



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

*Tese de Doutorado*

**Eduardo Jorge Pilau**

*Desenvolvimentos Metodológicos em Proteômica  
Estrutural por Espectrometria de Massas*

Orientador: Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo

**Campinas - SP**

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP

P641d	<p>Pilau, Eduardo Jorge. Desenvolvimentos metodológicos em proteômica estrutural por espectrometria de massas / Eduardo Jorge Pilau. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.</p> <p>Orientador: Fábio Cesar Gozzo.</p> <p>Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Espectrometria de massas. 2. Proteômica estrutural. 3. Proteína-ligações cruzadas. 4. <i>Footprinting</i>. I. Gozzo, Fábio Cesar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	---

**Título em inglês:** Methodological developments in structural proteomics by mass spectrometry

**Palavras-chaves em inglês:** Mass spectrometry, Proteomics, Cross-linking of proteins, Footprinting

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Fábio Cesar Gozzo (orientador), Rodinei Augusti (DQ-UFMG), Luiz Alberto Beraldo de Moraes (DQ-USP/RP), Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú (IQ-UNICAMP), Marco Aurélio Zezzi Arruda (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 03/05/2010

Aos meus queridos pais Laercio e Ivoni, que  
nunca mediram esforços para que eu pudesse  
realizar meus sonhos e objetivos, me ajudando e  
apoiando em todos os momentos de minha vida.  
Amo muito vocês

Ao meu irmão Felipe, que sempre esteve ao  
ao meu lado, muito obrigado mesmo.  
Não posso esquecer de agradecer a minha cunhada Márcia  
e meu sobrinho Enzo (seja bem vindo!)

A minha esposa Carla, pela paciência, força e carinho.

Doce, sem você eu não conseguiria. Te amo muito.

## Agradecimentos

Ao meu orientador e amigo, Prof. Fábio Cesar Gozzo, pela orientação e paciência e principalmente por ter me aceito no grupo Dalton.

Ao meu pai Laercio Jorge Pilau, minha mãe Ivoni Maria Bortolini Pilau e meu irmão Felipe por representarem tudo que um ser humano necessita para ser feliz: amor, amizade, carinho, confiança, generosidade e paciência.

À minha amada esposa Carla, pela paciência nos momentos difíceis, por representar a esperança quando tudo parecia dar errado, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas nos últimos anos. Te amo Doce.

Aos amigos do grupo DALTON, Amadeu, Luiz, Alex, Alana e Mariana pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, pelo ótimo ambiente, pelos excelentes churrascos e principalmente pela paciência que tiveram comigo.

Aos meus amigos de Campinas: Pablito, Ernesto, Vivi, André Francisco (Gago), Marla, Adriano Francino (Gordinho), Borges, José Mateus (Pepeca), Guilherme (Rato), Márcio, Marco, Aloízio Virgulino, José Augusto da Col (Guto), Pilha, Leandro Martinez, Julio, Lincoln, Leonardo (Chang), Fernando Sodré, Sérgio Camargo Junior, Serginho (Maguinho), Juliano.

A Prof<sup>a</sup>. Isabel Sales Fontes Jardim, por ter me apoiado durante todas as etapas que passei durante o doutorado

Ao Prof. Marco Aurélio Zezzi Arruda, por ceder tempo e espaço de laboratório para as tentativas de síntese.

A todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela infra-estrutura disponibilizada para realização desse projeto.

À FAPESP e a CAPES, pelo auxílio financeiro.

# Curriculum Vitae

## Dados Pessoais

**Nome** Eduardo Jorge Pilau

**Nascimento** 09/03/1980

## Formação Acadêmica/Titulação

**2008 - 2010** Doutorado em Química.  
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

**2005 - 2007** Doutorado incompleto(a) em Química.  
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil  
Ano de interrupção: 2007

**2003 - 2005** Mestrado em Química.  
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

**1999 - 2003** Graduação em Química Industrial.  
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

## Produção Bibliográfica:

1. Jonathan Melo Bergamaschi, Eduardo Jorge Pilau, Fábio Cesar Gozzo, Maria Isabel Felisberti. Synthesis of polyurethane from poly(3-hydroxybutyrate) and poly(p-dioxanone): molar mass reduction via sodium borohydride. *Macromolecular Symposia, in press*, 2010.

2. Pilau, Eduardo J., Raquel G. C. Silva, Isabel C. F. S. Jardim, Fabio Augusto. Molecularly Imprinted sol-gel silica for Solid Phase Extraction of Phenobarbital. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Online)*. , v.19, p.1136 - 1143, 2008.

3. de Carvalho, Leandro M., do Nascimento, Paulo C., Bohrer, Denise, Stefanello, Raquel, Pilau, E J, da Rosa, Marcelo B.

Redox Speciation of Inorganic Arsenic in Water and Saline Samples by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry in the Presence of Sodium Diethyl Dithiocarbamate. *Electroanalysis (New York)*. , v.20, p.776 - 781, 2008.

4. Pilau, E J, Carvalho, Leandro M de, Nascimento, Paulo Cícero Do, Nascimento, Denise Bohrer Do, Stefanello, Raquel, Markus Lauerb

Voltammetric Behavior of Arsenic(III) in the Presence of Sodium Diethyl Dithiocarbamate and Its

Determination in Water and Highly Saline Samples by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Electroanalysis* (New York). , v.18, p.1039 - 1089, 2006.

5. Pilau, E J, Nascimento, Paulo Cícero Do, Bohrer, Denise, Carvalho, Leandro M de, Vendrame, Zilda B, Caon, Carla Eliete, Stefanello, Raquel

Determination of cadmium, lead and thalium in highly saline hemodialysis solutions by potentiometric stripping analysis (PSA). *Talanta* (Oxford). , v.65, p.954 - 959, 2005.

6. Pilau, E J, Nascimento, Paulo Cicero Do, Rohffes, Ana Lúcia Becker, Nascimento, Denise Bohrer Do, CARVALHO, Leandro M de

HPLC based method using sample precolumn cleanup for the determination of triazines and thiolcarbarnates in hemodialysis saline solutions. *Talanta* (Oxford). , v.65, p.211 - 216, 2005.

7. Pilau, E J, Nascimento, Paulo Cicero Do, Bohrer, Denise, Carvalho, Leandro M de, Trevisan, J, Vendrame, Zilda B, Dessuy, Morgana B

Determination of Triazines in Hemodialysis Saline Solutions by Adsorptive Stripping Voltammetry after Extraction in Acetonitrile. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. , v.14, p.577 - 583, 2003.

## Resumo

### ***Desenvolvimentos Metodológicos em Proteômica Estrutural por Espectrometria de Massas***

A espectrometria de massas (MS) consiste no estudo dos íons em fase gasosa, tendo como uma das suas principais aplicações a caracterização estrutural de moléculas. Desde o início da técnica, ela vem sendo empregada na elucidação estrutural de um grande número de moléculas orgânicas e é hoje uma das principais ferramentas de caracterização estrutural. Dentro os métodos baseado em MS para o estudo de estruturas superiores de proteínas desenvolvidos recentemente estão aqueles conhecidos como *footprinting* e ligação cruzada (*cross-linking*). Nesta tese, estudos foram realizados para o desenvolvimento, melhorias e otimização de técnicas de *footprinting* e ligação cruzada acopladas à espectrometria de massas para o estudo estrutural de proteínas. Em *footprinting*, foram desenvolvidas fontes alternativas de radiação UV para geração de radicais  $\cdot\text{OH}$  a partir da fotólise do  $\text{H}_2\text{O}_2$  para mapeamento da superfície exposta ao solvente de proteínas, bem como o desenvolvimento de uma técnica mais apropriada de quantificação de peptídeos oxidados. Os resultados obtidos demonstraram que as fontes propostas apresentaram boa eficiência no processo de fotólise do  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Na técnica de ligação cruzada, foram realizados estudos fundamentais a respeito da reatividade dos Agentes de Ligação Cruzadas (ALC's) tanto com relação à especificidade dos ALC's frente às cadeias laterais dos aminoácidos quanto à cinética da reação com proteínas e reação competitiva de hidrólise. Nos experimentos realizados foi possível verificar a reatividade do ALC frente a diferentes grupos nucleofílicos presentes nas cadeias laterais dos resíduos de

aminoacido bem como ser suscetivel a mudança de reatividade em virtude do pH utilizado.

## **Abstract**

### ***Methodological Developments in Structural Proteomics by Mass Spectrometry***

Mass spectrometry (MS) study ions in the gas phase, and one of its main applications is the structural characterization of molecules. Since the beginning of the technique, it has been used in structural study of a large number of organic molecules and is now a major tool for structural characterization. Among the MS-based methods for the study of higher structures of proteins are the newly developed methods of footprinting and cross-linking.

In this thesis, studies were undertaken for the development, improvement and optimization of, footprinting and cross-linking coupled with mass spectrometry for the structural analysis of proteins. In footprinting, we developed alternative sources of UV radiation to generate •OH radicals from the photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to map the solvent exposed surface of proteins as well as the development of a more appropriated technique for quantification of oxidized peptides. The results showed that the proposed sources showed good efficiency in the process of photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For cross-linking, fundamental studies were carried out concerning the reactivity of the cross-linkers regarding both the specificity of ALC in respect to amino acid side chains and the kinetics of reaction with proteins as well as hydrolysis reaction. In the experiments it was possible to verify the reactivity of ALC against different nucleophilic groups present in side chains of amino acid residues as well as being susceptible to change in reactivity due to the pH used.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	XIX
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XXIII
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 MÉTODOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS .....	2
1.2 MÉTODOS BASEADOS EM MS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS .....	4
1.3 FOOTPRINTING .....	9
1.3.1 Geração de Radicais Hidroxilas em solução utilizando radiação UV.....	14
1.3.2 Produtos de oxidação e Reatividade das cadeias laterais dos aminoácidos .....	18
1.3.3 Quantificação da Taxa de oxidação.....	24
1.4 LIGAÇÃO CRUZADA (CROSS-LINKING).....	26
1.5 GRUPOS FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS .....	31
1.5.1 Reatividade das cadeias laterais dos aminoácidos .....	31
1.5.2 Efeitos do pH na nucleofilicidade dos grupos das cadeias laterais dos aminoácidos .....	33
<b>2 – OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
2.1 - OBJETIVO GERAL .....	34
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>35</b>
3.1 FOOTPRINTING .....	35
3.1.1 Materiais .....	35
3.1.2 Preparação das amostras para radiação UV empregando lâmpada de vapor de mercúrio ...	35
3.1.2 Preparação das amostras empregando laser como fonte de radiação .....	36
3.1.3 Experimento de Dicroísmo Circular (CD).....	37
3.1.3 Digestão das proteínas utilizando tripsina .....	37
3.1.4 Análise de LC-MS das proteínas oxidadas intactas .....	37
3.1.5 Análises por LC-MS/MS dos peptídeos tripticos gerados após a digestão das proteínas.....	38
3.1.6 Quantificação Label-Free da Cinética de Oxidação .....	38
3.2 LIGAÇÃO CRUZADA (CROSS-LINKING) .....	41
3.2.1 Estudo da reatividade do agente de ligação cruzada (DSS) frente a diferentes aminoácidos nucleofílicos .....	41
3.2.2 Análise dos produtos formados da reação entre agente de ligação cruzada DSS e peptídeos	42

3.2.3 Estudo da reatividade do agente de ligação cruzada DSS utilizando a proteína Thimet oligopeptidase (EC3.4.24.15; EP24.15) .....	42
3.2.4 Cinética de reação e de hidrólise do agente de ligação cruzada (DSS) em soluções com diferentes valores de pH.....	43
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
4.1 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA ALTERNATIVO DE FOTÓLISE UTILIZANDO LÂMPADA DE HG COMO FONTE DE RADIAÇÃO. ....	45
4.2 EXPERIMENTOS DE FOOTPRINTING EMPREGANDO O SISTEMA ALTERNATIVO DE FOTÓLISE (LÂMPADA DE HG).....	52
4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO PARA CINÉTICA DE OXIDAÇÃO EM EXPERIMENTOS DE FOOTPRINTING.....	58
4.3.1 Experimento de footprinting utilizando Mioglobina e Citocromo C.....	58
4.3.1 Quantificação da cinética de oxidação pelo método Label-free.....	59
4.3 Experimentos de footprinting utilizando Laser de Nd:YAG com fonte de radiação UV.....	68
4.3. ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DO AGENTE DE LIGAÇÃO CRUZADA FRENTE AOS DIFERENTES AMINOÁCIDOS .....	74
4.5 ESTUDO DA REATIVIDADE DO AGENTE DE LIGAÇÃO CRUZADA DSS FRENTE AO RESÍDUO DE CISTEÍNA UTILIZANDO A PROTEÍNA THIMET OLIGOPEPTIDASE (EC 3.4.24.15; EP24.15).....	84
4.6 ESTUDOS DE CINÉTICA DE REAÇÃO ENTRE OS ALC'S COM PROTEÍNAS E DA REAÇÃO COMPETITIVA DE HIDRÓLISE .....	89
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos diversos métodos de caracterização de complexos protéicos. ....	3
Figura 2. Experimento de <i>footprinting</i> de DNA visando a identificação das bases que interagem com a proteína. ....	9
Figura 3. Esquema experimental de <i>footprinting</i> acoplado a MS para obtenção de dados estruturais de proteínas (adaptado da referência 98. ....	13
Figura 4. Espectros de FT-MS da ubiquitina e os seus homólogos oxidados com 10 cargas após diferentes pulsos de laser (A) sem nenhum pulso de laser, (B) um pulso de laser, (C) 100 pulsos de laser. ....	16
Figura 5. Esquema do sistema utilizado para passagem da amostra através do laser utilizando capilar de sílica fundida. ....	17
Figura 6. Mecanismo oxidação da cadeia lateral da (A) arginina; (B) histidina. ....	19
Figura 7. Produtos de oxidação da cadeia lateral do triptofano. ....	20
Figura 8. – (A) Área superficial exposta ao solvente para os 20 aminoácidos em proteínas depositadas no Protein Data Bank (PDB). (B) Cinética de reação dos aminoácidos frente ao radical hidroxila, frequência de cada aminoácido em proteínas, fração na qual esses aminoácidos apresentam área superficial exposta (SEA) maior que 30 Å <sup>2</sup> e o produto entre a frequência dos aminoácidos em proteínas e a SEA. ....	23
Figura 9. Coleta de dados e análise de dados após experimento de <i>footprinting</i> ....	25
Figura 10. Série dos Agentes de Ligação Cruzada baseados em ésteres da NHS empregados nesse estudo das cadeias espaçadoras. ....	28
Figura 11. Esquema experimental da utilização de ligação cruzada associada a MS visando à obtenção de dados estruturais de proteínas. ....	29
Figura 12. Produtos formados após a reação entre ALC e a proteína ou complexo protéico. ....	30
Figura 13. Representação esquemática dos sistemas desenvolvidos para utilização da lâmpada de Hg para os experimentos de <i>footprinting</i> . (A) lâmpada de 250 W, (B) lâmpada de 400 W. ....	46
Figura 14. Estrutura da Mioglobina. (8 α-hélices) ....	47
Figura 15. Espectro de Dicroísmo Circular de Mioglobina (concentração de 40 μmol L <sup>-1</sup> em solução tampão 50 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,0). (π→ π* (~208 - 210 nm), paralela ao eixo da hélice, fraca; n→ π* (~ 222 nm), paralela ao eixo da hélice). ....	48
Figura 16. Quantidade de oxidação da Mioglobina utilizando diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. (A) 0,05%; (B) 0,2%; (C) 1,0%. (1 Oxi = 1 oxidação; 2 Oxi = 2 oxidações, 3 Oxi = 3 oxidações) ....	49
Figura 17. Quantidade de oxidação da Mioglobina utilizando diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. (A) Mioglobina 40 μmol L <sup>-1</sup> ; (B) Mioglobina 40 μmol L <sup>-1</sup> incubada com 1% (v/v)	

