C6  C5  +O7  gd_34
  C1  C6  C5  +O7  gd_17
  O4  C4  C5  +O7  gd_18
  C3  C4  C5  +O7  gd_34
  C3  C4  C5  +O7  gd_17
+O7  C5  C6  O6  gd_18
  C5  C6  O6  -C1  gd_29
  C6  C1  O1  H12  gd_23
  C1  C2  O2  H22  gd_23
  C2  C3  O3  H32  gd_23
  C5  C4  O4  H42  gd_23
  O1  C1  C6  O6  gd_18
  O2  C2  C1  O1  gd_18
  C3  O3  C2  O2  gd_18
  C4  O4  C3  O3  gd_18
  C2  C1  C6  C5  gd_34
  C3  C2  C1  C6  gd_34
  C4  C3  C2  C1  gd_34
  O4  C4  C3  C2  gd_17
  C2  C3  C4  C5  gd_34
  C3  C4  C5  C6  gd_34
  C4  C5  C6  C1  gd_34
  O1  C1  C6  C5  gd_17
  O4  C4  C5  C6  gd_17
  C4  C5  C6  O6  gd_17
  C5  C4  C3  O3  gd_17
  O1  C1  C2  C3  gd_17
  C2  C1  C6  O6  gd_17
  O3  C3  C2  C1  gd_17

```

## mlno-(5→O)POP1

```

[ POP1 ]
[ atoms ]
  O7  OA  -0.50000  0
  P8  P   1.40000  0
  O9  OM  -0.78000  0
  O10 OM  -0.78000  0
  O11 OA  -0.51500  0
  C12 CH2 0.40000  1
  C13 CH1 0.30000  1
  O14 OE  -0.70000  1
  C15 CH0 0.00000  1
  C17 CH2 0.00000  2
  C18 CH2 0.00000  3
  C19 CH2 0.00000  4
  C20 CH2 0.00000  5
  C21 CH2 0.00000  6
  C22 CH2 0.00000  7
  C23 CH2 0.00000  8
  C24 CR1 0.00000  9
  C25 CR1 0.00000 10
  C26 CH2 0.00000 11
  C27 CH2 0.00000 12
  C28 CH2 0.00000 13
  C29 CH2 0.00000 14
  C30 CH2 0.00000 15
  C31 CH2 0.00000 16
  C32 CH2 0.50000 17
  O33 OE  -0.70000 17
  C34 CH0 0.80000 17
  O35 O   -0.60000 17
  C36 CH2 0.00000 18
  C37 CH2 0.00000 19
  C38 CH2 0.00000 20
  C39 CH2 0.00000 21
  C40 CH2 0.00000 22
  C41 CH2 0.00000 23
  C42 CH2 0.00000 24
  C43 CH2 0.00000 25
  C44 CH2 0.00000 26
  C45 CH2 0.00000 27
  C46 CH2 0.00000 28
  C47 CH2 0.00000 29
  C48 CH2 0.00000 30
  C49 CH2 0.00000 31
  C50 CH3 0.00000 32
  CA1 CH2 0.00000 33
  CA2 CH3 0.00000 34

[ bonds ]
  O7  -C5  gb_20
  O7  P8   gb_28
  P8  O9   gb_24
  P8  O10  gb_24
  P8  O11  gb_28
  O11 C12  gb_18
  C12 C13  gb_27
  C13 O14  gb_18
  C13 C32  gb_27

  O14  C15  gb_10
  C15  C17  gb_23
  C17  C18  gb_27
  C18  C19  gb_27
  C19  C20  gb_27
  C20  C21  gb_27
  C21  C22  gb_27
  C22  C23  gb_27
  C23  C24  gb_27
  C24  C25  gb_27
  C25  C26  gb_27
  C26  C27  gb_27
  C27  C28  gb_27
  C28  C29  gb_27
  C29  C30  gb_27
  C30  C31  gb_27
  C31  CA1  gb_27
  CA1  CA2  gb_27
  C32  O33  gb_18
  O33  C34  gb_10
  C34  O35  gb_5
  C34  C36  gb_23
  C36  C37  gb_27
  C37  C38  gb_27
  C38  C39  gb_27
  C39  C40  gb_27
  C40  C41  gb_27
  C41  C42  gb_27
  C42  C43  gb_27
  C43  C44  gb_27
  C44  C45  gb_27
  C45  C46  gb_27
  C46  C47  gb_27
  C47  C48  gb_27
  C48  C49  gb_27
  C49  C50  gb_27

[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  P8  O7  -C5  ga_26
  O7  P8  O9   ga_14
  O7  P8  O10  ga_14
  O7  P8  O11  ga_5
  P8  O11 C12  ga_26
  O9  P8  O10  ga_29
  O9  P8  O11  ga_14
  O10 P8  O11  ga_14
  O11 C12 C13  ga_15
  C12 C13 O14  ga_13
  C12 C13 C32  ga_13
  C13 O14 C15  ga_22
  C13 C32 O33  ga_15
  O14 C13 C32  ga_13
  O14 C15 C17  ga_16
  C15 C17 C18  ga_15
  C17 C18 C19  ga_15
  C18 C19 C20  ga_15

```

[ angles ] ; continuação					O11	C12	C13	O14	gd_34
C19	C20	C21	ga_15		O11	C12	C13	C32	gd_34
C20	C21	C22	ga_15		O11	C12	C13	C32	gd_17
C21	C22	C23	ga_15		C12	C13	C32	O33	gd_34
C22	C23	C24	ga_15		C12	C13	C32	O33	gd_1
C23	C24	C25	ga_15		C12	C13	O14	C15	gd_29
C24	C25	C26	ga_15		C13	C32	O33	C34	gd_29
C25	C26	C27	ga_15		C13	O14	C15	C17	gd_13
C26	C27	C28	ga_15		O14	C13	C32	O33	gd_18
C27	C28	C29	ga_15		O14	C15	C17	C18	gd_40
C28	C29	C30	ga_15		C15	C17	C18	C19	gd_34
C29	C30	C31	ga_15		C17	C18	C19	C20	gd_34
C30	C31	CA1	ga_15		C18	C19	C20	C21	gd_34
C31	CA1	CA2	ga_15		C19	C20	C21	C22	gd_34
C32	O33	C34	ga_22		C20	C21	C22	C23	gd_34
O33	C34	O35	ga_31		C21	C22	C23	C24	gd_34
O33	C34	C36	ga_16		C22	C23	C24	C25	gd_34
C34	C36	C37	ga_15		C23	C24	C25	C26	gd_34
O35	C34	C36	ga_35		C24	C25	C26	C27	gd_34
C36	C37	C38	ga_15		C25	C26	C27	C28	gd_34
C37	C38	C39	ga_15		C26	C27	C28	C29	gd_34
C38	C39	C40	ga_15		C27	C28	C29	C30	gd_34
C39	C40	C41	ga_15		C28	C29	C30	C31	gd_34
C40	C41	C42	ga_15		C29	C30	C31	CA1	gd_34
C41	C42	C43	ga_15		C30	C31	CA1	CA2	gd_34
C42	C43	C44	ga_15		C13	C32	O33	C34	gd_29
C43	C44	C45	ga_15		C32	O33	C34	C36	gd_13
C44	C45	C46	ga_15		O33	C34	C36	C37	gd_40
C45	C46	C47	ga_15		C34	C36	C37	C38	gd_34
C46	C47	C48	ga_15		C36	C37	C38	C39	gd_34
C47	C48	C49	ga_15		C37	C38	C39	C40	gd_34
C48	C49	C50	ga_15		C38	C39	C40	C41	gd_34
[ impropers ]					C39	C40	C41	C42	gd_34
; ai	aj	ak	al		C40	C41	C42	C43	gd_34
C13	O14	C32	C12	gi_2	C41	C42	C43	C44	gd_34
C34	O33	C36	O35	gi_1	C42	C43	C44	C45	gd_34
[ dihedrals ]					C43	C44	C45	C46	gd_34
O11	P8	O7	-C5	gd_19	C44	C45	C46	C47	gd_34
P8	O7	-C5	-C4	gd_23	C45	C46	C47	C48	gd_34
O7	P8	O11	C12	gd_20	C46	C47	C48	C49	gd_34
O7	P8	O11	C12	gd_27	C47	C48	C49	C50	gd_34
P8	O11	C12	C13	gd_29					

## POPC

Arquivo "itp" de POPC usando campo de força Gromos 53a6 (Kukol, 2009)

```
[ moleculetype ]
; Name      nrexcl
POPC        3
[ atoms ]
;  nr      type  resnr  residu  atom  cgnr  charge  mass
   1      CH3    1     POPC    C1    0      0.4     15.0350
   2      CH3    1     POPC    C2    0      0.4     15.0350
   3      CH3    1     POPC    C3    0      0.4     15.0350
   4      NL     1     POPC    N4    0     -0.5     14.0067
   5      CH2    1     POPC    C5    0      0.3     14.0270
   6      CH2    1     POPC    C6    1      0.4     14.0270
   7      OA     1     POPC    O7    1     -0.8     15.9994
   8      P      1     POPC    P8    1      1.7     30.9738
   9      OM     1     POPC    O9    1     -0.8     15.9994
  10      OM     1     POPC   O10    1     -0.8     15.9994
  11      OA     1     POPC   O11    1     -0.7     15.9994
  12      CH2    1     POPC   C12    2      0.4     14.0270
  13      CH1    1     POPC   C13    2      0.3     13.0190
  14      OE     1     POPC   O14    2     -0.7     15.9994
  15      CH0    1     POPC   C15    2      0.7     12.0110
  16      O      1     POPC   O16    2     -0.7     15.9994
  17      CH2    1     POPC   C17    3      0      14.0270
  18      CH2    1     POPC   C18    4      0      14.0270
  19      CH2    1     POPC   C19    5      0      14.0270
  20      CH2    1     POPC   C20    6      0      14.0270
  21      CH2    1     POPC   C21    7      0      14.0270
  22      CH2    1     POPC   C22    8      0      14.0270
  23      CH2    1     POPC   C23    9      0      14.0270
  24      CR1    1     POPC   C24   10      0      13.0190
  25      CR1    1     POPC   C25   11      0      13.0190
  26      CH2    1     POPC   C26   12      0      14.0270
  27      CH2    1     POPC   C27   13      0      14.0270
  28      CH2    1     POPC   C28   14      0      14.0270
  29      CH2    1     POPC   C29   15      0      14.0270
  30      CH2    1     POPC   C30   16      0      14.0270
  31      CH2    1     POPC   C31   17      0      14.0270
  32      CH2    1     POPC   C32   18      0.5     14.0270
  33      OE     1     POPC   O33   18     -0.7     15.9994
  34      CH0    1     POPC   C34   18      0.8     12.0110
  35      O      1     POPC   O35   18     -0.6     15.9994
  36      CH2    1     POPC   C36   19      0      14.0270
  37      CH2    1     POPC   C37   20      0      14.0270
  38      CH2    1     POPC   C38   21      0      14.0270
  39      CH2    1     POPC   C39   22      0      14.0270
  40      CH2    1     POPC   C40   23      0      14.0270
  41      CH2    1     POPC   C41   24      0      14.0270
  42      CH2    1     POPC   C42   25      0      14.0270
  43      CH2    1     POPC   C43   26      0      14.0270
  44      CH2    1     POPC   C44   27      0      14.0270
  45      CH2    1     POPC   C45   28      0      14.0270
  46      CH2    1     POPC   C46   29      0      14.0270
  47      CH2    1     POPC   C47   30      0      14.0270
  48      CH2    1     POPC   C48   31      0      14.0270
  49      CH2    1     POPC   C49   32      0      14.0270
```

50	CH3	1	POPC	C50	33	0	15.0350
51	CH2	1	POPC	CA1	34	0	14.0270
52	CH3	1	POPC	CA2	35	0	15.0350

[ bonds ]

```

; ai aj funct
  4  5  2  gb_21
  5  6  2  gb_27
  6  7  2  gb_18
  7  8  2  gb_28
  8  9  2  gb_24
  8 10  2  gb_24
  8 11  2  gb_28
 11 12  2  gb_18
 12 13  2  gb_27
 13 14  2  gb_18
 13 32  2  gb_27
 14 15  2  gb_10
 15 16  2  gb_5
 15 17  2  gb_23
 17 18  2  gb_27
 18 19  2  gb_27
 19 20  2  gb_27
 20 21  2  gb_27
 21 22  2  gb_27
 22 23  2  gb_27
 23 24  2  gb_27
 24 25  2  gb_10
 25 26  2  gb_27
 26 27  2  gb_27
 27 28  2  gb_27
 28 29  2  gb_27
 29 30  2  gb_27
 30 31  2  gb_27
 31 51  2  gb_27
 51 52  2  gb_27
 32 33  2  gb_18
 33 34  2  gb_10
 34 35  2  gb_5
 34 36  2  gb_23
 36 37  2  gb_27
 37 38  2  gb_27
 38 39  2  gb_27
 39 40  2  gb_27
 40 41  2  gb_27
 41 42  2  gb_27
 42 43  2  gb_27
 43 44  2  gb_27
 44 45  2  gb_27
 45 46  2  gb_27
 46 47  2  gb_27
 47 48  2  gb_27
 48 49  2  gb_27
 49 50  2  gb_27
  1  4  2  gb_21
  2  4  2  gb_21
  3  4  2  gb_21

```

[ pairs ]