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 30 s; (C) Mioglobina 40 μmol L <sup>-1</sup> com 1% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> após 30 s de irradiação (1 Oxi = 1 oxidação; 2 Oxi = 2 oxidações, 3 Oxi = 3 oxidações). .....	50
Figura 18. Teste de eficiência dos sistemas desenvolvidos empregando a lâmpada de Hg com fonte de radiação. ....	51
Figura 19. Espectro de LC-MS deconvolvido da mioglobina, após irradiação por 30 s com 1,0% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	53
Figura 20. Espectro de MS/MS do peptídeo da mioglobina. (A) não oxidado; (B) presença dos íons [y <sub>3</sub> + 32 Da] e [y <sub>10</sub> +16 Da] identificam que os dois triptofanos do peptídeo foram oxidados. ....	54
Figura 21. Espectro de MS/MS do peptídeo da mioglobina. (A) peptídeo não-oxidado; (B) peptídeo oxidado, presença do íon [y <sub>8</sub> - 22 Da] como sitio de oxidação a histidina. ....	56
Figura 22. Espectro deconvolvido de LC-MS das proteínas após 30 s de irradiação com 1% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . (1 Oxi = 1 oxidação; 2 Oxi = 2 oxidações, 3 Oxi = 3 oxidações). ....	59
Figura 23. Representação do método proposto baseado em <i>label-free</i> . A intensidade do sinal do peptídeo não modificado decresce com o tempo de exposição. Os valores obtidos são então ajustados para uma reta de pseudo-primeira ordem. ....	60
Figura 24. Cromatogramas obtidos para mioglobina digerida após 4 intervalos de tempo de exposição a radiação UV e cromatograma de íons totais para 3 diferentes peptídeos da proteína (1% (v/v) (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). ....	62
Figura 25. Cromatogramas obtidos para Citocromo C digerido após 4 intervalos de tempo de exposição a radiação UV e cromatograma de íons extraídos para 3 diferentes peptídeos da proteína. (1% (v/v) (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). ....	63
Figura 26. Resultados obtidos para os peptídeos oxidados da mioglobina após diferentes tempos de exposição à irradiação. Coluna da esquerda mostra os gráficos obtidos pelo método proposto e a coluna da direita pelo método clássico .....	66
Figura 27. Resultados obtidos para os peptídeos oxidados do Citocromo C após diferentes tempos de exposição à irradiação. Coluna da esquerda mostra os gráficos obtidos pelo método proposto e a coluna da direita pelo método clássico .....	67
Figura 28. Espectro de MS deconvolvido para as amostras controle (A) e (B) irradiada por 60 s. ....	68
Figura 29. Espectro de absorção do peróxido de hidrogênio. ....	70
Figura 30. Esquema do experimento de <i>footprinting</i> utilizando laser. A) Bomba peristáltica, B) Capilar de sílica. ....	71
Figura 31. Espectro de MS da mioglobina. (A) solução controle; (B) após a irradiação. ....	72
Figura 32. Espectro de MS da mioglobina degradada devido à grande concentração de radicais gerada no meio após radiação. ....	73
Figura 33. Espectro da Mioglobina após passagem da solução pelo laser Nd:YAG (213 nm). ....	74
Figura 34. Sequência dos peptídeos utilizados no estudo de reatividade. ....	76
Figura 35. Espectros de MALDI dos peptídeos com as respectivas identificações das espécies formadas após reação com DSS em pH 7,0. ....	79

Figura 36. Formação das espécies em função do pH (MALDI) para o peptídeo P3.....	80
Figura 37. Gráficos com a porcentagem de cada espécie formada após a reação entre peptídeo e DSS nos diferentes valores de pH. (A) P1; (B) P2; (C) P3; (D) P4; (E) P5.....	83
Figura 38. Estrutura da Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15, MM ~78 KDa). Resíduos de cisteínas em vermelho.....	85
Figura 39. Sequência primária da Thimet Oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15). Em azul estão os peptídeos encontrados na análise por LC-MS/MS (cobertura 63%).....	86
Figura 40. Parâmetros empregados na identificação da modificação na cisteína. ....	87
Figura 41. Espectros de MS/MS dos peptídeos contando modificação na cisteína.....	88
Figura 42. Cinética da hidrólise do DSS em soluções tampão (fosfato de sódio 50 mmol L <sup>-1</sup> ) a diferentes valores de pH.....	90
Figura 43. Espectro da reação entre a mioglobina e DSS em diferentes pH. ....	92
Figura 44. Espectro de MS deconvoluído para as amostras de mioglobina após reação com DSS. ....	93

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN .....	Acetonitrila
ALC.....	Agente de Ligação Cruzada
CE .....	Cadeia Espaçadora (do <i>cross-linker</i> )
CHCA .....	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidróxi-cinâmico
CID .....	Dissociação Induzida por Colisão
CRP .....	Cristalografia de Proteínas
CD.....	Dicroísmo Circular
Da .....	Dalton
DDA .....	Análise Dependente de Dados
DMF .....	Dimetilformamida
DSS .....	Dissuccinimidil Suberato
DTSSP.....	3,3-ditiobis [sulfosuccinimidilpropionato]
DTT .....	Ditiotreitól
ECD .....	Dissociação por Captura de Elétrons
ESI .....	Ionização por <i>Electrospray</i>
FT-ICR .....	Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier
HDX .....	Troca Hidrogênio-Deutério
IMS .....	Espectrometria de Mobilidade Iônica
IPTG .....	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
IRMPD .....	Dissociação Multifotônica por Infravermelho
LC (HPLC/UPLC) .....	Cromatografia Líquida (Alta/Ultra Performance)
MALDI .....	Ionização por Dessorção a Laser Auxiliada por Matriz
MS .....	Espectrometria de Massas
MS3D .....	Espectrometria de Massas Aplicada a Estrutura de Proteínas
NHS .....	<i>N</i> -hidróxisuccinimida
Nd:YAG.....	neodymium-doped yttrium aluminium garnet
PTM .....	Modificações Pós-Traducionais

PDB.....Protein Data Bank  
Q-Tof ..... Quadrupolo-Tempo de Vôo  
RMN ..... Ressonância Magnética Nuclear  
SAXS .....Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos  
SDS-PAGE .....Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecilsulfato de Sódio  
TFA ..... Ácido Trifluoracético  
TW.....*Travelling Wave*  
UV.....Ultra Violeta

# 1 – INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas (MS) consiste no estudo de íons na fase gasosa, tendo como uma das suas principais aplicações a caracterização estrutural de compostos. Desde o início da técnica, ela vem sendo empregada no estudo estrutural de um grande número de moléculas orgânicas e é hoje uma das principais ferramentas de caracterização estrutural. Já nos anos 70, havia um grande interesse na utilização de MS para a realização de experimentos de caracterização de proteínas devido às atrativas características da técnica, tais como velocidade de análise, sensibilidade e facilidade de uso. Entretanto, um dos principais problemas da aplicação de MS em proteínas envolvia a geração de íons na fase gasosa pelos métodos de ionização disponíveis na época.<sup>1,2</sup>

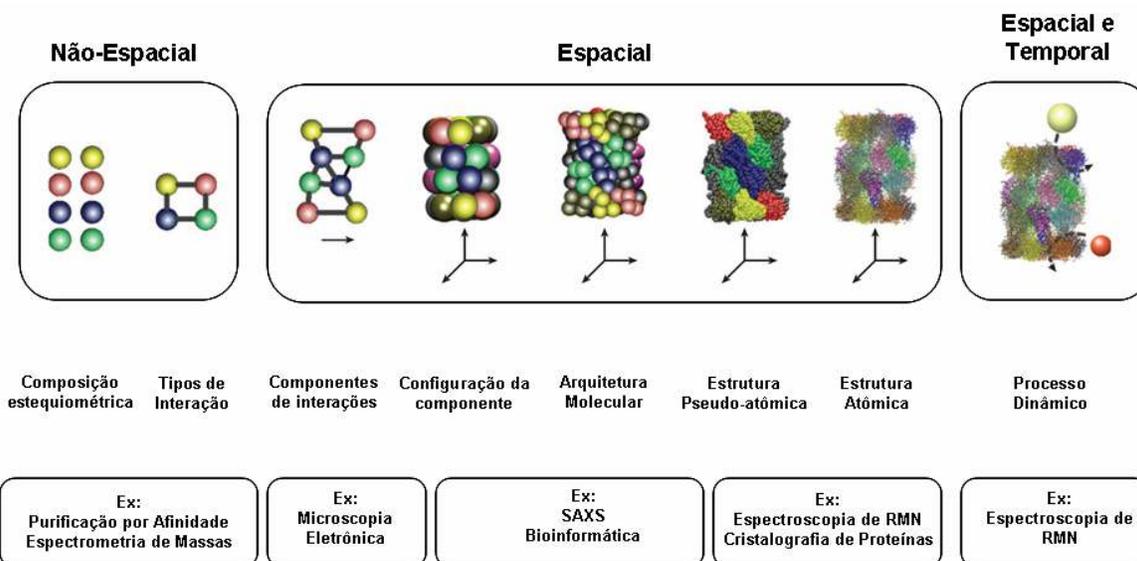
O desenvolvimento de métodos de dessorção baseados na emissão de íons pré-existentes a partir de uma superfície líquida ou sólida, tal com dessorção por plasma (PD – *Plasma Desorption*)<sup>3,4</sup>, FAB (*Fast Atom Bombardment*)<sup>5</sup> ou dessorção por laser (LD – *Laser Desorption*)<sup>6</sup>, permitiu um primeiro avanço para a espectrometria de massas no campo da análise biomolecular<sup>7,8</sup>. Contudo, o grande salto na utilização da espectrometria de massas em análises de biomoléculas ocorreu com o desenvolvimento dos métodos de ionização, por electrospray (ESI), desenvolvida por J. B. Fenn e a ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI) por M. Karas e F. Hillenkamp no final da década de 80.<sup>9,10</sup> A introdução desses novos métodos de ionização abriu também espaço para o desenvolvimento de novos equipamentos com capacidade de experimentos de espectrometria de massas sequencial (MS<sup>n</sup>), tipos *ion trap*, quadrupolo-tempo de voo (Q-Tof), tempo de voo-tempo de voo (Tof-Tof), *ion trap* linear-Orbitrap (LIT-Orbitrap) e *ion trap* linear-ressonância ciclotrônica de íons (LIT-ICR)<sup>11,12</sup>, expandindo em muito a capacidade de análise de peptídeos e proteínas por MS. Essas novas técnicas de ionização, aliadas aos novos analisadores e às

ferramentas de bioinformática, tornaram a espectrometria de massas uma das principais técnicas para a análise de proteínas atualmente<sup>11</sup>.

Desde então, a utilização da MS para análise de proteínas e peptídeos tem se destacado como uma das principais aplicações da técnica<sup>13</sup>. Dentre as aplicações mais comuns nesta área destacam-se a identificação de proteínas, a determinação da massa dessas macromoléculas, o sequenciamento de peptídeos, a identificação e localização de modificações pós-traducionais e a quantificação relativa e absoluta de proteínas<sup>15,16,17,18,19,20,21</sup>.

## **1.1 Métodos utilizados para caracterização estrutural de proteínas**

As técnicas de caracterização estrutural de proteínas e de complexos protéicos disponíveis atualmente podem ser divididas nos seguintes grupos<sup>22,23</sup> (Figura 1): técnicas de estrutura primária, terciária e quaternária de alta, média, baixa resolução e computacionais. Técnicas de caracterização de estrutura primária fornecem informações a respeito de quais são as proteínas constituintes do complexo de interesse, sem fornecer nenhum tipo de informação espacial. A MS é hoje, assim, uma das principais ferramentas para identificação de parceiros de interação, sendo os detalhes referentes à técnica discutidos na próxima seção. (seção 1.2)



**Figura 1.** Classificação dos diversos métodos de caracterização de complexos protéicos.

As técnicas de baixa resolução/sonda englobam as espectroscopias, onde a resposta é determinada pela presença de certa característica estrutural da proteína. Essa classe engloba as técnicas de Dicroísmo Circular (CD), Fluorescência no UV, Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência (FRET) dentre outras. Embora essas técnicas sejam sensíveis, rápidas, relativamente simples e de fácil acesso, a resposta obtida em geral é insuficiente por si só para caracterização mais aprofundada do sistema. Como técnicas de média resolução, dentre aquelas que fornecem informações acerca da forma geral do complexo tais como posição e orientação dos componentes, destacam-se as microscopias e o Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS). Em geral tais técnicas são bem restritas a alguns usuários tanto pela necessidade de instrumentação muito específica e dispendiosa quanto pelo alto grau de dificuldade de interpretação de dados.

Atualmente existem duas técnicas estabelecidas para determinação estrutural de proteínas com alta resolução (resolução atômica): Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cristalografia de Proteínas (CRP). Essas técnicas constituem as únicas soluções para resolução atômica de estrutura de proteínas, e há hoje cerca de 60.000 estruturas resolvidas, correspondentes a 20.000 proteínas. Outro dado importante é que hoje são conhecidos cerca de 1400 tipos

de enovelamentos protéicos, mas nos últimos 2 anos nenhum novo enovelamento foi descoberto<sup>24</sup>. Apesar do sucesso dessas técnicas na elucidação estrutural de proteínas, a estrutura da maioria das proteínas não são passíveis de serem estudadas por essas técnicas devido a algumas limitações atuais. Primeiramente, há a necessidade de uma grande quantidade de amostra (da ordem de vários miligramas) com alto grau de pureza. No caso de RMN, há ainda a necessidade de a amostra ser estável em algum dos tampões que não interfiram na análise por um longo intervalo de tempo (dias a semanas) a temperatura ambiente. Além disso, as técnicas disponíveis atualmente restringem o tamanho máximo da amostra a aproximadamente 50 kDa, devido a complexidade do espectro adquirido. A CRP por sua vez requer que a amostra esteja na forma de monocristal, sendo um dos principais desafios na utilização desta técnica. Outro ponto a ser comentado é que a estrutura obtida por CRP é uma estrutura estática e não necessariamente representativa do sistema em solução<sup>25</sup>.

## **1.2 Métodos baseados em MS para caracterização estrutural de proteínas**

As primeiras aplicações de MS moderna em análises de proteínas se baseavam nas massas moleculares dos peptídeos obtidas por proteólises.<sup>26</sup> A alta exatidão de massas obtidas por determinados analisadores de alta exatidão como TOFs e ICR's, em conjunto com a especificidade das proteases permitiram o desenvolvimento do método de "*fingerprint*" para a identificação de proteínas. Tais experimentos permitem identificar a proteína, mesmo sem fornecer nenhuma informação a respeito de sua sequência de resíduos de aminoácidos ou estrutura primária. Com o desenvolvimento da MS sequencial, surgiu então um novo método de análise de proteínas, que agora se baseia não só nas massas dos peptídeos gerados pela digestão com proteases específicas como também na determinação da sequência de resíduos de aminoácidos ou da estrutura primária advinda das informações dos espectros de dissociação desses peptídeos<sup>27,28</sup>.

Em 1989, Hunt et al. demonstrou a possibilidade de sequenciamento de peptídeos gerados por ESI mediante Dissociação Induzida por Colisão (CID).<sup>29</sup> Esse trabalho foi seguido por outros, demonstrando o sequenciamento de peptídeos endógenos<sup>30</sup> e proteínas digeridas por tripsina e analisadas por LC-MS/MS<sup>31</sup>. Simultaneamente, experimentos de sequenciamento foram conduzidos em peptídeos gerados por MALDI, onde inicialmente a dissociação dessas espécies não ocorria por meio de fragmentação, mas por decaimento de energia resultante do processo de ionização<sup>32</sup>. Esses achados levaram ao desenvolvimento de algoritmos de busca em banco de dados que permitiam a identificação de proteínas tanto em experimentos de MS<sup>33, 34, 35</sup> quanto de MS/MS<sup>36, 37</sup>. A partir desse momento, a MS tornou-se a principal técnica de identificação de proteínas, em especial em experimentos de análise proteômica, onde se faz necessário a identificação de um grande número de proteínas em um pequeno intervalo de tempo. Com o desenvolvimento de métodos de dissociação de peptídeos, foi possível obter informações acerca da seqüência dos aminoácidos, sendo que os resultados permitiam a determinação de peptídeos modificados pós-traducionalmente (fosforilação e sulfonação, por exemplo) bem como a análise de espécies bloqueadas no N-terminal, o que era impossível até então por Degradação de Edman.<sup>38</sup> No fim da década de 90, surgiram métodos que permitiam a análise quantitativa diferencial de proteínas por MS<sup>39, 40</sup>. Desse modo, as duas últimas décadas presenciaram uma enorme quantidade de trabalhos que elevaram a MS ao posto de principal técnica de análise de problemas relacionados à estrutura primária de proteínas: identificação de proteínas, determinação da massa dessas macromoléculas, sequenciamento, identificação e localização de modificações pós-traducionais e quantificação<sup>41, 42, 43, 44, 45, 46, 47</sup>. Em virtude desse sucesso, e das vantagens intrínsecas da técnica de MS (alta sensibilidade, rapidez de análise e especificidade) vários métodos foram desenvolvidos com o intuito de se estudar a estruturas superiores de proteínas bem como parceiros de interação<sup>48, 49, 50, 51</sup>.