```

; ai aj funct
  1  6  1
  2  6  1
  3  6  1
  4  7  1
  5  8  1
  6  9  1
  6 10  1
  6 11  1
  7 12  1
  8 13  1
  9 12  1
 10 12  1
 11 14  1
 11 32  1
 12 15  1
 12 33  1
 13 16  1
 13 17  1
 13 34  1
 14 18  1
 14 33  1
 15 19  1
 15 32  1
 16 18  1
 22 25  1
 24 27  1
 32 35  1
 32 36  1
 33 37  1
 34 38  1
 35 37  1

```

[ impropers ]

```

; ai aj ak al funct gi
 13 14 32 12 2  gi_2
 15 14 17 16 2  gi_1
 34 33 36 35 2  gi_1
 23 24 25 26 2  gi_1

```

[ angles ]					26	27	28	2		
;	ai	aj	ak	funct						
	4	5	6	2	ga_15	27	28	29	2	ga_15
	5	6	7	2	ga_15	28	29	30	2	ga_15
	6	7	8	2	ga_26	29	30	31	2	ga_15
	7	8	9	2	ga_14	30	31	51	2	ga_15
	7	8	10	2	ga_14	31	51	52	2	ga_15
	7	8	11	2	ga_5	32	33	34	2	ga_22
	8	11	12	2	ga_26	33	34	35	2	ga_31
	9	8	10	2	ga_29	33	34	36	2	ga_16
	9	8	11	2	ga_14	34	36	37	2	ga_15
	10	8	11	2	ga_14	35	34	36	2	ga_35
	11	12	13	2	ga_15	36	37	38	2	ga_15
	12	13	14	2	ga_13	37	38	39	2	ga_15
	12	13	32	2	ga_13	38	39	40	2	ga_15
	13	14	15	2	ga_22	39	40	41	2	ga_15
	13	32	33	2	ga_15	40	41	42	2	ga_15
	14	13	32	2	ga_13	41	42	43	2	ga_15
	14	15	16	2	ga_31	42	43	44	2	ga_15
	14	15	17	2	ga_16	43	44	45	2	ga_15
	15	17	18	2	ga_15	44	45	46	2	ga_15
	16	15	17	2	ga_35	45	46	47	2	ga_15
	17	18	19	2	ga_15	46	47	48	2	ga_15
	18	19	20	2	ga_15	47	48	49	2	ga_15
	19	20	21	2	ga_15	48	49	50	2	ga_15
	20	21	22	2	ga_15	1	4	2	2	ga_13
	21	22	23	2	ga_15	2	4	3	2	ga_13
	22	23	24	2	ga_15	3	4	1	2	ga_13
	23	24	25	2	ga_27	1	4	5	2	ga_13
	24	25	26	2	ga_27	2	4	5	2	ga_13
	25	26	27	2	ga_15	3	4	5	2	ga_13

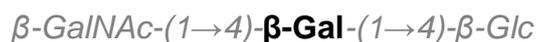
[ dihedrals ]									
;	ai	aj	ak	al	funct	phi0	cp	mult	
	1	4	5	6	1	gd_29			
	4	5	6	7	1	gd_4			
	4	5	6	7	1	gd_36			
	5	6	7	8	1	gd_29			
	6	7	8	11	1	gd_20			
	6	7	8	11	1	gd_27			
	7	8	11	12	1	gd_20			
	7	8	11	12	1	gd_27			
	8	11	12	13	1	gd_29			
	11	12	13	14	1	gd_34			
	11	12	13	32	1	gd_34			
	11	12	13	32	1	gd_17			
	12	13	32	33	1	gd_34			
	12	13	32	33	1	gd_17			
	12	13	14	15	1	gd_29			
	13	32	33	34	1	gd_29			
	13	14	15	17	1	gd_13			
	14	13	32	33	1	gd_18			
	14	15	17	18	1	gd_40			
	15	17	18	19	1	gd_34			
	17	18	19	20	1	gd_34			
	18	19	20	21	1	gd_34			
	19	20	21	22	1	gd_34			
	20	21	22	23	1	gd_34			
	21	22	23	24	1	0.0	3.4 1	0.0	3.4 1 ;phi3

21	22	23	24	1	180.0	1.7 1	180.0	1.7 1
21	22	23	24	1	0.0	7.3 1	0.0	7.3 1
22	23	24	25	1	180.0	7.5 1	180.0	7.5 1 ;phi2
22	23	24	25	1	0.0	3.9 1	0.0	3.9 1
22	23	24	25	1	180.0	1.1 1	180.0	1.1 1
22	23	24	25	1	90.0	-5.7 1	90.0	-5.7 1
24	25	26	27	1	180.0	7.5 1	180.0	7.5 1
24	25	26	27	1	0.0	3.9 1	0.0	3.9 1
24	25	26	27	1	180.0	1.1 1	180.0	1.1 1
24	25	26	27	1	90.0	-5.7 1	90.0	-5.7 1
25	26	27	28	1	0.0	3.4 1	0.0	3.4 1
25	26	27	28	1	180.0	1.7 1	180.0	1.7 1
25	26	27	28	1	0.0	7.3 1	0.0	7.3 1
26	27	28	29	1	gd_34			
27	28	29	30	1	gd_34			
28	29	30	31	1	gd_34			
29	30	31	51	1	gd_34			
30	31	51	52	1	gd_34			
13	32	33	34	1	gd_29			
32	33	34	36	1	gd_13			
33	34	36	37	1	gd_40			
34	36	37	38	1	gd_34			
36	37	38	39	1	gd_34			
37	38	39	40	1	gd_34			
38	39	40	41	1	gd_34			
39	40	41	42	1	gd_34			
40	41	42	43	1	gd_34			
41	42	43	44	1	gd_34			
42	43	44	45	1	gd_34			
43	44	45	46	1	gd_34			
44	45	46	47	1	gd_34			
45	46	47	48	1	gd_34			
46	47	48	49	1	gd_34			
47	48	49	50	1	gd_34			

### 8.3 Topologias dos monossacarídeos para GROMOS96 43a1

#### $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Glc

[ 1GLC ]									
[ atoms ]									
C6	CH2	0.16000	0	C1	O1	H12		ga_11	
O6	OA	-0.40000	0	C2	C3	O3		ga_8	
H63	H	0.24000	0	C2	C3	C4		ga_7	
C5	CH1	0.24200	1	O3	C3	C4		ga_8	
O5	OA	-0.24200	1	C5	C4	C3		ga_7	
C1	CH1	0.16000	2	C5	C4	O4		ga_8	
O1	OA	-0.40000	2	C3	C4	O4		ga_8	
H12	H	0.24000	2	C3	O3	H32		ga_11	
C2	CH1	0.16000	3	C5	C6	O6		ga_8	
O2	OA	-0.40000	3	C6	O6	H63		ga_11	
H22	H	0.24000	3	C4	O4	+C1		ga_9	
C3	CH1	0.16000	4	[ impropers ]					
O3	OA	-0.40000	4	C1	O1	O5	C2	gi_2	
H32	H	0.24000	4	C5	C6	C4	O5	gi_2	
C4	CH1	0.14200	5	C2	C3	O2	C1	gi_2	
O4	OA	-0.39600	5	C3	C4	O3	C2	gi_2	
[ bonds ]				C4	O4	C5	C3	gi_2	
C6	C5	gb_25		C5	C2	C4	C1	gi_7	
C5	O5	gb_19		C5	C2	C3	C1	gi_8	
C5	C4	gb_25		C5	C2	C3	O5	gi_9	
O5	C1	gb_19		[ dihedrals ]					
C1	C2	gb_25		C2	C1	O5	C5	gd_14	
C1	O1	gb_19		C3	C2	C1	O5	gd_7	
O1	H12	gb_1		C1	C2	O2	H22	gd_12	