Um método de caracterização estrutural de proteínas que permite a determinação de superfícies de interação entre proteínas é a Troca

Hidrogênio/Deutério (HDX).<sup>52, 53, 54</sup> O método fornece informações sobre a acessibilidade do solvente de várias partes da molécula, e assim a estrutura terciária da proteína<sup>55</sup>. HDX tem sido aplicada com relativo sucesso para o estudo de enovelamento e estabilidade de proteínas<sup>56, 57</sup> mudanças conformacionais mediante interação com ligantes<sup>58,59</sup> e no estudo de interações proteína-proteína<sup>60</sup>. Em 1991, foi proposta pela primeira vez a utilização de MS para o cálculo da cinética de troca entre os isótopos<sup>61</sup>. HDX baseia-se no fato de que quando proteínas são solubilizadas em excesso de solvente deuterado, os hidrogênios da proteína trocam com o deutério do solvente. Os hidrogênios nos grupos funcionais dos aminoácidos trocam muito rapidamente e, portanto, não permitem determinação de sua cinética de troca por MS. Os hidrogênios das amidas da cadeia principal da proteína por sua vez apresentam uma faixa de  $10^8$  ordens de grandeza de diferença de velocidade de troca, dependendo do perfil de ligações de hidrogênio e, principalmente, do grau de exposição desses átomos ao solvente<sup>53</sup>. Após o experimento de troca (realizado por diferentes intervalos de tempo para permitir o cálculo da cinética), o pH do meio reacional é alterado para 2-3 e a temperatura para 0°C de modo a evitar a troca reversa com H. Análises por MS podem ser realizadas tanto de modo global, afim de determinar o nível de incorporação de D, bem como na análise dos peptídeos, com o objetivo de determinar a cinética de troca em cada uma das regiões da proteína e, conseqüentemente, a superfície de interação proteína-ligante. Assim como no caso anterior, HDX apresenta vários desafios técnicos que dificultam sua aplicação em muitos casos. A diminuição do pH e da temperatura são incompatíveis com a grande maioria das enzimas, sendo que atualmente a única utilizada em experimentos desse tipo é a pepsina, uma enzima inespecífica de baixa eficiência, o que dificulta a identificação dos peptídeos obtidos por MS, além de diminuir a cobertura da proteína quando comparada a peptídeos trípticos. Isso implica em um limite máximo de tamanho das amostras, mesmo porque boa parte da interpretação dos dados é feita de modo manual. Além disso, as condições cromatográficas devem ser adequadas de modo que a etapa de LC também seja

realizada a baixas temperaturas, o que acarreta no aumento significativo da pressão do sistema.

Finalmente, a interpretação dos espectros de MS/MS não permite a identificação inequívoca dos sítios de troca, devido ao efeito conhecido como embaralhamento da marcação isotópica (*Hydrogen Scrambling*)<sup>53</sup>. Apesar das dificuldades apresentadas anteriormente, HDX tem sido aplicada com relativo sucesso para o estudo de enovelamento e estabilidade de proteínas<sup>62,63</sup> mudanças conformacionais mediante interação com ligantes<sup>64,65</sup> e no estudo de interações proteína-proteína<sup>66</sup>.

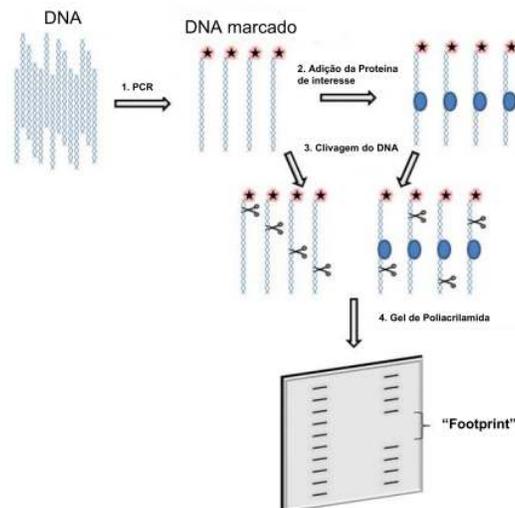
A Espectrometria de Mobilidade Iônica (IMS) é mais uma técnica baseada em MS capaz de fornecer informações espaciais acerca de proteínas e complexos protéicos. A espectrometria de mobilidade iônica (IMS), inicialmente conhecida como cromatografia de plasma, foi introduzida na década de 60 e consiste uma técnica de separação iônica<sup>67</sup>. Nesta técnica, as espécies iônicas são separadas com base em seus tamanhos e conformações, mais especificamente, em suas seções de choque transversais médias.

O acoplamento da técnica de IM com MS (IMMS) alavancou sua utilização na análise de macromoléculas biológicas. IMS se baseia na separação de íons através de um gás por meio de um campo elétrico, sendo essa separação dependente da massa, carga e seção de choque do analito. A separação por seção de choque é extremamente interessante do ponto de vista de MS, uma vez que permite a diferenciação de isóbaros pela conformação que estes adquirem em fase gasosa. Existem dois tipos básicos de analisadores de mobilidade iônica, conhecidos como *Drift Tube* e *Travelling Wave (TW)*, sendo que a diferença entre esses se baseia no modo como esses instrumentos separam os analitos de interesse<sup>68,69,70,71,72</sup>. Embora o uso de IMMS seja relativamente recente (quando comparado a HDX), grande sucesso já foi alcançado, principalmente com equipamentos não comerciais (*homemade*), em estudos de estrutura/conformação de peptídeos e proteínas<sup>73,74,75,76</sup>, estudos de enovelamento e desenovelamento de proteínas<sup>74, 77</sup>, interações proteína-proteína<sup>78, 79, 80</sup> e mudanças conformacionais<sup>81,82</sup>.

Nos últimos anos, duas outras técnicas de caracterização estrutural de proteínas e complexos protéicos baseadas em MS vem ganhando destaque. Conhecidas como *Footprinting* e *Cross-linking* (ligação cruzada) essas técnicas se baseiam em modificações químicas (radicais hidroxila e agentes de ligação cruzada, respectivamente) nas cadeias laterais dos aminoácidos para determinar a estrutura espacial.

### 1.3 Footprinting

O termo *footprinting* refere-se, a ensaios que analisam mudanças estruturais macromoleculares através da determinação da acessibilidade do solvente a cadeia principal, bases ou cadeias laterais de macromoléculas, utilizando sua sensibilidade a agentes químicos, ou clivagem enzimática, ou modificação de reações<sup>83, 84</sup>. A técnica de *footprinting* foi originalmente desenvolvida para a análise da ligação de uma proteína ao DNA, que previa a utilização de uma nuclease não-específica para clivar a cadeia principal do DNA, sendo os fragmentos analisados por eletroforese em gel<sup>85,86</sup>. A canaleta do gel correspondente a amostra contendo DNA apresenta uma “pegada” (do termo inglês, *footprinting*), (referente à porção do DNA que interage com a proteína) e, conseqeentemente, não pode ser digerida pela enzima (Figura 2). *Footprinting* de DNA por meio de modificações químicas foi desenvolvido pouco tempo depois, onde a ligação da proteína com uma região do ácido nucléico impedia a marcação dessa região.



**Figura 2.** Experimento de *footprinting* de DNA visando a identificação das bases que interagem com a proteína<sup>85</sup>.

Em contraste com as mais diversas aplicações de métodos de *footprinting* para análise de ácidos nucleicos, *footprinting* de proteínas raramente era utilizado no estudo de interações proteína-proteína ou proteína-ácido nucleico. Dois grandes obstáculos apareciam para realização de experimentos de *footprinting* em proteínas. (i) Proteínas são estruturadas tridimensionalmente, sendo que tal estrutura restringe severamente a acessibilidade das endoproteínases as proteínas. (ii) Ao contrário do que acontece com os ácidos nucleicos, somente alguns reagentes são conhecidos para modificar as proteínas no seu estado nativo, para que as clivagens dos polipetídeos, nos locais de modificação, possam ser feitas posteriormente.<sup>87</sup> Devido a esses problemas, a utilização de *footprinting* para determinar a estrutura e mapear regiões da proteína que interagem com outras moléculas se deu a partir da década de 80,<sup>88</sup> mas foi somente na década de 90<sup>87</sup> que a utilização de reagentes químicos específicos para alguns resíduos associado à degradação de Edman foi utilizado para determinação de resíduos expostos em proteínas, fato esse que alavancou a utilização de diversos reagentes para a avaliação de vários resíduos.

Embora a metodologia descrita acima tenha contribuído para a utilização da técnica de *footprinting* para mapear estruturas através da acessibilidade ao solvente, esta sofria de algumas limitações que dificultavam sua aplicação em muitos casos. Um dos principais problemas estava relacionado com a especificidade tanto das proteases quanto dos reagentes químicos utilizados, que limitavam significativamente o número de resíduos que poderiam ser modificados pela técnica. Para tentar contornar este problema Heyduk em 1994<sup>89</sup> propôs a utilização de radicais hidroxilas como reagente de clivagem da cadeia principal, sendo que a utilização deste tipo de reagente mostrava vários atrativos como: (i) radicais OH têm área de van der Waals e propriedades de solventes semelhantes aos de moléculas de água, isso torna os radicais ideais para uso como sondas de acessibilidade do solvente, (ii) são altamente reativos além de possuírem uma seletividade química bem compreendida e (iii) eles podem ser gerados de forma segura e conveniente, sob uma ampla gama de condições de solução<sup>89,90</sup>.

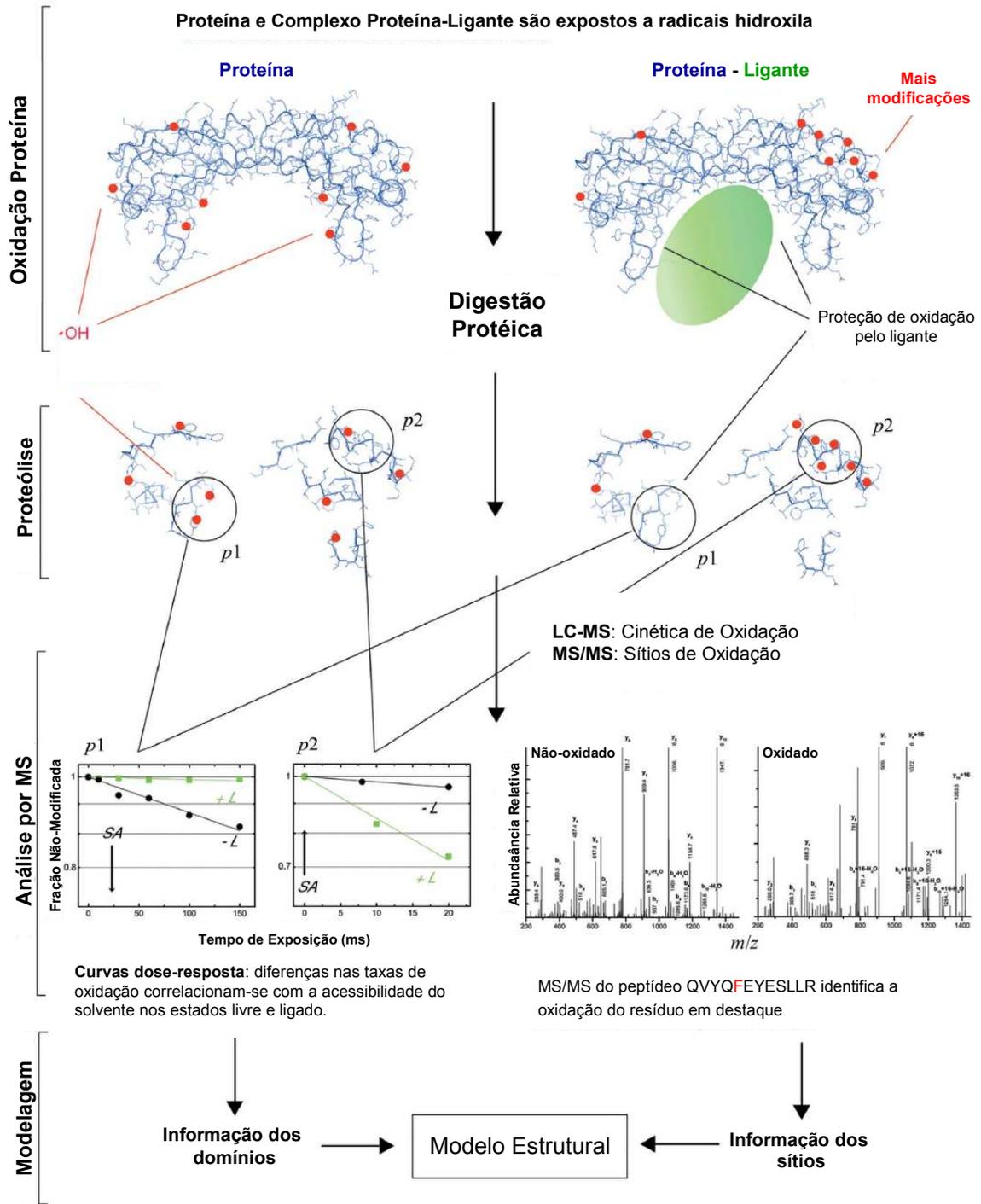
Radicais hidroxilas apresentam reatividade frente à cadeia lateral dos aminoácidos, levando a formação de produtos de modificação covalente<sup>91</sup>. Assim em 1999, o grupo do pesquisador Mark Chance propôs a utilização dessas espécies como sonda para determinação de acessibilidade ao solvente dos diferentes resíduos de uma proteína<sup>92</sup>. Nesse estudo, foi possível determinar que, controlando-se as doses de radicais •OH, às quais as proteínas são submetidas, é possível obter somente a formação de produtos de modificação (ausência de clivagem da cadeia polipeptídica) uma vez que a reação de cadeias laterais dos aminoácidos com radicais hidroxilas ocorre a taxas de 10 a 1000 vezes mais rápidas do que a abstração do hidrogênio do carbono da cadeia.<sup>91,92,93</sup> Assim, as cadeias laterais são preferíveis como sondas para o estudo da estrutura da proteína.

Em decorrência desse trabalho, novos estudos foram realizados com o objetivo de determinar quais seriam os produtos da reação de oxidação para os aminoácidos, sendo que diversos produtos de oxidação foram propostos para resíduos alifáticos/aromáticos<sup>94</sup>, básicos<sup>101</sup>, ácidos<sup>102</sup> e contendo enxofre<sup>95</sup>, bem como a ordem de reatividade intrínseca de cada aminoácido<sup>96</sup>, sendo que os detalhes referentes aos produtos de oxidação formados serão discutidos na seção 1.3.2.

São vários os métodos disponíveis para geração de radicais •OH em solução aquosa, como por exemplo, reagentes de Fenton<sup>97,89</sup>, exposição à radiação  $\delta$ <sup>98</sup>, radiólise da água por raios-X síncrotron<sup>99,100,101,102</sup> e fotólise de peróxido de hidrogênio utilizando radiação UV<sup>103,104,105,106</sup>. Cada um dos métodos citados anteriormente para de geração de radicais hidroxilas em solução apresentam suas vantagens e limitações, sendo que o método empregando radiação UV para fotólise de peróxido de hidrogênio tem ganhado bastante destaque nos últimos anos, devido a necessidade de uma instrumentação mais simples ( quando comparada ao método de radiólise da água) e curtos tempos de exposição da amostra a radiação para geração dos produtos de oxidação (quando comparado a métodos utilizando Fenton) e maior segurança em relação a raios  $\gamma$ .

Maiores detalhes sobre a fotólise de peróxido de hidrogênio utilizando radiação UV serão melhores discutidos na seção 1.3.1.