C2	O2	gb_19		C4	C3	C2	C1	gd_17	
C2	C3	gb_25		O4	C4	C3	C2	gd_7	
O2	H22	gb_1		C2	C3	O3	H32	gd_12	
C3	O3	gb_19		C2	C3	C4	C5	gd_17	
O3	H32	gb_1		C1	O5	C5	C4	gd_14	
C3	C4	gb_25		O5	C5	C4	C3	gd_7	
C4	O4	gb_19		C6	C5	C4	C3	gd_17	
C6	O6	gb_19		C6	C5	C4	O4	gd_7	
O6	H63	gb_1		O5	C1	C2	O2	gd_8	
O4	+C1	gb_19		O2	C2	C3	C4	gd_7	
[ angles ]				O2	C2	C3	O3	gd_8	
C6	C5	O5	ga_8	H12	O1	C1	C2	gd_12	
C6	C5	C4	ga_7	O1	C1	C2	C3	gd_17	
O5	C5	C4	ga_8	O1	C1	C2	C3	gd_7	
C5	O5	C1	ga_9	O1	C1	C2	O2	gd_8	
O5	C1	C2	ga_8	C1	C2	C3	O3	gd_7	
C1	C2	O2	ga_8	O3	C3	C4	C5	gd_7	
C1	C2	C3	ga_7	O3	C3	C4	O4	gd_8	
O2	C2	C3	ga_8	O5	C5	C4	O4	gd_8	
O1	C1	O5	ga_8	C4	C5	C6	O6	gd_7	
O1	C1	C2	ga_8	C4	C5	C6	O6	gd_17	
C2	O2	H22	ga_11	O5	C5	C6	O6	gd_8	
				C5	C6	O6	H63	gd_12	
				C3	C4	O4	+C1	gd_14	



3

↑

2



[ 5GAL ]									
[ atoms ]									
C6	CH2	0.16000	0	C2	C3	O3		ga_8	
O6	OA	-0.40000	0	C2	C3	C4		ga_7	
H63	H	0.24000	0	O3	C3	C4		ga_8	
C5	CH1	0.24200	1	C5	C4	C3		ga_7	
O5	OA	-0.24200	1	C5	C4	O4		ga_8	
C1	CH1	0.25400	2	C3	C4	O4		ga_8	
C2	CH1	0.16000	3	C5	C6	O6		ga_8	
O2	OA	-0.40000	3	[ impropers ]					
H22	H	0.24000	3	C1	-O4	O5	C2	gi_2	
C3	CH1	0.14200	4	C5	C6	C4	O5	gi_2	
O3	OA	-0.39600	4	C2	C3	O2	C1	gi_2	
C4	CH1	0.14200	5	C3	C4	O3	C2	gi_2	
O4	OA	-0.39600	5	C4	O4	C5	C3	gi_2	
[ bonds ]				C5	C2	C4	C1	gi_7	
C6	C5	gb_25		C5	C2	C3	C1	gi_8	
C5	O5	gb_19		C5	C2	C3	O5	gi_9	
C5	C4	gb_25		[ dihedrals ]					
O5	C1	gb_19		C2	C1	O5	C5	gd_14	
C1	C2	gb_25		C3	C2	C1	O5	gd_7	
C2	O2	gb_19		C1	C2	O2	H22	gd_12	
C2	C3	gb_25		C4	C3	C2	C1	gd_17	
O2	H22	gb_1		O4	C4	C3	C2	gd_7	
C3	O3	gb_19		C2	C3	C4	C5	gd_17	
C3	C4	gb_25		C1	O5	C5	C4	gd_14	
C4	O4	gb_19		O5	C5	C4	C3	gd_7	
C6	O6	gb_19		C6	C5	C4	C3	gd_17	
O6	H63	gb_1		C6	C5	C4	O4	gd_7	
O4	+C1	gb_19		O5	C1	C2	O2	gd_8	
[ angles ]				O2	C2	C3	C4	gd_7	
C6	C5	O5	ga_8	O2	C2	C3	O3	gd_8	
C6	C5	C4	ga_7	-C4	-O4	C1	C2	gd_14	
O5	C5	C4	ga_8	-O4	C1	C2	C3	gd_17	
C5	O5	C1	ga_9	-O4	C1	C2	C3	gd_7	
O5	C1	C2	ga_8	-O4	C1	C2	O2	gd_8	
C1	C2	O2	ga_8	C1	C2	C3	O3	gd_7	
C1	C2	C3	ga_7	O3	C3	C4	C5	gd_7	
O2	C2	C3	ga_8	O3	C3	C4	O4	gd_8	
-O4	C1	O5	ga_8	O5	C5	C4	O4	gd_8	
-O4	C1	C2	ga_8	C4	C5	C6	O6	gd_7	
C2	O2	H22	ga_11	C4	C5	C6	O6	gd_17	
C6	O6	H63	ga_11	O5	C5	C6	O6	gd_8	
C4	O4	+C1	ga_9	C5	C6	O6	H63	gd_12	
				C3	C4	O4	+C1	gd_14	

$\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -GalNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Gal

[ 1NGA ]				
[ atoms ]				
C8	CH3	0.07000	0	
C7	C	0.27100	0	
O7	O	-0.40500	0	
N2	N	-0.23100	0	
H22	H	0.20100	0	
C2	CH1	0.09400	0	
C1	CH1	0.25400	1	
O5	OA	-0.24200	2	
C5	CH1	0.24200	2	
C6	CH2	0.16000	3	
O6	OA	-0.40000	3	
H63	H	0.24000	3	
C4	CH1	0.16000	4	
O4	OA	-0.40000	4	
H42	H	0.24000	4	
C3	CH1	0.14200	5	
O3	OA	-0.39600	5	
[ bonds ]				
C8	C7	gb_26		
C7	O7	gb_4		
C7	N2	gb_10		
N2	H22	gb_2		
N2	C2	gb_20		
C2	C1	gb_25		
C2	C3	gb_25		
C1	O5	gb_19		
O5	C5	gb_19		
C5	C6	gb_25		
C5	C4	gb_25		
C6	O6	gb_19		
O6	H63	gb_1		
C4	O4	gb_19		
C4	C3	gb_25		
O4	H42	gb_1		
C3	O3	gb_19		
O3	+C1	gb_19		
[ angles ]				
C8	C7	O7	ga_29	
C8	C7	N2	ga_18	
O7	C7	N2	ga_32	
C7	N2	H22	ga_31	
C7	N2	C2	ga_30	
H22	N2	C2	ga_24	
N2	C2	C1	ga_12	
N2	C2	C3	ga_12	
C1	C2	C3	ga_7	
C2	C1	O5	ga_8	
C1	O5	C5	ga_9	
-O4	C1	O5	ga_8	
-O4	C1	C2	ga_8	
O5	C5	C6	ga_8	
O5	C5	C4	ga_8	
C6	C5	C4	ga_7	
C5	C6	O6	ga_8	
C6	O6	H63	ga_11	
C5	C4	O4	ga_8	
C5	C4	C3	ga_7	
O4	C4	C3	ga_8	
C4	O4	H42	ga_11	
C2	C3	C4	ga_7	
C2	C3	O3	ga_8	
C4	C3	O3	ga_8	
C3	O3	+C1	ga_9	
[ impropers ]				
C1	-O4	O5	C2	gi_2
C7	C8	O7	N2	gi_1
N2	C7	H22	C2	gi_1
C2	N2	C3	C1	gi_2
C5	O5	C6	C4	gi_2
C4	C5	C3	O4	gi_2
C3	O3	C2	C4	gi_2
C5	C2	C4	C1	gi_7
C5	C2	C3	C1	gi_8
C5	C2	C3	O5	gi_9
[ dihedrals ]				
C8	C7	N2	C2	gd_4
C3	C2	N2	C7	gd_14
O5	C1	C2	N2	gd_8
O3	C3	C2	N2	gd_8
C2	C1	O5	C5	gd_14
C4	C5	O5	C1	gd_14
-C4	-O4	C1	C2	gd_14
-O4	C1	C2	C3	gd_17
-O4	C1	C2	C3	gd_7
-O4	C1	C2	O2	gd_8
O6	C6	C5	O5	gd_8
C3	C4	C5	O5	gd_7
O3	C3	C4	C5	gd_7
C2	C3	O3	+C1	gd_14
C3	C4	O4	H42	gd_12
C2	C3	C4	C5	gd_17
C6	C5	C4	C3	gd_17
C6	C5	C4	O4	gd_7
N2	C2	C3	C4	gd_7
C1	C2	C3	O3	gd_7
O3	C3	C4	O4	gd_8
O5	C5	C4	O4	gd_8
C4	C5	C6	O6	gd_7
C4	C5	C6	O6	gd_17
O5	C1	C2	C3	gd_7
C1	C2	C3	C4	gd_17
C2	C3	C4	O4	gd_7
H63	O6	C6	C5	gd_12

$\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -GalNAc

```

[ 6GAL ]
[ atoms ]
  C6  CH2    0.16000    0
  O6  OA    -0.40000    0
H63   H     0.24000    0
  C5  CH1    0.24200    1
  O5  OA    -0.24200    1
  C1  CH1    0.25400    2
  C2  CH1    0.16000    3
  O2  OA    -0.40000    3
H22   H     0.24000    3
  C3  CH1    0.16000    4
  O3  OA    -0.40000    4
H32   H     0.24000    4
  C4  CH1    0.16000    5
  O4  OA    -0.40000    5
H42   H     0.24000    5
[ bonds ]
  C6  C5    gb_25
  C5  O5    gb_19
  C5  C4    gb_25
  O5  C1    gb_19
  C1  C2    gb_25
  C2  O2    gb_19
  C2  C3    gb_25
  O2  H22   gb_1
  C3  O3    gb_19
  C3  C4    gb_25
  C4  O4    gb_19
  O4  H42   gb_1
  C6  O6    gb_19
  O6  H63   gb_1
  O3  H32   gb_1
[ angles ]
; ai  aj  ak  gromos type
  C6  C5  O5    ga_8
  C6  C5  C4    ga_7
  O5  C5  C4    ga_8
  C5  O5  C1    ga_9
  O5  C1  C2    ga_8
  C1  C2  O2    ga_8
  C1  C2  C3    ga_7
  O2  C2  C3    ga_8
 -O3  C1  O5    ga_8
 -O3  C1  C2    ga_8
  C2  O2  H22   ga_11
  C2  C3  O3    ga_8
  C2  C3  C4    ga_7
  O3  C3  C4    ga_8
  C5  C4  C3    ga_7
  C5  C4  O4    ga_8
  C3  C4  O4    ga_8
  C4  O4  H42   ga_11
  C5  C6  O6    ga_8
  C6  O6  H63   ga_11
  C3  O3  H32   ga_11
[ impropers ]
  C1  -O3  O5    C2    gi_2
  C5  C6  C4    O5    gi_2
  C2  C3  C1    O2    gi_2
  C3  C4  O3    C2    gi_2
  C4  O4  C3    C5    gi_2
  C5  C2  C4    C1    gi_7
  C5  C2  C3    C1    gi_8
  C5  C2  C3    O5    gi_9
[ dihedrals ]
  C2  C1  O5    C5    gd_14
  C3  C2  C1    O5    gd_7
  C1  C2  O2    H22   gd_12
  C4  C3  C2    C1    gd_17
  O4  C4  C3    C2    gd_7
  C5  C4  O4    H42   gd_12
  C2  C3  C4    C5    gd_17
  C1  O5  C5    C4    gd_14
  O5  C5  C4    C3    gd_7
  C6  C5  C4    C3    gd_17
  C6  C5  C4    O4    gd_7
  O5  C1  C2    O2    gd_8
  O2  C2  C3    C4    gd_7
  O2  C2  C3    O3    gd_8
 -C3  -O3  C1    C2    gd_14
 -O3  C1  C2    C3    gd_17
 -O3  C1  C2    C3    gd_7
 -O3  C1  C2    O2    gd_8
  C1  C2  C3    O3    gd_7
  O3  C3  C4    C5    gd_7
  O3  C3  C4    O4    gd_8
  O5  C5  C4    O4    gd_8
  C4  C5  C6    O6    gd_7
  C4  C5  C6    O6    gd_17
  O5  C5  C6    O6    gd_8
  C5  C6  O6    H63   gd_12
  C2  C3  O3    H32   gd_12

```

*$\alpha$ -Neu5Ac-(2→3)- $\beta$ -Gal-(1→3)- $\beta$ -GalNAc*

[ 4GAL ]									
[ atoms ]					O3	C3	C4		ga_8
C6	CH2	0.16000	0	C5	C4	C3			ga_7
O6	OA	-0.40000	0	C5	C4	O4			ga_8
H63	H	0.24000	0	C3	C4	O4			ga_8
C5	CH1	0.24200	1	C4	O4	H42			ga_11
O5	OA	-0.24200	1	C5	C6	O6			ga_8
C1	CH1	0.25400	2	C6	O6	H63			ga_11
C2	CH1	0.16000	3	C3	O3	+C2			ga_9
O2	OA	-0.40000	3	[ impropers ]					
H22	H	0.24000	3	C1	-O3	O5	C2		gi_2
C3	CH1	0.14200	4	C5	C6	C4	O5		gi_2
O3	OA	-0.39600	4	C2	C3	C1	O2		gi_2
C4	CH1	0.16000	5	C3	C4	O3	C2		gi_2
O4	OA	-0.40000	5	C4	O4	C3	C5		gi_2
H42	H	0.24000	5	C5	C2	C4	C1		gi_7
[ bonds ]				C5	C2	C3	C1		gi_8
C6	C5	gb_25		C5	C2	C3	O5		gi_9
C5	O5	gb_19		[ dihedrals ]					
C5	C4	gb_25		C2	C1	O5	C5		gd_14
O5	C1	gb_19		C3	C2	C1	O5		gd_7
C1	C2	gb_25		C1	C2	O2	H22		gd_12
C2	O2	gb_19		C4	C3	C2	C1		gd_17
C2	C3	gb_25		O4	C4	C3	C2		gd_7
O2	H22	gb_1		C5	C4	O4	H42		gd_12
C3	O3	gb_19		C2	C3	C4	C5		gd_17