O esquema do experimento de *footprinting* acoplado a MS com o intuito de determinar a estrutura de uma proteína, bem como, a superfície de interação proteína ligante pode ser observado na Figura 3. O experimento típico de *footprinting* consiste na exposição, tanto da proteína isolada quanto do complexo proteína-ligante, aos radicais hidroxilas por diferentes intervalos de tempo. As amostras são então digeridas e analisadas por MS. Análises do tipo LC-MS/MS permitem identificar os sítios de oxidação, enquanto análises de LC-MS são utilizadas para quantificar a oxidação. O próximo passo consiste na determinação da cinética de oxidação dos peptídeos e a comparação dos dados: aqueles peptídeos que se encontram na superfície de interação proteína-ligante ficam protegidos da reação com  $\bullet\text{OH}$  e, portanto, tem sua cinética de oxidação diminuída em relação a amostra sem ligante. Métodos computacionais podem ser subsequentemente utilizados para a construção de modelos tridimensionais do complexo<sup>107</sup>. O método de *footprinting* com geração de radicais por meio de fontes de radiação UV (empregando laser como fonte), tem permitido realizar estudos relacionados à estrutura de proteínas em solução<sup>108</sup> e o seu desenovelamento<sup>109,110</sup> acompanhando a dinâmica desse processo em estudos resolvidos no tempo (dinâmica molecular).

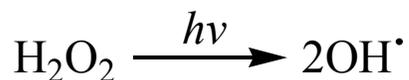


**Figura 3.** Esquema experimental de *footprinting* acoplado a MS para obtenção de dados estruturais de proteínas (adaptado da referência 100).

Embora várias aplicações do método já tenham sido relatadas na literatura, há algumas dificuldades experimentais que limitam um uso mais abrangente da técnica. A geração de radicais  $\cdot\text{OH}$  requer, geralmente, ou uma instrumentação não usual (radiação síncrotron) ou tempo muito longo de exposição (Fenton). Além disso, a quantificação da oxidação ainda é uma dificuldade constante nesses experimentos.

### 1.3.1 Geração de Radicais Hidroxilas em solução utilizando radiação UV

A geração de radicais hidroxilas induzida por radiação UV em uma solução aquosa é obtida pela cisão homolítica da molécula de peróxido de hidrogênio gerando dois radicais hidroxila<sup>111,112,113</sup>. Em contraste aos métodos utilizando radiólise da água, onde a energia é depositada na água, os resultados da fotólise são devido a absorção dos fótons pelas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com posterior clivagem, como pode ser observado na equação 1.

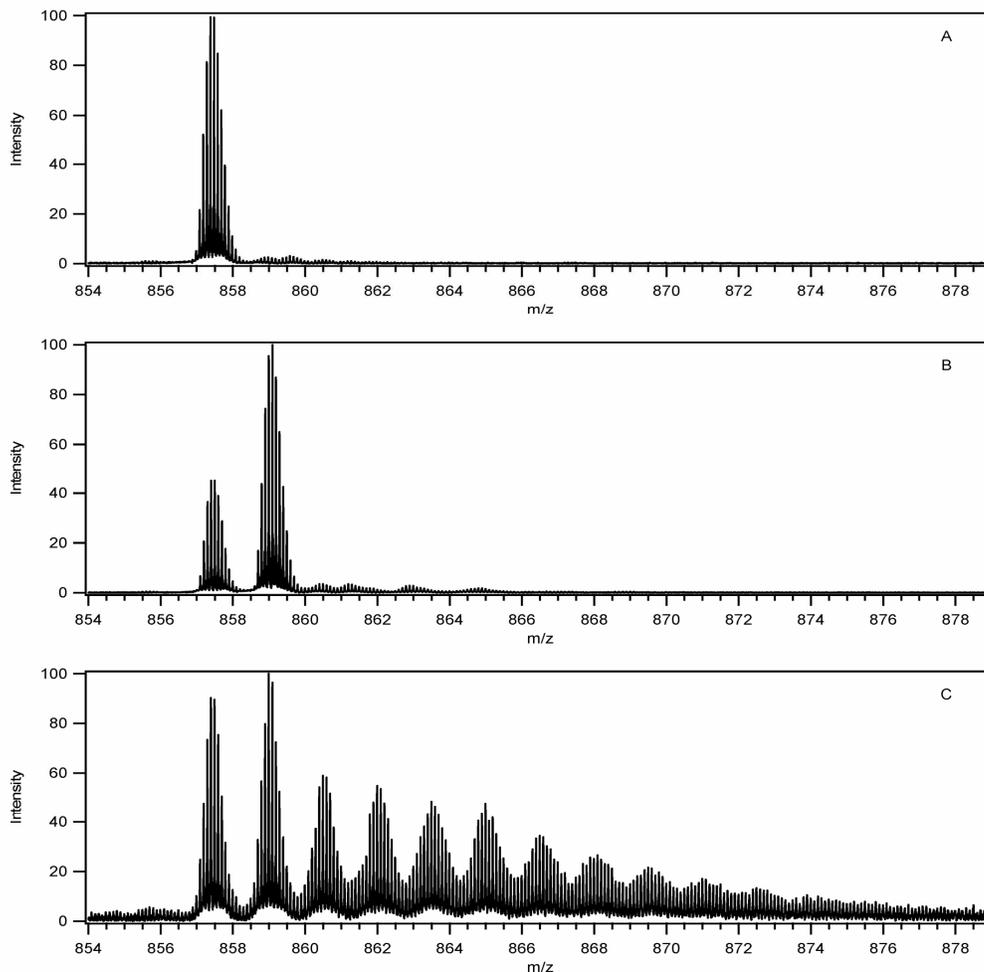


#### **Equação 1.** Fotólise do peróxido de hidrogênio

O processo de fotólise do  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem sido amplamente utilizado em processos industriais, tais como tratamento de água, esterilização de equipamentos médicos, e aplicações de branqueamento. Mais recentemente, tem sido utilizada para estudos de *footprinting* em ácidos nucleicos<sup>114</sup> e na oxidação da superfície da proteína. Em 2004, Sharp et al,<sup>103</sup> aplicaram esse método para analisar a acessibilidade ao solvente da superfície de duas proteínas, especificamente a lisozima e a  $\beta$ -lactoglobulina. As amostras contendo 15% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram irradiadas com uma lâmpada UV, e, em seguida, submetidas a digestão e análise por espectrometria de massas. As oxidações das cadeias laterais encontradas foram condizentes com a acessibilidade ao solvente desses resíduos.

Para reduzir o tempo de exposição e a concentração de  $H_2O_2$  necessárias para a modificação de proteínas (resíduos exposto ao solvente), Aye e colaboradores desenvolveram um método utilizando um laser como fonte de irradiação para a fotólise do  $H_2O_2$  para o mapeamento das superfícies de proteínas utilizando a espectrometria de massas<sup>115</sup>.

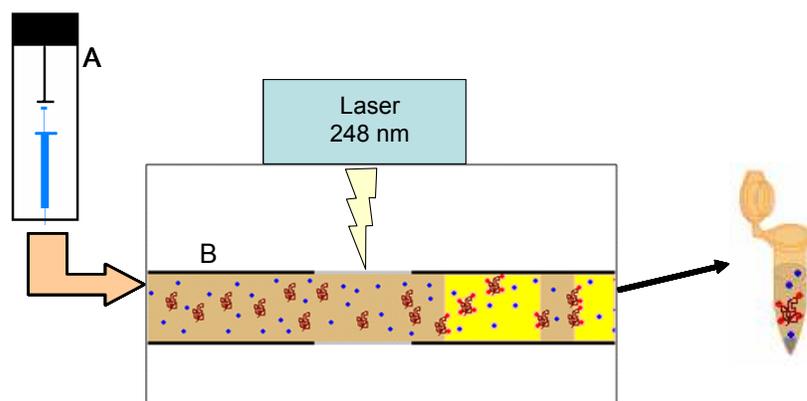
Neste método, duas proteínas modelo, ubiquitina e apomioglobina, foram utilizadas adicionando  $H_2O_2$  às soluções de cada proteína antes da irradiação com o laser. A amostra foi oxidada por radicais hidroxila gerados pela exposição a um laser de Nd:YAG (266 nm) realizando de 1-100 disparos. Imediatamente após a irradiação, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido com posterior liofilização sob vácuo para remover o  $H_2O_2$  residual. As amostras de proteína foram então reconstituídas, digeridas por enzimas, e analisadas por espectrometria de massas para mapear os resíduos e aminoácidos oxidados. O resultado indicou que um único pulso do laser pode gerar extensas oxidações na superfície da proteína, e dados obtidos através de análises de massas utilizando LC-MS e LC-MS/MS. Além disso, foi observado que com 100 pulsos de laser, a ubiquitina foi oxidada em vários locais, com até 18 oxidações por proteína. (Figura 4)



**Figura 4.** Espectros de FT-MS da ubiquitina e os seus homólogos oxidados com 10 cargas após diferentes pulsos de laser (A) sem nenhum pulso de laser, (B) um pulso de laser, (C) 100 pulsos de laser<sup>115</sup>.

Ao mesmo tempo, Hambly e Gross<sup>105,106</sup> também desenvolveram um sistema para fotólise de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando um laser para oxidação dos resíduos das proteínas expostos ao solvente na escala de tempo de microsegundos. Neste trabalho, os autores utilizaram um laser de *excimer* KrF (17-ns) com 50 mJ de energia/pulso (em comparação com a 2 mJ/pulso usado por Aye) e operado em 248 nm tentando minimizar a absorção da radiação pela proteína. Para este estudo, uma solução contendo apomioglobina foi utilizada com uma concentração

de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,8 com  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,04% (v/v)) na solução, sendo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionado pouco antes da irradiação. Para passagem da amostra ( $50 \mu\text{L}$ ) pelo laser foi utilizada uma bomba de seringa (seringa de  $100 \mu\text{L}$ , fluxo  $20 \mu\text{L min}^{-1}$ ) acoplada a um capilar de sílica fundida de  $100 \mu\text{m}$  de diâmetro interno sendo que o revestimento de poliimida foi removido ( $\sim 2,5 \text{ cm}$ ) para obter uma janela transparente para passagem da radiação através da amostra (Figura 5).



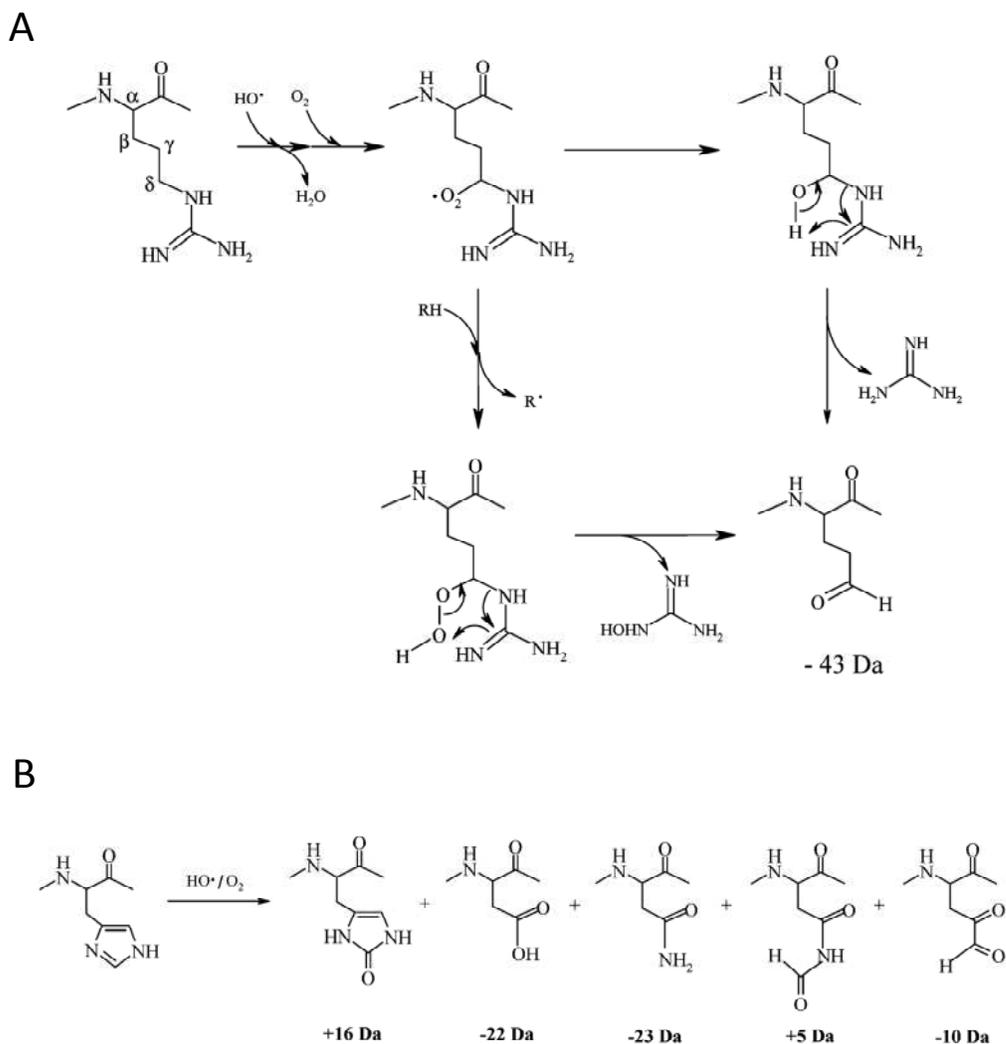
**Figura 5.** Esquema do sistema utilizado para passagem da amostra através do laser utilizando capilar de sílica fundida<sup>116</sup>.

O tempo de reação e exposição de proteína de radicais foram ajustados pela adição de glutamina como um agente antioxidante.

### 1.3.2 Produtos de oxidação e Reatividade das cadeias laterais dos aminoácidos

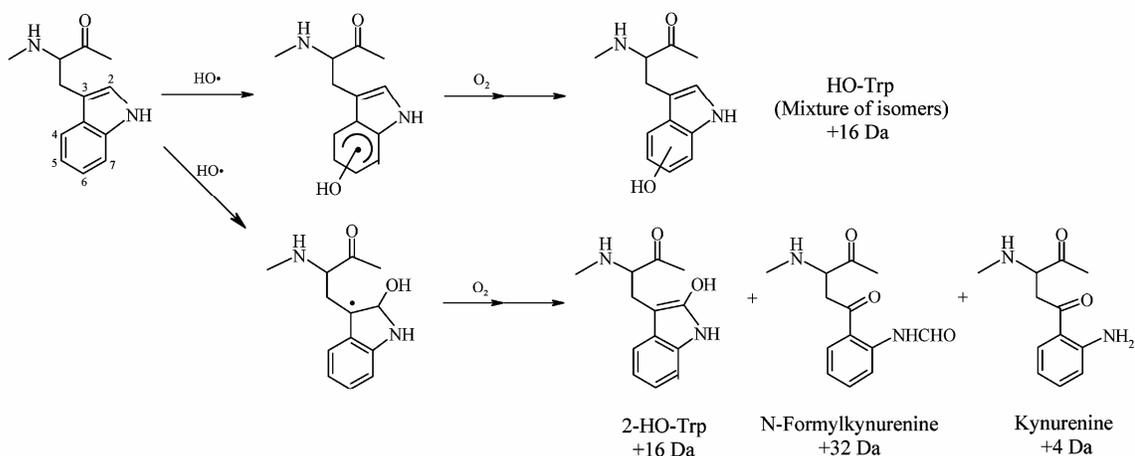
Em experimentos de *footprinting*, os radicais hidroxila formados em solução oxidam as cadeias laterais de aminoácidos alifáticos, por exemplo, Leu, Ile, Val e Ala, pela adição de um grupo hidroxila a cadeia lateral resultando em um incremento de massa de +16 Da (cetona/aldeído) ou a +14 Da quando da formação de uma carbonila. Essa modificação se dá mediante a abstração de um próton pelo radical, levando a formação de uma espécie radicalar na qual o elétron desemparelhado localiza-se no átomo de carbono. Após essa etapa, ocorre a reação com o O<sub>2</sub> dissolvido<sup>117</sup> na água levando a formação de um radical peroxil<sup>118</sup>.