C3	C4	gb_25		C1	O5	C5	C4		gd_14
C4	O4	gb_19		O5	C5	C4	C3		gd_7
O4	H42	gb_1		C6	C5	C4	C3		gd_17
C6	O6	gb_19		C6	C5	C4	O4		gd_7
O6	H63	gb_1		O5	C1	C2	O2		gd_8
O3	+C2	gb_19		O2	C2	C3	C4		gd_7
[ angles ]				O2	C2	C3	O3		gd_8
C6	C5	O5	ga_8	-C3	-O3	C1	C2		gd_14
C6	C5	C4	ga_7	-O3	C1	C2	C3		gd_17
O5	C5	C4	ga_8	-O3	C1	C2	C3		gd_7
C5	O5	C1	ga_9	-O3	C1	C2	O2		gd_8
O5	C1	C2	ga_8	C1	C2	C3	O3		gd_7
C1	C2	O2	ga_8	O3	C3	C4	C5		gd_7
C1	C2	C3	ga_7	O3	C3	C4	O4		gd_8
O2	C2	C3	ga_8	O5	C5	C4	O4		gd_8
-O3	C1	O5	ga_8	C4	C5	C6	O6		gd_7
-O3	C1	C2	ga_8	C4	C5	C6	O6		gd_17
C2	O2	H22	ga_11	O5	C5	C6	O6		gd_8
C2	C3	O3	ga_8	C5	C6	O6	H63		gd_12
C2	C3	C4	ga_7	C2	C3	O3	+C2		gd_14

$\alpha$ -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Gal

[ 1SIA ]				
[ atoms ]				
C11	CH3	0.07000	0	
C10	C	0.27100	0	
O10	O	-0.40500	0	
N5	N	-0.23100	0	
H52	H	0.20100	0	
C5	CH1	0.09400	0	
C4	CH1	0.16000	1	
O4	OA	-0.40000	1	
H42	H	0.24000	1	
C3	CH1	0.00000	2	
C2	CH1	0.25400	3	
C1	C	0.17200	4	
O1B	OM	-0.58600	4	
O1A	OM	-0.58600	4	
O6	OA	-0.24200	5	
C6	CH1	0.24200	5	
C7	CH1	0.16000	6	
O7	OA	-0.40000	6	
H73	H	0.24000	6	
C8	CH1	0.16000	7	
O8	OA	-0.40000	7	
H83	H	0.24000	7	
C9	CH2	0.16000	8	
O9	OA	-0.40000	8	
H93	H	0.24000	8	
[ bonds ]				
C10	C11	gb_26		
C10	O10	gb_4		
C10	N5	gb_10		
N5	H52	gb_2		
C5	N5	gb_20		
C5	C4	gb_25		
C5	C6	gb_25		
C4	O4	gb_19		
C4	C3	gb_25		
O4	H42	gb_1		
C2	C3	gb_25		
C2	C1	gb_26		
C2	O6	gb_19		
C1	O1B	gb_5		
C1	O1A	gb_5		
C6	O6	gb_19		
C6	C7	gb_26		
C7	O7	gb_17		
C7	C8	gb_26		
O7	H73	gb_1		
C8	O8	gb_17		
C8	C9	gb_26		
O8	H83	gb_1		
C9	O9	gb_17		
O9	H93	gb_1		
[ angles ]				
C11	C10	O10	ga_29	
C11	C10	N5	ga_18	
C3	C2	C1	ga_7	
C3	C2	O6	ga_8	
C1	C2	O6	ga_8	
C2	C1	O1B	ga_8	
C2	C1	O1A	ga_8	
O1B	C1	O1A	ga_37	
C2	O6	C6	ga_9	
C5	C6	O6	ga_8	
C5	C6	C7	ga_7	
O6	C6	C7	ga_8	
C6	C7	O7	ga_8	
C6	C7	C8	ga_7	
O7	C7	C8	ga_8	
C7	O7	H73	ga_11	
C7	C8	O8	ga_8	
C7	C8	C9	ga_7	
O8	C8	C9	ga_8	
C8	O8	H83	ga_11	
C8	C9	O9	ga_8	
C9	O9	H93	ga_11	
[ impropers ]				
C10	N5	O10	C11	gi_1
N5	C5	H52	C10	gi_1
C5	C4	C6	N5	gi_2
C4	C3	O4	C5	gi_2
C1	C2	O1B	O1A	gi_1
C6	C7	O6	C5	gi_2
C7	C6	O7	C8	gi_2
C8	C7	O8	C9	gi_2
C6	C3	C5	C2	gi_4
C6	C3	C4	C2	gi_5
C6	C3	C4	O6	gi_6
[ dihedrals ]				
C11	C10	N5	C5	gd_4
C6	C5	N5	C10	gd_14
C3	C4	C5	N5	gd_8
C7	C6	C5	N5	gd_8
C5	C4	O4	H42	gd_12
C2	C3	C4	C5	gd_17
O6	C2	C3	C4	gd_7
C3	C2	C1	O1A	gd_20
C3	C2	C1	O1B	gd_20
C3	C2	O6	C6	gd_14
C3	C4	C5	C6	gd_17
C2	O6	C6	C5	gd_14
O6	C6	C5	C4	gd_7
C7	C6	C5	C4	gd_17
O6	C2	C3	O3	gd_8
O3	C3	C4	C5	gd_7
O3	C3	C4	O4	gd_8
C2	C3	C4	O4	gd_7
O4	C4	C5	C6	gd_7
O4	C4	C5	N5	gd_8
O6	C6	C5	N5	gd_8
C7	C6	O6	C2	gd_1

O10	C10	N5	ga_32	C8	C7	C6	C5	gd_17
C10	N5	H52	ga_31	O7	C7	C6	C5	gd_7
C10	N5	C5	ga_30	O7	C7	C8	C9	gd_7
H52	N5	C5	ga_24	O7	C7	C6	O6	gd_8
N5	C5	C4	ga_12	C6	C7	O7	H73	gd_12
N5	C5	C6	ga_12	C9	C8	C7	C6	gd_17
C4	C5	C6	ga_7	O8	C8	C7	C6	gd_7
C5	C4	O4	ga_8	O8	C8	C7	O7	gd_8
C5	C4	C3	ga_7	C7	C8	O8	H83	gd_12
O4	C4	C3	ga_8	O9	C9	C8	O8	gd_8
C4	O4	H42	ga_11	O9	C9	C8	C7	gd_7
C4	C3	C2	ga_7	C8	C9	O9	H93	gd_12

*$\alpha$ -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Gal*

[ 3SIA ]									
[ atoms ]									
C11	CH3	0.07000	0	C3	C2	O6		ga_8	
C10	C	0.27100	0	C1	C2	O6		ga_8	
O10	O	-0.40500	0	C2	C1	O1B		ga_8	
N5	N	-0.23100	0	C2	C1	O1A		ga_8	
H52	H	0.20100	0	O1B	C1	O1A		ga_37	
C5	CH1	0.09400	0	C2	O6	C6		ga_9	
C4	CH1	0.16000	1	C5	C6	O6		ga_8	
O4	OA	-0.40000	1	C5	C6	C7		ga_7	
H42	H	0.24000	1	O6	C6	C7		ga_8	
C3	CH1	0.00000	2	C6	C7	O7		ga_8	
C2	CH1	0.25400	3	C6	C7	C8		ga_7	
C1	C	0.17200	4	O7	C7	C8		ga_8	
O1B	OM	-0.58600	4	C7	O7	H73		ga_11	
O1A	OM	-0.58600	4	C7	C8	O8		ga_8	
O6	OA	-0.24200	5	C7	C8	C9		ga_7	
C6	CH1	0.24200	5	O8	C8	C9		ga_8	
C7	CH1	0.16000	6	C8	C9	O9		ga_8	
O7	OA	-0.40000	6	C9	O9	H93		ga_11	
H73	H	0.24000	6	[ impropers ]					
C8	CH1	0.14200	7	C10	C11	O10	N5	gi_1	
O8	OA	-0.39600	7	N5	C10	H52	C5	gi_1	
C9	CH2	0.16000	8	C5	N5	C4	C6	gi_2	
O9	OA	-0.40000	8	C4	C5	C3	O4	gi_2	
H93	H	0.24000	8	C2	C3	C1	O6	gi_2	
[ bonds ]				C1	C2	O1B	O1A	gi_1	
C10	C11	gb_26		C6	C7	O6	C5	gi_2	
C10	O10	gb_4		C7	C6	O7	C8	gi_2	
C10	N5	gb_10		C8	C7	O8	C9	gi_2	
N5	H52	gb_2		C6	C3	C5	C2	gi_4	
C5	N5	gb_20		C6	C3	C4	C2	gi_5	
C5	C4	gb_25		C6	C3	C4	O6	gi_6	
C5	C6	gb_25		[ dihedrals ]					
C4	O4	gb_19		C11	C10	N5	C5	gd_4	
C4	C3	gb_25		C6	C5	N5	C10	gd_14	
O4	H42	gb_1		C3	C4	C5	N5	gd_8	
C2	C3	gb_25		C7	C6	C5	N5	gd_8	
C2	C1	gb_26		C5	C4	O4	H42	gd_12	
C2	O6	gb_19		C2	C3	C4	C5	gd_17	
C1	O1B	gb_5		O6	C2	C3	C4	gd_7	
				C3	C2	C1	O1A	gd_20	

C1	O1A	gb_5		C3	C2	C1	O1B	gd_20
C6	O6	gb_19		C3	C2	O6	C6	gd_14
C6	C7	gb_26		C3	C4	C5	C6	gd_17
C7	O7	gb_17		C2	O6	C6	C5	gd_14
C7	C8	gb_26		O6	C6	C5	C4	gd_7
O7	H73	gb_1		C7	C6	C5	C4	gd_17
C8	O8	gb_17		O6	C2	C3	O3	gd_8
C8	C9	gb_26		O3	C3	C4	C5	gd_7
C9	O9	gb_17		O3	C3	C4	O4	gd_8
O9	H93	gb_1		C2	C3	C4	O4	gd_7
[ angles ]				O4	C4	C5	O4	gd_7
C11	C10	O10	ga_29	O4	C4	C5	N5	gd_8
C11	C10	N5	ga_18	O6	C6	C5	N5	gd_8
O10	C10	N5	ga_32	C7	C6	O6	C2	gd_14
C10	N5	H52	ga_31	C8	C7	C6	C5	gd_17
C10	N5	C5	ga_30	O7	C7	C6	C5	gd_7
H52	N5	C5	ga_24	O7	C7	C8	C9	gd_7
N5	C5	C4	ga_12	O7	C7	C6	O6	gd_8
N5	C5	C6	ga_12	C6	C7	O7	H73	gd_12
C4	C5	C6	ga_7	C9	C8	C7	C6	gd_17
C5	C4	O4	ga_8	O8	C8	C7	C6	gd_7
C5	C4	C3	ga_7	O8	C8	C7	O7	gd_8
O4	C4	C3	ga_8	C7	C8	O8	H83	gd_12
C4	O4	H42	ga_11	O9	C9	C8	O8	gd_8
C4	C3	C2	ga_7	O9	C9	C8	C7	gd_7
C3	C2	C1	ga_7	C8	C9	O9	H93	gd_12

**$\alpha$ -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Neu5Ac**

[ 4SIA ]				C1	C2	O6	ga_8		
[ atoms ]				C2	C1	O1B	ga_8		
C11	CH3	0.07000	0	C2	C1	O1A	ga_8		
C10	C	0.27100	0	O1B	C1	O1A	ga_37		
O10	O	-0.40500	0	C2	O6	C6	ga_9		
N5	N	-0.23100	0	C5	C6	O6	ga_8		
H52	H	0.20100	0	C5	C6	C7	ga_7		
C5	CH1	0.09400	0	O6	C6	C7	ga_8		
C4	CH1	0.16000	1	C6	C7	O7	ga_8		
O4	OA	-0.40000	1	C6	C7	C8	ga_7		
H42	H	0.24000	1	O7	C7	C8	ga_8		
C3	CH1	0.00000	2	C7	O7	H73	ga_11		
C2	CH1	0.25400	3	C7	C8	O8	ga_8		
C1	C	0.17200	4	C7	C8	C9	ga_7		
O1B	OM	-0.58600	4	O8	C8	C9	ga_8		
O1A	OM	-0.58600	4	C8	O8	H83	ga_11		
O6	OA	-0.24200	5	C8	C9	O9	ga_8		
C6	CH1	0.24200	5	C9	O9	H93	ga_11		
C7	CH1	0.16000	6	[ impropers ]					
O7	OA	-0.40000	6	; ai	aj	ak	al	gromos type	
H73	H	0.24000	6	C10	C11	O10	N5	gi_1	
C8	CH1	0.16000	7	N5	C10	H52	C5	gi_1	
O8	OA	-0.40000	7	C5	N5	C4	C6	gi_2	
H83	H	0.24000	7	C4	C5	C3	O4	gi_2	
C9	CH2	0.16000	8	C2	C3	C1	O6	gi_2	
O9	OA	-0.40000	8	C2	-O8	O6	C1	gi_2	
H93	H	0.24000	8						