Em relação aos resíduos básicos, todos os três resíduos são suscetíveis à oxidação em experimentos de *footprinting*. Estes resíduos, em especial Arg e Lys, são preferencialmente localizadas na superfície da proteína e são freqüentemente envolvidos nas interações de proteínas, fazendo com que estes resíduos tenham grande importância para o mapeamento de superfícies da proteína e para estudos de interação proteína-ligante. Como produtos de oxidação da arginina, são formados um produto primário com redução de massa característica de 43 Da e dois produtos com acréscimos de +14 e +16 Da (Figura 6). Para Histidina, uma mistura de produtos de oxidação é formada com diferenças de massa característica de -22, -23, -10, +5, e +16 Da por meio da abertura e da adição oxidativa do anel imidazol (Figura 6).<sup>119</sup> A Lisina também é bastante suscetível à oxidação, sendo convertida para hidroxil-lisina ou carboxi-lisina, mas possui uma taxa de oxidação mais lenta do que histidina<sup>119</sup>.



**Figura 6.** Mecanismo oxidação da cadeia lateral da (A) arginina; (B) histidina.

Os resíduos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), por sua vez, reagem por meio de abstração de um hidrogênio do anel, criando um sítio radicalar no carbono do anel; esse sítio sofre adição de  $O_2$ , reagindo posteriormente como espécies alifáticas. A Figura 7 apresenta os produtos de oxidação propostos para o triptofano<sup>118</sup>.



**Figura 7.** Produtos de oxidação da cadeia lateral do triptofano.

Já os resíduos de aminoácidos contendo enxofre na sua estrutura, Cys e Met, apresentam as cadeias laterais mais reativas dentre os aminoácidos<sup>120</sup>. Eles são valiosas sondas estruturais tanto pela sua reatividade como o de desempenhar papéis importantes na estrutura e funções de uma proteína.

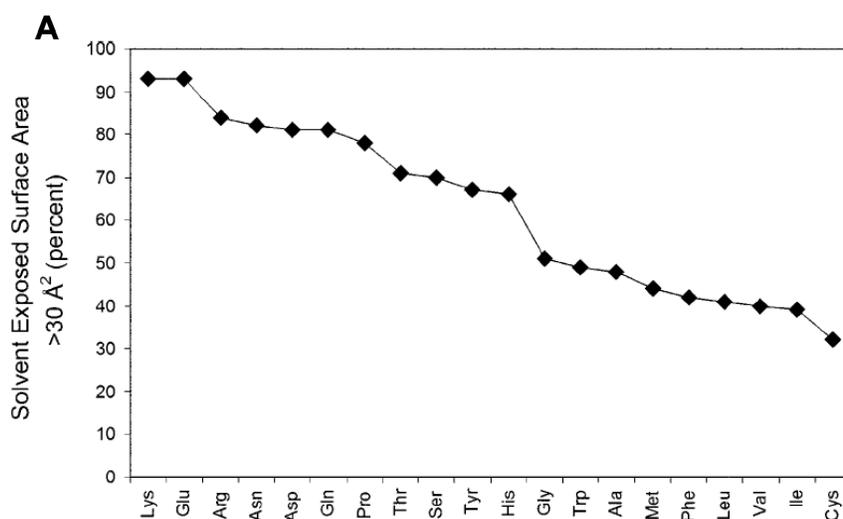
A Cisteína é importante para a atividade catalítica de muitas enzimas<sup>121</sup> e é o segundo resíduo mais conservado na estrutura primária de proteínas homólogas após Trp.<sup>123</sup> Pontes dissulfeto são também muito importantes na estrutura da proteína, e existe uma visão clássica de que elas foram adicionadas durante a evolução para fins de estabilidade. Metionina, um resíduo hidrofóbico contendo enxofre na cadeia lateral, em geral, prefere estar protegida em núcleos de proteínas hidrofóbicas. Tanto Cys como Met apresentam uma alta reatividade com radicais hidroxila<sup>124</sup> e ambos são facilmente oxidados em muitas proteínas. Um resumo com todos os produtos de oxidação propostos e conhecidos até o momento pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Produtos primários e mudanças em massa correspondente de várias cadeias laterais de aminoácidos lado quando submetidos ao experimento de *footprinting*

<b>Aminoácido</b>	<b>Modificação cadeia lateral e diferença de massa</b>
Cisteína	Ácido sulfônico (+48), ácido sulfínico (+32), hidroxí (-16)
Cistina	Ácido sulfônico (+48), Ácido sulfínico (+32)
Metionina	Sulfoxido (+16), aldeído (-32), sulfona (+32)
Triptofano	Hidroxí (+16, +32, +48), abertura do anel pirrolidina (+32)
Tirosina	Hidroxí (+16, +32)
Fenilalanina	Hidroxí (+16, +32)
Histidina	Oxo (+16), abertura anel pirrolidina (-22, -10, +5)
Leucina	Hidroxí (+16), carbonil (+14)
Isoleucina	Hidroxí (+16), carbonil (+14)
Valina	Hidroxí (+16), carbonil (+14)
Prolina	Hidroxí (+16), carbonil (+14)
Arginina	Deguanidinação (-43), hidroxí (+16), carbonil (+14)
Lisina	Hidroxí (+16), carbonil (+14)
Ácido Gultâmico	Descarboxilação (-30), hidroxí (+16), carbonil (+14)
Glutamina	Hidroxí (+16), carbonil (+14)
Ácido Aspártico	Descarboxilação (-30), hidroxí (+16)
Asparagina	Hidroxí (+16)
Serina	Hidroxí (+16), -2 (+16 e perda H <sub>2</sub> O)
Treonina	Hidroxí (+16), -2 (+16 e perda H <sub>2</sub> O)
Alanina	Hidroxí (+16)

Após a determinação das possíveis espécies obtidas, quando da oxidação de proteínas por radicais hidroxila, o grupo do pesquisador Mark Chance avaliou as taxas de oxidação relativa, juntamente com a facilidade de detecção dessas espécies por MS, para determinar quais resíduos seriam sondas úteis nesses experimentos<sup>95</sup>.

Os dados obtidos utilizando soluções diluídas de aminoácidos ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e tempos de exposição da ordem de milisegundos estavam de acordo com o estabelecido anteriormente, onde a ordem de reatividade dos aminoácidos varia da seguinte forma: contendo S > aromáticos > básicos > alifáticos ~ ácidos. Em virtude desse fato, Gly, Asn, Asp e Ala foram descartados como sondas devido à sua baixa reatividade (Figura 8). Por outro lado, Ser e Thr também foram descartadas como sondas nesses experimentos, em virtude da dificuldade de detecção dos produtos de oxidação por MS. Isso ocorre porque após a adição de  $\text{O}_2$  ao carbono próximo a hidroxila da cadeia lateral desses resíduos, pode haver a liberação do radical  $\bullet\text{OOH}$ , gerando um produto cuja diferença de massa com o precursor é de somente 2 Da<sup>96</sup>.



**B**

amino acid	rate of reaction with $\cdot\text{OH}$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	frequency in proteins (%) <sup>b</sup>	fraction observed with SEA >30 Å <sup>2</sup> <sup>c</sup>	SEA × frequency <sup>d</sup>
Cys	$3.4 \times 10^{10}$	2.8	0.32	0.9
Tyr	$1.3 \times 10^{10}$	3.5	0.67	2.3
His	$1.3 \times 10^{10}$	2.1	0.66	1.4
Met	$8.3 \times 10^9$	1.7	0.44	0.7
Phe	$6.5 \times 10^9$	3.5	0.42	1.5
Arg	$3.5 \times 10^9$	4.7	0.84	3.9
Leu	$1.7 \times 10^9$	7.5	0.41	3.1
Ile	na	4.6	0.39	1.8
Trp	$1.3 \times 10^9$	1.1	0.49	0.5
Pro	na	4.6	0.78	3.6
Val	$7.6 \times 10^8$	6.9	0.4	2.8
Thr	$5.1 \times 10^8$	6.0	0.71	4.3
Ser	$3.2 \times 10^8$	7.1	0.70	5.0
Glu	$2.3 \times 10^8$	6.2	0.93	5.8
Gln	na	3.9	0.81	3.2
Ala	$7.7 \times 10^7$	9.0	0.48	4.3
Asp	$7.5 \times 10^7$	5.5	0.81	4.5
Asn	$4.9 \times 10^7$	4.4	0.82	3.6
Lys	$3.5 \times 10^7$	7.0	0.93	6.5
Gly	$1.7 \times 10^7$	7.5	0.51	3.8

**Figura 8.** – (A) Área superficial exposta ao solvente para os 20 aminoácidos em proteínas depositadas no Protein Data Bank (PDB). (B) Cinética de reação dos aminoácidos frente ao radical hidroxila, frequência de cada aminoácido em proteínas,

fração na qual esses aminoácidos apresentam área superficial exposta (SEA) maior que  $30 \text{ \AA}^2$  e o produto entre a frequência dos aminoácidos em proteínas e a SEA<sup>95,96</sup>.

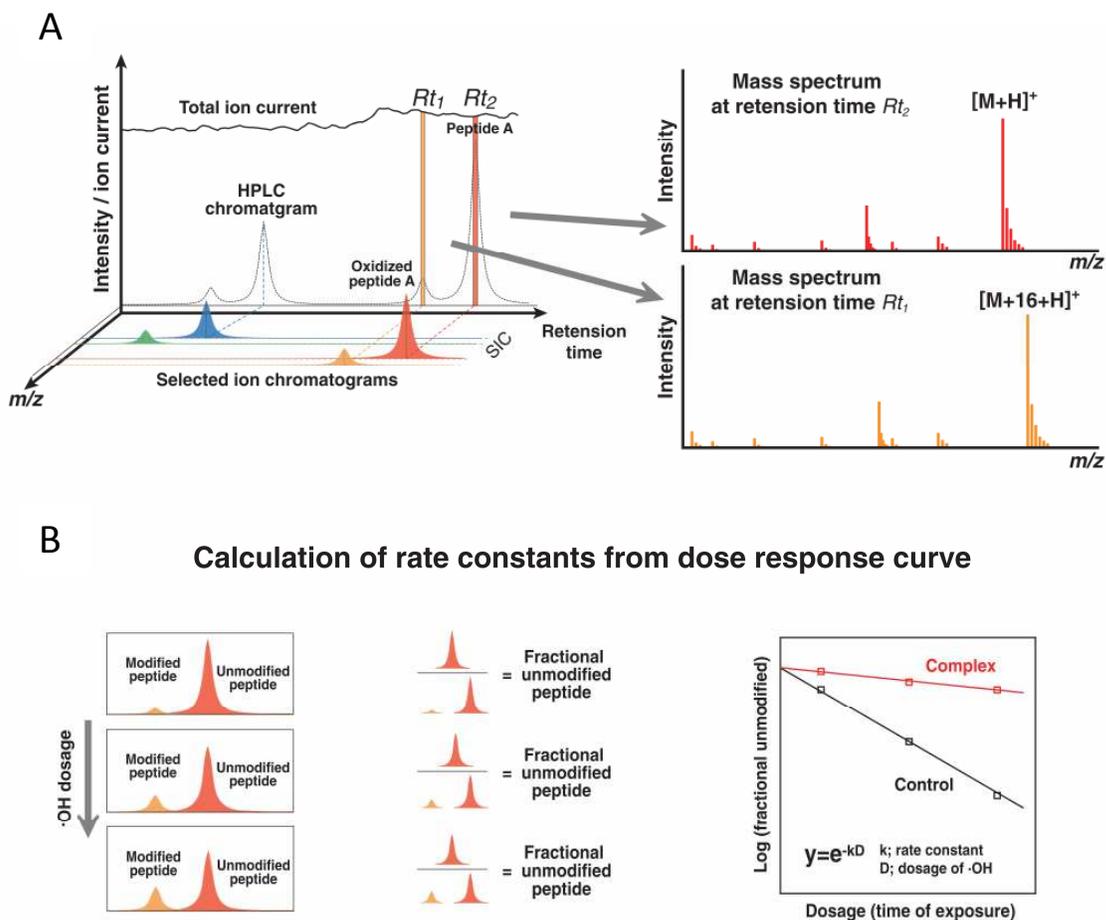
Baseados nos dados obtidos anteriormente foi proposto o diagrama apresentado na Figura 3 para a obtenção de dados estruturais de complexos protéicos por experimentos de *footprinting*.

### 1.3.3 Quantificação da Taxa de oxidação

Para se realizar a quantificação de oxidação em experimentos de *footprinting*, após a proteína ser submetida a diferentes intervalos de tempos de irradiação, as amostras são digeridas e analisadas por LC-MS. A proteólise geralmente é feita individualmente, com um conjunto de proteases específicas, tais como tripsina, Asp-N, ou Glu-C, a fim de maximizar a cobertura da sequência. A cobertura completa de proteínas grandes usando o MS não é fácil. No entanto, 80% de cobertura ou mais é geralmente possível.

Os peptídeos obtidos após a proteólise são analisados por LC-MS (Figura 9) Para separação é utilizada a cromatografia líquida de fase reversa que separa os peptídeos oxidados das espécies não oxidadas. Os peptídeos modificados são geralmente eluídos antes dos peptídeos não modificados pela simples adição de um álcool ou uma cetona na sua estrutura proveniente da etapa de oxidação. Para a identificação de todos os peptídeos, modificados e não-modificados, são realizadas análises de MS/MS. A abundância de cada peptídeo é calculada a partir do cromatograma da corrente iônica (área do pico).

De posse dos valores das áreas dos picos cromatográficos dos peptídeos, a taxa de oxidação de peptídeos é determinada por meio da construção de uma curva tipo dose-resposta. Essa curva é construída sendo que para cada intervalo de tempo de exposição à radiação, a fração de peptídeo não-modificado é calculada dividindo-se a área do pico cromatográfico do peptídeo não-modificado pela soma das áreas do peptídeo modificado e não modificado. Esses valores são ajustados para uma reta, considerando cinética de pseudo-primeira ordem de oxidação (Figura 9)<sup>90</sup>.



**Figura 9.** Coleta de dados e análise de dados após experimento de *footprinting*<sup>90</sup>.

(A) Peptídeos são separados por cromatografia líquida e introduzidos em um analisador de massa. Os cromatogramas de íons selecionados (SIC) são construídos para cada íon (com massa especial) em função do tempo de retenção. Ao monitorar a massa e o tempo, sabemos qual espécie aparece em que momento da corrida. Ao integrar áreas de pico na SIC, podemos calcular a abundância de íons total indicados. (B) As determinações das taxas de alteração são realizadas através do cálculo da "perda de peptídeo intacto", a fim de maximizar o interrogatório de material intacto.

A grande limitação dessa metodologia consiste na determinação da quantidade de peptídeo modificado. Em todos os trabalhos descritos, considera-se como produto de oxidação peptídeos que apresentam diferença de massa +14 ou +16 Da em relação ao precursor, visto que essa é razoavelmente comum para aminoácidos alifáticos. Ocorre que a reatividade dos resíduos em experimentos de *footprinting* é dependente de dois parâmetros: reatividade intrínseca e grau de

exposição ao solvente. Desse modo, considerando uma contribuição igual para esses dois parâmetros, os resíduos mais suscetíveis a oxidação seriam na ordem: lisina, ácido glutâmico, serina, ácido aspártico e treonina. É interessante notar que para a maioria dos aminoácidos, os produtos de oxidação +14 e +16 Da são minoritários ou até mesmo inexistentes. Além disso, em muitos casos pode ocorrer em um determinado peptídeo de haver mais de um aminoácido exposto/protegido, e, portanto passível de oxidação. Isso deve ser extremamente comum uma vez que a interação entre proteínas não ocorre via contato entre alguns poucos aminoácidos, mas, sim, entre superfícies, englobando vários resíduos contidos em vários peptídeos<sup>126</sup>. Finalmente, essa abordagem não considera a possibilidade de formação de outros produtos de oxidação ainda não descritos na literatura. Desse modo, considerar somente essas modificações no cálculo da cinética de oxidação em muitos casos acarretaria em subestimar tais taxas.

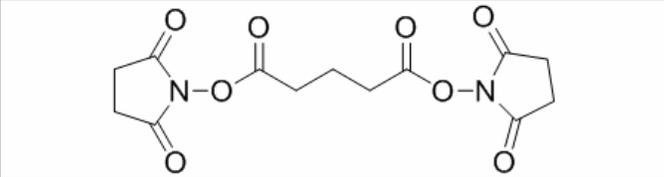
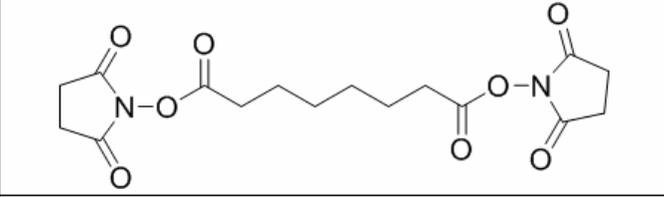
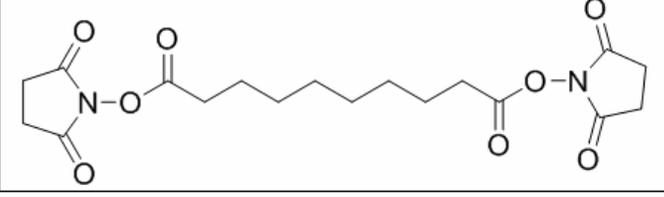
#### **1.4 Ligação Cruzada (*Cross-linking*)**

A técnica de ligação cruzada aplicada a sistemas biológicos apresenta um recente crescimento dentro de estudos de modificação química de proteínas.<sup>127</sup> A história de modificações químicas remonta à década de 20 quando se provou que enzimas eram proteínas<sup>128</sup>. Nesta fase inicial, a técnica foi utilizada principalmente para identificar os aminoácidos responsáveis por sua atividade catalítica. Devido à falta de instrumentação e métodos de análise, o progresso no desenvolvimento de novos procedimentos e reagentes foi inicialmente lenta. As primeiras revisões sobre o assunto foram publicadas em 1947<sup>129, 130</sup>. Desde então, a aplicação utilizando modificação química tem crescido exponencialmente de mãos dadas com o desenvolvimento de técnicas de análise bioquímicas.

A ligação cruzada é uma modificação química onde as cadeias laterais de dois aminoácidos na superfície da proteína que estejam espacialmente próximas são ligadas covalentemente através de um agente de ligação cruzada (ALC). Os ALC's são, em geral, reagentes bifuncionais, ou seja, contém dois grupos reativos frente a cadeias laterais presentes na proteína separados por um conjunto de

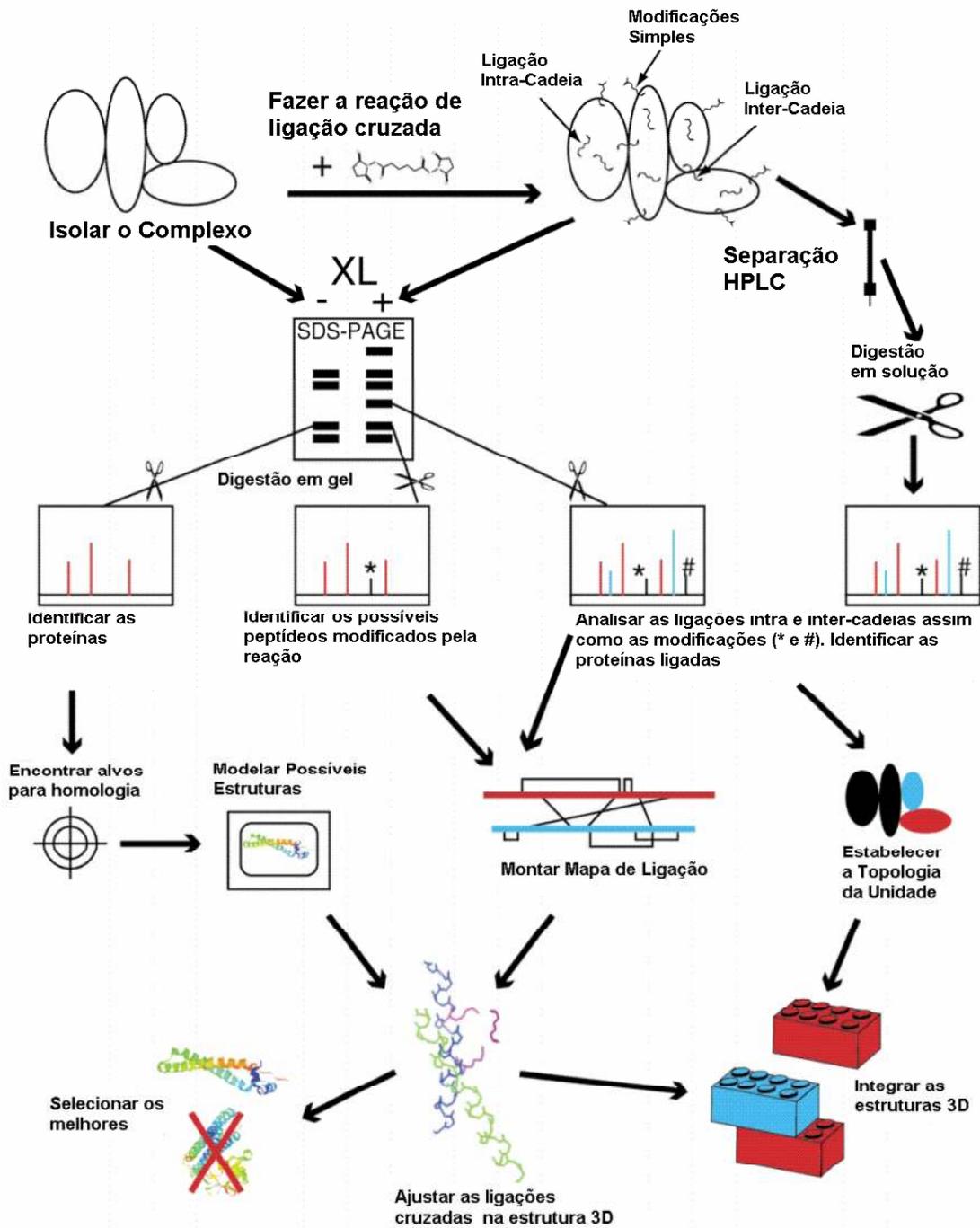
átomos conhecido como cadeia espaçadora. Eles podem ser classificados como homobifuncionais ou heterobifuncionais, dependendo do fato dos grupos reativos serem iguais ou diferentes. Há ainda uma terceira classe, conhecida como *zero-length*, que são reagentes que mediam a formação de ligações covalentes sem adição de átomos extrínsecos a proteínas (não contém a cadeia espaçadora). A escolha do reagente ideal é dependente do experimento e da informação desejada, dependendo de inúmeros fatores tais como (in)especificidade dos grupos reativos, solubilidade, tamanho e geometria dos reagentes e presença de grupos que auxiliem na detecção das moléculas ligadas<sup>131,132,133</sup>.

Um dos itens mais importantes nessa escolha consiste na natureza dos grupos reativos, visto que são eles que definem a especificidade das ligações formadas. Dentre os agentes de ligação cruzada disponíveis atualmente, os de maior destaque são aqueles reativos frente a aminas primárias. Isso se deve principalmente a alta ocorrência de grupos aminos (resíduos de lisina e o N-terminal da proteína). Os derivados da N-hidroxisuccinimida (NHS) (Figura 10) são os ALC's mais utilizados atualmente, devido aos rendimentos relativamente altos das reações e, principalmente, à facilidade de sua obtenção<sup>134</sup>. Outro fator importante na escolha do ALC é a cadeia espaçadora, visto que além de determinar a distância entre os grupos unidos e, portanto, fornecer as informações estruturais desejadas, ela também afeta algumas das propriedades físico-químicas, como a solubilidade em água e o grau de penetração da molécula em diferentes ambientes.

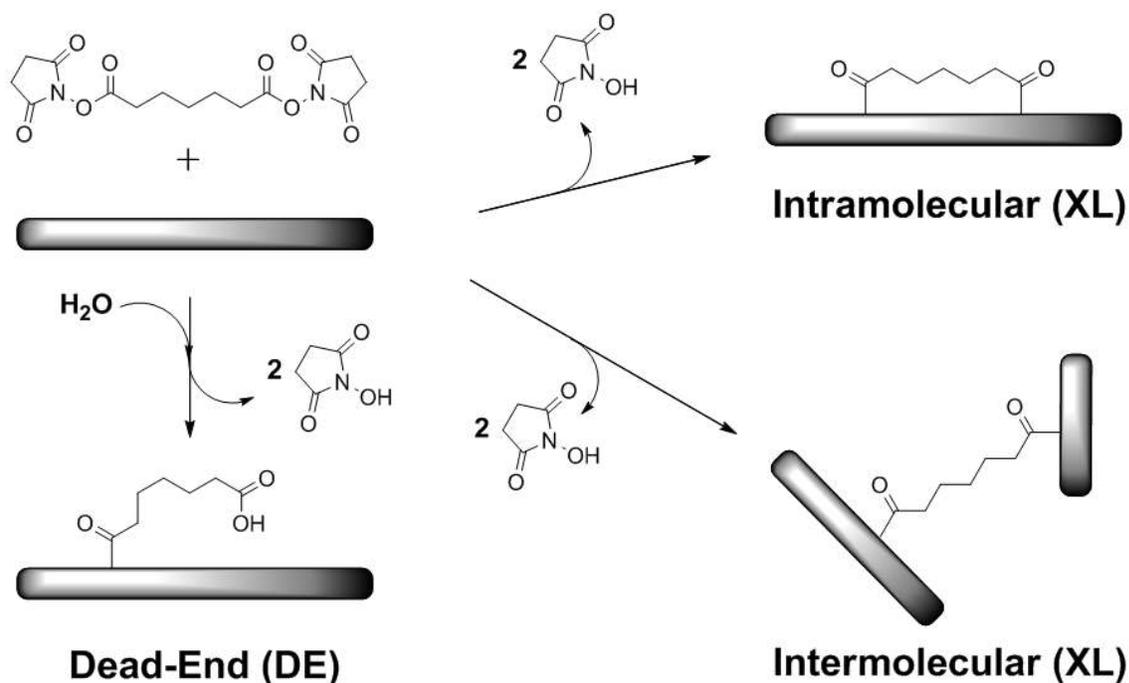
	Bisuccinimidil Glutarato <b>DSG</b>
	Bisuccinimidil Suberato <b>DSS</b>
	Bisuccinimidil Sebacato <b>DSSeb</b>

**Figura 10.** Série dos Agentes de Ligação Cruzada baseados em ésteres da NHS empregados nesse estudo das cadeias espaçadoras.

O experimento típico de ligação cruzada e MS visando à obtenção de dados estruturais de proteínas e seus complexos podem ser visualizado na Figura 11<sup>135</sup>. Após a reação, diferentes tipos de produtos podem ser formados (Figura 12): i) *dead-end*, onde somente um dos grupos reativos reagiu com a proteína, enquanto o outro sofreu hidrólise; ii) intramolecular, onde os dois resíduos de aminoácidos ligados encontram-se na mesma cadeia polipeptídica; e iii) intermolecular, onde os resíduos ligados encontram-se em cadeias distintas. Os produtos de interesse são separados tanto por HPLC quanto por SDS-PAGE e digeridos com uma enzima. A espécie *dead-end* é formada, em vista da alta labilidade do grupo NHS, tornando os ALC suscetíveis à hidrólise, que compete com a formação da ligação amida com resíduos de lisina e o grupo amino-terminal.



**Figura 11.** Esquema experimental da utilização de ligação cruzada associada a MS visando à obtenção de dados estruturais de proteínas<sup>135</sup>.



**Figura 12.** Produtos formados após a reação entre ALC e a proteína ou complexo protéico.

Os peptídeos resultantes são então analisados por MS, sendo que a partir dessa etapa as análises realizadas são dependentes do tipo de informação desejada: pode-se simplesmente identificar as proteínas contidas no complexo até a identificação exata de quais os peptídeos estão ligados entre si, o que permite definir a topologia do complexo bem como montar mapas de ligação entre as proteínas.

Essa abordagem tem sido utilizada nos últimos anos visando a obtenção de dados estruturais como determinação do tipo de enovelamento de proteínas<sup>136,137,138</sup>, identificação de parceiros de interação<sup>139,140,141</sup>, monitoramento de mudanças conformacionais mediante interação com ligante<sup>142, 143, 144</sup>, determinação de superfície de interações em complexos protéicos<sup>145,146,147,148</sup> e na determinação de sítios de acessibilidade ao solvente<sup>149,150,151</sup>.

Apesar dos avanços desta técnica, vários aspectos fundamentais a cerca da reatividade desses ALC's frente às cadeias laterais dos aminoácidos ainda são desconhecidos, uma vez que as propriedades químicas da cadeia lateral dos

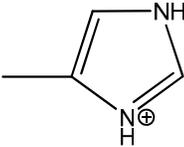
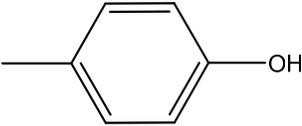
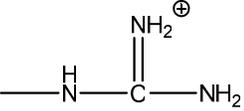
aminoácidos podem ser influenciadas por resíduos nas proximidades com a qual ele interage. Alguns estudos com certos ésteres de NHS homobifuncionais revelaram reações colaterais inesperadas. Swaim e colaboradores<sup>152</sup> encontraram vários produtos de reação durante o seu estudo sobre a proteína  $\alpha$ -cristalina com ALC clivável 3,3-ditiobis [sulfosuccinimidilpropionato] (DTSSP). Neste trabalho os autores descobriram modificações em cadeias laterais de serina e tirosina em alguns dos peptídeos modelo investigado. Na verdade, essas diferenças na reatividade podem ser utilizadas para avaliar o microambiente do resíduo. A fim de compreender os princípios que governam a reatividade de uma proteína frente aos ALC's, é necessário considerar as propriedades gerais das cadeias laterais dos aminoácidos

## **1.5 Grupos funcionais das proteínas**

### *1.5.1 Reatividade das cadeias laterais dos aminoácidos*

Em uma análise final, a reatividade química das proteínas depende das cadeias laterais dos aminoácidos de sua composição, bem como dos resíduos presentes com grupo amina e carboxila livre do N- e C-terminal, respectivamente. Estudos de modificação química revelaram que apenas algumas das cadeias laterais de aminoácidos são realmente reativas.<sup>153</sup> Dos vinte aminoácidos, os que possuem cadeias laterais alifáticas hidrofóbicas são, para todos os propósitos, quimicamente inertes. Apenas dez das cadeias laterais hidrofílicas são quimicamente ativas: arginina com o grupo guanidil, ácido aspártico e glutâmico com grupo carboxílico, cisteína pela presença do grupo tiol, histidina com anel imidazol, lisina com seu grupo amina, a metionina com tio-éter, o triptofano com grupo indol, tirosina com grupo fenólico e serina e treonina com grupo hidroxila (Tabela 2).<sup>131</sup>

**Tabela 2.** Valores de pKa dos grupos reativos das proteínas

Grupo Funcional	Aminoácido	pKa aminoácido livre
$\alpha$ —COOH	C-terminal	1,8-2,6
$\beta$ —COOH	Ácido Aspartico	3,9
$\gamma$ —COOH	Ácido Glutamico	4,3
	Histidina	6,0
$\alpha$ —NH <sub>3</sub> <sup>⊕</sup>	N-terminal	8,8-10,8
—SH	Cisteína	8,3
$\epsilon$ —NH <sub>3</sub> <sup>⊕</sup>	Lisina	10,8
	Tirosina	10,9
	Arginina	12,5
—OH	Serina e Treonina	>13

### *1.5.2 Efeitos do pH na nucleofilicidade dos grupos das cadeias laterais dos aminoácidos*

Como a protonação diminui a nucleofilicidade de uma espécie, o pH do meio afeta a velocidade de muitas reações nucleofílica. A relação entre a protonação e o pH depende do pKa do nucleófilo (Tabela 2).

Assim, a um valor de pH fixo, o grupo mais reativo é geralmente aquele com o menor pKa. Devido a essas diferenças nos valores de pKa, o grau de protonação dos grupos das cadeias laterais dos aminoácidos em um determinado valor de pH fornece uma base para a modificação diferencial. Como consequência, fica comprovada que a mudança do pH também fornece um meio para controlar o curso de uma reação química.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto consiste no desenvolvimento, melhorias e otimização dos métodos de *footprinting* e ligação cruzada empregando à espectrometria de massas para o estudo estrutural de proteínas.