```

[ bonds ]
C10 C11 gb_26
C10 O10 gb_4
C10 N5 gb_10
N5 H52 gb_2
C5 N5 gb_20
C5 C4 gb_25
C5 C6 gb_25
C4 O4 gb_19
C4 C3 gb_25
O4 H42 gb_1
C2 C3 gb_25
C2 C1 gb_25
C2 O6 gb_19
C1 O1B gb_19
C1 O1A gb_19
C6 O6 gb_19
C6 C7 gb_25
C7 O7 gb_19
C7 C8 gb_25
O7 H73 gb_1
C8 O8 gb_19
C8 C9 gb_25
O8 H83 gb_1
C9 O9 gb_19
O9 H93 gb_1

[ angles ]
; ai aj ak gromos type
-08 C2 O6 ga_8
-08 C2 C3 ga_8
-08 C2 C1 ga_8
C11 C10 O10 ga_29
C11 C10 N5 ga_18
O10 C10 N5 ga_32
C10 N5 H52 ga_31
C10 N5 C5 ga_30
H52 N5 C5 ga_24
N5 C5 C4 ga_12
N5 C5 C6 ga_12
C4 C5 C6 ga_7
C5 C4 O4 ga_8
C5 C4 C3 ga_7
O4 C4 C3 ga_8
C4 O4 H42 ga_11
C4 C3 C2 ga_7
C3 C2 C1 ga_7
C3 C2 O6 ga_8

C1 C2 O1B O1A gi_1
C6 C7 O6 C5 gi_2
C7 C6 O7 C8 gi_2
C8 C7 O8 C9 gi_2
C6 C3 C5 C2 gi_4
C6 C3 C4 C2 gi_5
C6 C3 C4 O6 gi_6

[ dihedrals ]
; ai aj ak al gromos type
-08 -08 C2 C3 gd_14
-08 C2 C3 C4 gd_17
-08 C2 C3 C4 gd_7
-08 C2 C3 O3 gd_8
C11 C10 N5 C5 gd_4
C6 C5 N5 C10 gd_14
C3 C4 C5 N5 gd_8
C7 C6 C5 N5 gd_8
C5 C4 O4 H42 gd_12
C2 C3 C4 C5 gd_17
O6 C2 C3 C4 gd_7
C3 C2 C1 O1A gd_20
C3 C2 C1 O1B gd_20
C3 C2 O6 C6 gd_14
C3 C4 C5 C6 gd_17
C2 O6 C6 C5 gd_14
O6 C6 C5 C4 gd_7
C7 C6 C5 C4 gd_17
O6 C2 C3 O3 gd_8
O3 C3 C4 C5 gd_7
O3 C3 C4 O4 gd_8
C2 C3 C4 O4 gd_7
O4 C4 C5 C6 gd_7
O4 C4 C5 N5 gd_8
O6 C6 C5 N5 gd_8
C7 C6 O6 C2 gd_14
C8 C7 C6 C5 gd_17
O7 C7 C6 C5 gd_7
O7 C7 C8 C9 gd_7
O7 C7 C6 O6 gd_8
C6 C7 O7 H73 gd_12
C9 C8 C7 C6 gd_17
O8 C8 C7 C6 gd_7
O8 C8 C7 O7 gd_8
C7 C8 O8 H83 gd_12
O9 C9 C8 O8 gd_8
O9 C9 C8 C7 gd_7
C8 C9 O9 H93 gd_12

```

## Curriculum Vitae

Os itens IV, V e VI restringem-se a atividades realizadas durante o período abrangido pela presente dissertação.

### I. Dados Pessoais:

**Nome:** Carla Gottschald Chiodi

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, Rio Grando do Sul, Brasil, em 25 de julho de 1989.

**Endereço profissional:** Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil

**Telefone profissional:** (51) 3308-7770

**E-mail:** carla.chiodi@gmail.com

### II. Formação acadêmica:

Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de 2007/1 a 2010/2. *Caracterização estrutural e conformacional da protrombina humana*. Orientador: Prof. Hugo Verli. Co-orientadora: Dra. Cláudia Lemelle Fernandes.

### III. Estágios:

**Estágio curricular:** em Biologia Molecular, no Laboratório de Proteínas Tóxicas (LAPROTOX) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, durante o segundo semestre de 2010. Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini. Co-orientador: Dr. Diogo Demartini.

**Bolsa de iniciação científica:** CNPq PIBIC da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de 2009 a 2010. *Caracterização estrutural e conformacional da protrombina humana*. Orientador: Prof. Hugo Verli. Co-orientadora: Dra. Cláudia Lemelle Fernandes.

#### IV. Trabalhos científicos apresentados em congressos

##### a. Nacionais:

**CHIODI, C. G.**, GIESEL, G. M., VERLI, H. Conformational Characterization of NETNES *Trypanosoma cruzi* Glycopeptide. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, Foz do Iguaçu. Livro de Programa e Resumos da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, C-1, 2011.

**Chiodi, C. G.**, GIESEL, G. M., VERLI, H. Structural model of *Trypanosoma cruzi* NETNES glycopeptide. In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, Foz do Iguaçu. Livro de Programas e Resumos da XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, C-13, 2012.

DE OLIVEIRA, S., **CHIODI, C. G.**, VERLI, H. Conformational Characterization of GIPCs from *Cryptococcus neoformans*. In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, Foz do Iguaçu. Livro de Programas e Resumos da XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, C-14, 2012.

##### b. Internacionais:

**CHIODI, C. G.**, GIESEL, G. M., VERLI, H. Structural characterization of NETNES glycopeptide from *Trypanosoma cruzi*. In: Innate Immunity 2012: from Evolution to Revolution, Sorrento, Itália. Livro de Resumos do curso Innate Immunity 2012: from Evolution to Revolution, 2012.

#### V. Publicações em periódicos especializados:

##### a. Internacionais:

**Chiodi, C. G.** & Verli, H. **2013** Structural characterization of NETNES glycopeptide from *Trypanosoma cruzi*. *Carbohydr. Res.*, *accepted*.

#### VI. Bolsa recebida:

Bolsista CNPq do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS, a partir de março de 2011.