### 2.2 - Objetivos específicos

Em *footprinting*, os objetivos específicos deste trabalho são:

- 1) Desenvolvimento de fontes alternativas de radiação UV para geração de radicais  $\cdot\text{OH}$  a partir da fotólise do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ;
- 2) Desenvolvimento de um novo método de quantificação de peptídeos oxidados mais apropriada.

Em relação à técnica de ligação cruzada, os objetivos específicos foram:

- 1) Estudo de reatividade de ALC's com relação à especificidade dos ALC's frente às diferentes cadeias laterais dos aminoácidos
- 2) Estudos envolvendo à cinética da reação entre os ALC's com proteínas e da reação competitiva de hidrólise

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 *Footprinting*

#### 3.1.1 *Materiais*

Mioglobina e Citocromo C de coração de cavalo (Sigma) e L-metionina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram utilizadas. Peróxido de Hidrogênio (30% Merck Darmstadt, Germany). Acetonitrila e metanol grau HPLC Tedia (Cincinnati, OH, USA). A água utilizada foi purificada/deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore). Cartuchos de SPE Oasis HLB (1 cc tamanho, tamanho de partícula de 30  $\mu\text{m}$ , tamanho do poro 80  $\text{\AA}^2$  - Waters, Milford, MA, USA).

#### 3.1.2 *Preparação das amostras para radiação UV empregando lâmpada de vapor de mercúrio*

As proteínas Mioglobina e Citocromo C foram dissolvidas em tampão fosfato 50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,0 para um volume final de 1 ml e concentração de 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi adicionado à amostra para uma concentração final de 1,0% (v/v) ( $\sim 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) pouco antes de radiação UV. As proteínas foram então oxidadas com radicais  $\cdot\text{OH}$ , gerados pela exposição da solução a uma fonte de radiação, que consistiu de uma lâmpada de vapor de mercúrio de 250 W e 400 W (Philips HPL-N com o bulbo externo removido) e um *shutter* para controlar tempos de exposição ( 22-8411 Ealing Electronic Shutter, Ilex óptica). Um porção de 100  $\mu\text{L}$  da amostra foi colocada em um microtubo que foi posicionado verticalmente em relação à lâmpada UV, e sua abertura foi devidamente alinhada com a lâmpada. Imediatamente após a irradiação, a reação de oxidação foi cessada pela adição de L-metionina (concentração final de 120  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e a solução foi imediatamente

transferida para um cartucho de SPE Oasis HLB, para remover o excesso de peróxido de hidrogênio não reagido e L-metionina. Na sequência de carregamento das amostras, as proteínas oxidadas foram dessalinizadas com 2 mL de H<sub>2</sub>O (ácido fórmico 0,1% (v/v)), seguida por eluição com 1 ml em metanol (ácido fórmico 0,1% (v/v)) e o solvente foi evaporado em sistema SpeedVac.

### *3.1.2 Preparação das amostras empregando laser como fonte de radiação*

A Mioglobina foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,0 para um volume final de 1 ml e concentração de 10 μmol L<sup>-1</sup>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado à amostra para uma concentração final de 0,05% (v/v) (~0,05 mols L<sup>-1</sup>) pouco antes de radiação UV. As proteínas foram então oxidadas com radicais <sup>•</sup>OH, gerados pela exposição da solução a uma fonte de radiação, que consistiu de um laser de Nd:YAG (UP-213 – New Wave Research) com comprimento de onda de 213 nm utilizando uma fenda de abertura de 110 μm, uma potência de 1% (v/v) e uma frequência de 20 Hz. Para passagem da amostra de mioglobina (20 μL) pelo laser, foi utilizado um capilar de sílica fundida (seção 4.3) sendo que na porção do capilar onde houve a incidência do laser, o revestimento de poliimida foi removido, deixando então uma parte translúcida. Diferentemente de quando a amostra foi irradiada pela lâmpada, à solução de mioglobina foi adicionada L-metionina (120 mmol L<sup>-1</sup>) antes da passagem da amostra pelo laser. Isso é devido ao auto rendimento na produção de radicais hidroxila durante o processo de radiação quando comprado com a utilização da lâmpada de mercúrio.

Após a passagem da amostras pelo laser, a solução foi imediatamente transferida para um cartucho de SPE Oasis HLB, para remover o excesso de peróxido de hidrogênio não reagido e L-metionina. Na sequência de carregamento das amostras, as proteínas oxidadas foram dessalinizadas com 2 mL de H<sub>2</sub>O (ácido fórmico 0,1% (v/v)), seguida por eluição com 1 ml de metanol (ácido fórmico 0,1% (v/v)). Após o processo de oxidação, a solução de proteína foi purificada

utilizando cartucho Oasis HLB (Waters Co.) e o solvente foi evaporado em sistema SpeedVac.

### ***3.1.3 Experimento de Dicroísmo Circular (CD)***

Análises de Dicroísmo Circular (190-260 nm) da solução de mioglobina (20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram realizados em um espectropolarímetro JASCO J-810, utilizando cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 milímetro de comprimento. Uma taxa de varredura de 100  $\text{nm min}^{-1}$ , uma constante de tempo de um segundo, e uma largura de banda de 1,0 nm, foram usadas. Os espectros foram medidos a  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , com uma resolução de 0,5 nm e 5 *scans* em média por espectro. As amostras foram analisadas em tampão fosfato 50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,0. O valor de absorção causado apenas pelo tampão foi subtraído do espectro final.

### ***3.1.3 Digestão das proteínas utilizando tripsina***

Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de amostras das proteínas oxidadas foram diluídas em Tampão bicarbonato de amônio 100  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 8,0. A Tripsina (Promega, Madison, WI) foi então adicionada em uma razão 50:1 (m/m) proteína/enzima. A solução foi incubada por 16 h a  $37^\circ\text{C}$  em um sistema Thermomixer (Eppendorf). A digestão foi interrompida pelo congelamento das amostras, que foram mantidos a  $-20^\circ\text{C}$  antes da análise por LC-MS e LC-MS/MS.

### ***3.1.4 Análise de LC-MS das proteínas oxidadas intactas***

Análises de LC-MS com soluções de mioglobina e citocromo C de coração de cavalo (Sigma) foram realizadas em um nanoAcquity Waters UPLC acoplado a um espectrômetro de massa Waters SYNAPT HDMS (geometria Q-TOF). O sistema UPLC foi equipado com uma coluna de dessanilização Waters Symmetry

C18 (20 mm x 180 id  $\mu\text{m}$ ; 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula), seguido por uma coluna analítica C18 Waters BEH130 (100 mm x 100 id  $\mu\text{m}$ ; 1,7 $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula). As amostras injetadas foram dessalinizadas na coluna *trap* por 3 min, com fluxo de 5  $\mu\text{L min}^{-1}$  de 97:3  $\text{H}_2\text{O/MeCN}$  com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, em seguida, a eluição da proteína da coluna *trap* foi realizada direcionando da mesma para a coluna analítica BEH130 C18 (Waters) utilizando fluxo de 1,0  $\mu\text{L min}^{-1}$  com gradiente de 97:3 para 30:70%  $\text{H}_2\text{O/MeCN}$ , com 0,1% (v/v) de ácido fórmico para um tempo total de análise de 15 min. Os dados espectrais foram processados por deconvolução com o algoritmo (MaxEnt1) fornecido pelo software MassLynx v.4.1 que acompanha o equipamento.

### ***3.1.5 Análises por LC-MS/MS dos peptídeos tripticos gerados após a digestão das proteínas.***

Para análise dos peptídeos tripticos gerados após a digestão das proteínas, foi utilizado o mesmo sistema e com condições idênticas às de LC-MS de proteínas não digeridas, exceto que o  $\text{H}_2\text{O/MeCN}$  97:3 a 30:70% (0,1% (v/v) de ácido fórmico gradiente) foi feito durante 60 min. Após LC-MS/MS, arquivos RAW corre dados foram processados utilizando ProteinLynx Global Server versão 2.2 (Waters) e analisados utilizando o motor de busca versão 2,2 MASCOT (Matrix Science Ltd.) e ByOnic.

### ***3.1.6 Quantificação Label-Free da Cinética de Oxidação***

Visando quantificar as taxas de oxidação pelo método *label-free*, 10  $\mu\text{L}$  de Mioglobina e Citocromo C de coração de cavalo (Sigma) em tampão fosfato 50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 7,0 foram irradiados, utilizando lâmpada de Hg como fonte de irradiação, pelos seguintes intervalos de tempo (em triplicata): 4, 10, 30 e 60 s. Após isso, adicionou-se metionina em concentração final de 120  $\text{mmol L}^{-1}$  e tripsina (1:50 m/m) e a digestão enzimática foi conduzida por 16 h a 37° C. Os

peptídeos resultantes foram injetados no equipamento Q-ToF Synapt HDMS (Waters Co.) acoplado *online* ao cromatógrafo nanoAcquity UPLC (Waters Co.). 3  $\mu\text{L}$  de amostra foi injetada e os peptídeos foram dessalinizados na coluna *trap* Symmetry C18 (Waters Co.) por 5 min. Após esse período, os peptídeos foram direcionados para a coluna BEH130 C18 (Waters Co.), onde foi feito um gradiente (60 min) de água/0.1% (v/v) ácido fórmico (Sol. A) e ACN/0.1% (v/v) ácido fórmico (Sol.B), fluxo de  $1.0 \mu\text{L min}^{-1}$ , com o seguinte perfil: 90%  $\rightarrow$  70% A de 0 a 35 min; 70%  $\rightarrow$  50% de 35 a 45 min; 50% até 50 min; 50%  $\rightarrow$  90% de 50 a 55 min. Primeiramente, realizou-se uma análise de LC-MS/MS, com o objetivo de identificar os peptídeos gerados pela digestão da proteína. Para isso, foi realizada uma análise do tipo DDA (*Data Dependent Analysis*), onde a cada segundo o equipamento adquire um espectro de MS. No caso da presença de espécies multicarregadas, as 3 mais intensas são fragmentadas na câmara de colisão (energia de colisão definida pela *m/z* e carga do precursor). Os dados foram posteriormente processados no *software* ProteinLynx (Waters Co.) e a busca no banco de dados foi realizada no programa Mascot (Matrix Science), com os seguintes parâmetros: Swissprot (banco de dados), 0.1 Da (erro nos modos MS e MS/MS), trypina (protease), permitindo peptídeos com 1 sítio de clivagem não-digerido e oxidação de metionina (modificação variável).

Uma vez que os peptídeos gerados pela digestão foram identificados, as triplicatas das amostras com diferentes tempos de irradiação foram submetidas as análises de LC-MS para quantificação, utilizando-se o mesmo gradiente descrito anteriormente. Após as corridas, extraiu-se a corrente iônica para cada um dos peptídeos identificados anteriormente e a área do pico cromatográfico correspondente foi integrada no programa MassLynx (Waters Co.). Os valores das áreas dos picos cromatográficos foram utilizados para construir uma curva de intensidade do peptídeo em função do tempo, da qual foi extraída a constante de velocidade de oxidação para cada um dos peptídeos.

Para a determinação dos sítios de oxidação foi utilizado dois diferentes softwares. O primeiro, ByOnic (PARC – Palo Alto Research Center), foi desenvolvido por Bern et, al.<sup>157</sup> sendo gentilmente cedido mediante comunicações

peçoais. O outro, MASCOT (Matrix Science – UK) é distribuído comercialmente sendo adquirido pelo laboratório para seu uso. Para o MASCOT, as modificações correspondentes a oxidação de aminoácidos (+16 Da, +14 Da, -22 Da, etc) foram criadas e selecionadas como tipos de modificações variáveis. ByOnic é o software especialmente concebido para lidar com o grande número de modificações de aminoácidos associados a oxidação por radical hidroxila. Ele combina o sequenciamento *de novo* e pesquisa de dados para coincidir com o peptídeo fragmentos de uma seqüência fornecida pelo usuário.<sup>157</sup> Também inclui três características não encontradas na maioria dos programas de pesquisa de banco de dados que o tornam especialmente adequado para identificar múltiplas modificações em peptídeos. Primeiro, ele recalibra o espectro obtido (*m/z*) com base em medições de picos bem identificados de uma passagem inicial através dos dados. Em segundo lugar, para melhorar a eficiência, cada tipo de modificação tem um limite definido pelo usuário sobre o número de ocorrências por peptídeos, e, terceiro, os resultados são verificados duas vezes com uma função conhecida como "*wild-card*"; este tipo de pesquisa permite que qualquer tipo alteração seja procurada, dentro dos limites de massa estabelecidos pelo usuário, para qualquer resíduo em cada peptídeo identificado.<sup>157</sup> O "*wild-card*" pode ser ativado junto com qualquer outro conjunto de modificações, e muitas vezes encontra artefatos químicos imprevistos como sodiação, alquilação, carbamidometilação do N-terminal<sup>157</sup>. Em experimentos de *footprinting*, o programa procura por cerca de 50 modificações de oxidação diferentes. Em ambos os programas as buscas foram realizadas no banco de dados SwissProt considerando 0.1 Da (erro nos modos MS e MS/MS), tripsina (protease), permitindo peptídeos com 1 sítio de clivagem não-digerido e oxidação de metionina (modificação variável).

## 3.2 Ligação Cruzada (*cross-linking*)

### 3.2.1 Estudo da reatividade do agente de ligação cruzada (DSS) frente a diferentes aminoácidos nucleofílicos

Para o estudo da reatividade do agente de ligação cruzada (DSS) frente às diferentes cadeias laterais dos aminoácidos nucleofílicos, foram sintetizados (Proteimax, SP) 5 peptídeos específicos apresentando as seguintes sequências: P1) Ac-RAKGAEFAVKAGVR, P2) Ac-ARAKGAEFAVYAGVR, P3) Ac-ARAKGAEFAVCAGVR P4) Ac-ARAKGAEFAVHAGVR e P5) Ac-ARAKGAEFAVSAGVR. A sequência dos peptídeos foi mantida sempre a mesma, buscando apenas modificar o resíduo nucleofílico entre eles. O N-terminal de cada peptídeo foi acetilado, para que o grupo  $-NH_2$  do N-terminal não reagisse com o ALC utilizado (DSS).

Para os ensaios de reatividade foram utilizadas concentrações de peptídeos de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  em soluções fosfato de sódio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  em 9 diferentes valores de pH: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0. Nas soluções de peptídeos foi adicionado o reagente de ligação cruzada (DSS - suberato de disuccinimidila) num excesso molar de 50x em relação à concentração de peptídeo. Essas amostras foram incubadas à temperatura ambiente por cerca de 2 h e a reação foi finalizada adicionando-se solução tampão Tris-HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,2 (concentração final de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Essa reação foi, então, novamente incubada por 15 min. Após a reação as amostras foram percoladas por cartuchos de SPE OASIS HLB (Waters, Milford, MA, USA) para eliminar resíduos de DSS bem com de Tris-HCl.

### 3.2.2 *Análise dos produtos formados da reação entre agente de ligação cruzada DSS e peptídeos*

As análises foram realizadas por MALDI-MS, e as amostras foram ressuspensas em 1 mL de solução aquosa contendo 50% ACN e 0.1% (v/v) (v/v) TFA. A amostra foi preparada pelo método *dried droplet*, utilizando-se como matriz a  $\alpha$ -ciano-4-hidróxi-cinâmico (10 mg mL<sup>-1</sup>, na mesma solução do peptídeo). Os espectros foram adquiridos no equipamento Q-Tof Premier (Waters Co.), que opera com um laser de estado sólido de 200 Hz. Os parâmetros de análise foram 250 a.u. (energia do laser), 10 V (sample plate) e 2200 V (MCP).

### 3.2.3 *Estudo da reatividade do agente de ligação cruzada DSS utilizando a proteína Thimet oligopeptidase (EC3.4.24.15; EP24.15)*

Após a reação, a proteína foi submetida à digestão com tripsina (razão tripsina/peptídeo 1:50 em massa) em tampão bicarbonato de amônio 100 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,0 e a digestão enzimática foi conduzida por 16 horas a 37° C. Os peptídeos resultantes foram injetados no equipamento Synapt HDMS Q-Tof (Waters Co.) acoplado on-line ao cromatógrafo nanoAcquity UPLC (Waters Co.). 1  $\mu$ L de amostra foi injetado e os peptídeos foram dessalinizados na coluna Symmetry C18 (Waters Co.) por 5 min. Após esse período, os peptídeos foram direcionados para a coluna BEH130 C18 (Waters Co.), onde foi feito um gradiente (60 min) de água/0.1% (v/v) ácido fórmico (Sol. A) e ACN/0.1% (v/v) ácido fórmico (Sol.B), fluxo de 1.0  $\mu$ L min<sup>-1</sup>, com o seguinte perfil: 90%  $\rightarrow$  70% A de 0 a 35 min; 70%  $\rightarrow$  50% de 35 a 45 min; 50% até 50 min; 50%  $\rightarrow$  90% de 50 a 55 min.

Os espectros de massa (.raw) foram processados utilizando o programa Proteinlynx (Waters Co.), onde foi feita a deconvolução, desisotopização e correção dos sinais utilizando o ácido fosfórico como referência. Os espectros corrigidos foram salvos no formato .pkl. Esses arquivos foram carregados no programa

Mascot (Matrix Science) para a confirmação da identidade da proteína e determinação da sequência primária utilizando o banco de dados MSDB.

### *3.2.4 Cinética de reação e de hidrólise do agente de ligação cruzada (DSS) em soluções com diferentes valores de pH.*

Para estudo da cinética de reação com o agente de ligação cruzada (DSS), uma solução de mioglobina  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi preparada em solução fosfato de sódio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  em 3 diferentes valores de pH: 5,5, 7,0 e 8,5. A essa solução foi adicionado um excesso de 10X do ALC em relação a proteína. O tempo total de reação foi de 120 min, sendo que a cada 5 min uma alíquota de  $3 \mu\text{L}$  da reação era retirada e diluída em  $30 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  para análise. Para cessar a reação na alíquota retirada era adicionada à solução ácido fórmico (concentrado) para que o valor de pH da solução ficasse perto de 2,0. As amostras foram analisadas utilizando um equipamento nanoAcquity Waters UPLC conectado a um espectrômetro de massa Waters SYNAPT HDMS (geometria Q-TOF). O sistema UPLC foi equipado com uma coluna de dessanilização (*trap*) Waters Symmetry C18 ( $20 \text{ mm} \times 180 \text{ id } \mu\text{m}$ ;  $5 \mu\text{m}$  de tamanho de partícula), seguido por uma coluna analítica C18 Waters BEH130 ( $100 \text{ mm} \times 100 \text{ id } \mu\text{m}$ ;  $1,7 \mu\text{m}$  de tamanho de partícula). As amostras injetadas foram dessanilizadas na coluna *trap* por 3 min, com fluxo de  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  de 97:3  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, em seguida, a eluição da proteína da coluna *trap* foi realizada direcionando da mesma para a coluna analítica BEH130 C18 (Waters) utilizando fluxo de  $1,0 \mu\text{L min}^{-1}$  com gradiente de 97:3 para 30:70%  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ , com 0,1% (v/v) de ácido fórmico para um tempo total de análise de 15 min. Os dados espectrais foram processados por deconvolução com o algoritmo (MaxEnt1) fornecido pelo software MassLynx v.4.1 que acompanha o equipamento e as espécies geradas identificadas manualmente.

Já para os estudos de hidrólise, uma solução de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de suberato de disuccinimidila (DSS) foi preparada. Devido a baixa solubilidade do DSS,

primeiramente era adicionado 250  $\mu\text{L}$  de DMF para solubilização do ALC sendo o volume aferido a 2 mL utilizando tampão fosfato de sódio 50  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os valores de pHs das soluções tampão utilizadas para este estudo da cinética de hidrólise foram as seguintes: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0. Para a análise da cinética de hidrólise foi utilizado um espectrofotômetro UV-visível Agilent 8453 monitorando o comprimento de onda de 280 nm, sendo esta absorbância medida devido à perda do grupo reativo do ALC.

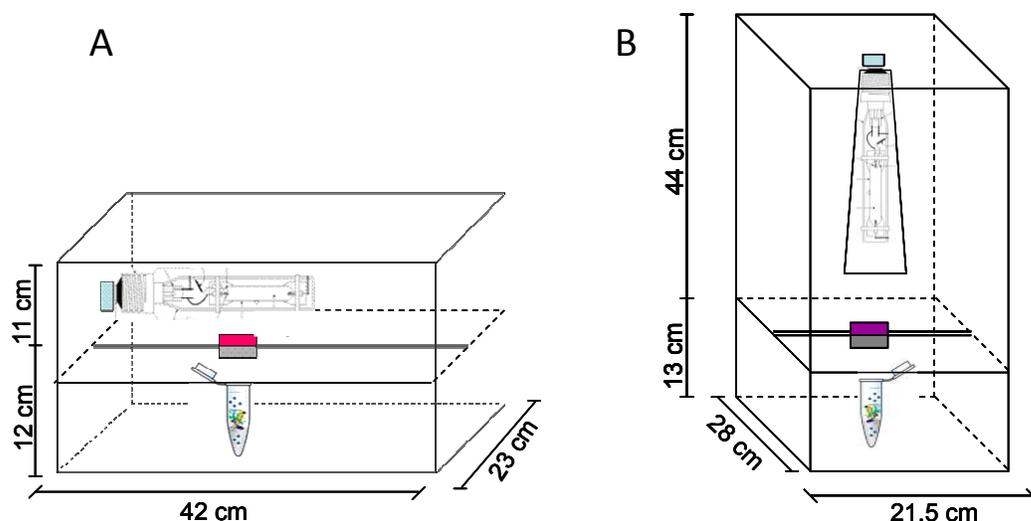
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento de sistema alternativo de fotólise utilizando lâmpada de Hg como fonte de radiação.

Experimentos anteriores empregando radiação UV utilizando lâmpadas de Hg<sup>103,104</sup> para fotólise de peróxido de hidrogênio mostravam render um alto nível de oxidação em proteínas. Um dos grandes problemas era o alto tempo de irradiação necessário para formação dos produtos de oxidação em quantidades apreciáveis (~10 min) e a elevada concentração de peróxido de hidrogênio (15%). Isso era devido, principalmente, a baixa potência da fonte de radiação utilizada (75 W)<sup>103</sup> e a distância entre a fonte e a amostra. O alto tempo de irradiação somado com altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem, em princípio, levar a modificações estruturais na proteína, resultando em um mapeamento errôneo em relação aos aminoácidos expostos ao solvente e a determinação de sítios de interação no caso de estudos de complexos protéicos.

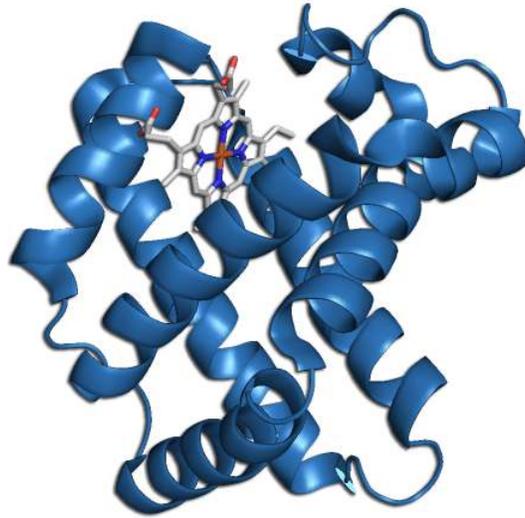
Sendo assim, para geração dos radicais hidroxilas a partir da fotólise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em um menor espaço de tempo e utilizando menor concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram desenvolvidas duas fontes alternativas de radiação UV empregando lâmpadas de mercúrio (Hg) de alta pressão de 250 W ou 400 W (PHilips HPL-N), com duas geometrias diferentes. Para o sistema, dois dispositivos foram construídos, como mostrados na Figura 13. Os dispositivos contêm dois compartimentos: no compartimento superior foi colocada uma lâmpada de Hg de 250 W no sistema A (Figura 13 A) e uma lâmpada de Hg de 400 W no sistema B (Figura 13 B), sendo que o vidro de recobrimento do bulbo foi retirado para permitir a passagem da radiação UV pelo sistema. Entre os dois compartimentos foi feita uma fenda (4 x 4 cm) para passagem da radiação, sendo que na parte inferior foi colocado *um* shutter (22-8411 Ealing Electronic Shutter, Ilex Optical) para permitir medidas em tempos de exposição abaixo de 1 s. Para a realização dos experimentos, a solução de mioglobina (100 µL) era colocada em um

microtubo que era alinhado horizontalmente com o centro da lâmpada, e mantido verticalmente à uma distância de 12 cm da lâmpada UV no sistema A, e a 21 no sistema B.



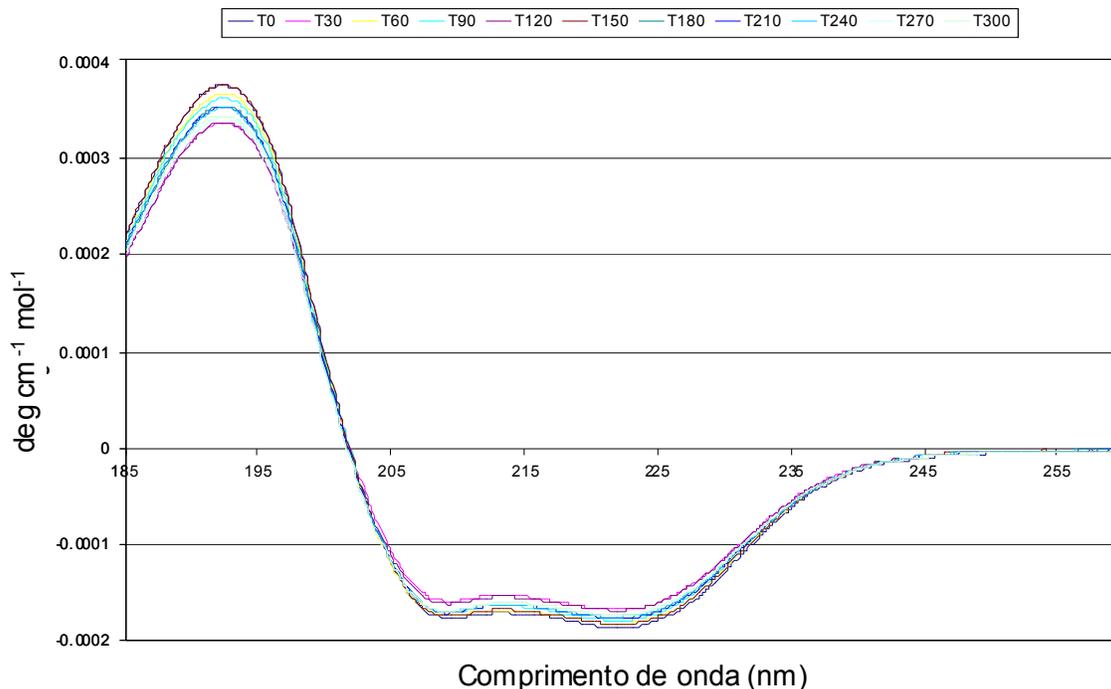
**Figura 13.** Representação esquemática dos sistemas desenvolvidos para utilização da lâmpada de Hg para os experimentos de *footprinting*. (A) lâmpada de 250 W, (B) lâmpada de 400 W.

Para determinar as condições e os parâmetros de operação ótimos para futuros experimentos de *footprinting*, diferentes tipos de experimentos foram realizados para caracterizar os sistemas desenvolvidos. A Mioglobina foi escolhida como proteína modelo para todos os experimentos de desenvolvimento do sistema. Esta escolha foi baseada no fato de que esta proteína tem as estruturas secundárias e terciárias bem definidas (Figura 14), além de ter sido frequentemente alvo de estudos de *footprinting*<sup>106,158</sup>.



**Figura 14.** Estrutura da Mioglobina. (8  $\alpha$ -hélices)

O objetivo do primeiro experimento era de determinar se a incidência da radiação UV proveniente da lâmpada Hg na solução contendo a proteína poderia causar qualquer alteração na sua estrutura. Assim, as amostras de mioglobina ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram submetidas a diferentes tempos de exposição à radiação que variaram de 30 a 300 s. Após a irradiação, foram realizadas medidas de dicroísmo circular, mostrando que nenhuma mudança estrutural observável na estrutura secundária ocorre em decorrência da irradiação (Figura 15).

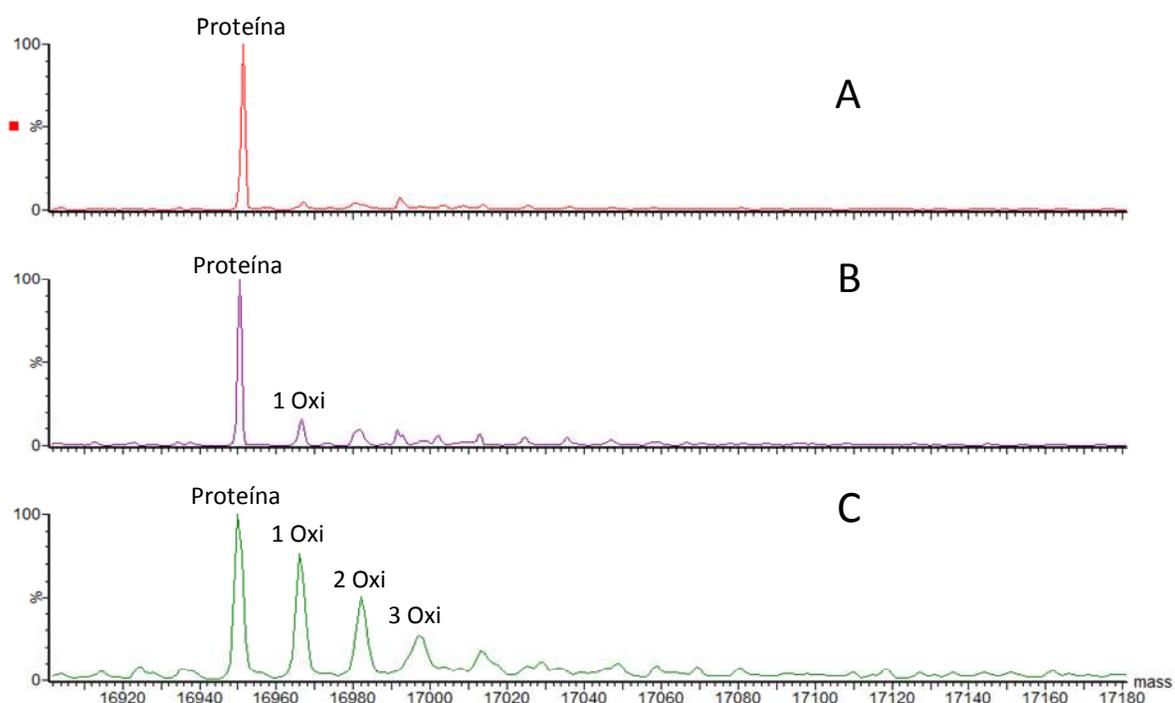


**Figura 15.** Espectro de Dicroísmo Circular de Mioglobina (concentração de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão  $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0). ( $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $\sim 208 - 210 \text{ nm}$ ), paralela ao eixo da hélice, fraca;  $n \rightarrow \pi^*$  ( $\sim 222 \text{ nm}$ ), paralela ao eixo da hélice).

Em experimentos onde a solução de mioglobina foi submetida à irradiação na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1% (v/v) (v/v),  $\sim 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) por tempos superiores a 120 s de oxidação, foi possível observar que o espectro de CD era visivelmente diferente, com quase um terço da estrutura helicoidal convertido para *random coil*. Assim, propomos que tempos de irradiação superiores a 120 s na presença de peróxido de hidrogênio não deveriam ser utilizadas para realização de experimentos de *footprinting*.

Para determinação da concentração ideal de peróxido de hidrogênio a ser utilizada nos experimentos de *footprinting* utilizando a lâmpada de Hg, foram realizados ensaios com concentrações de peróxido de hidrogênio de 0.05, 0.2 e 1.0% (v/v) em um tempo fixo de exposição de 30 s. Logo após a irradiação, foi adicionada solução de metionina até uma concentração final de  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  para

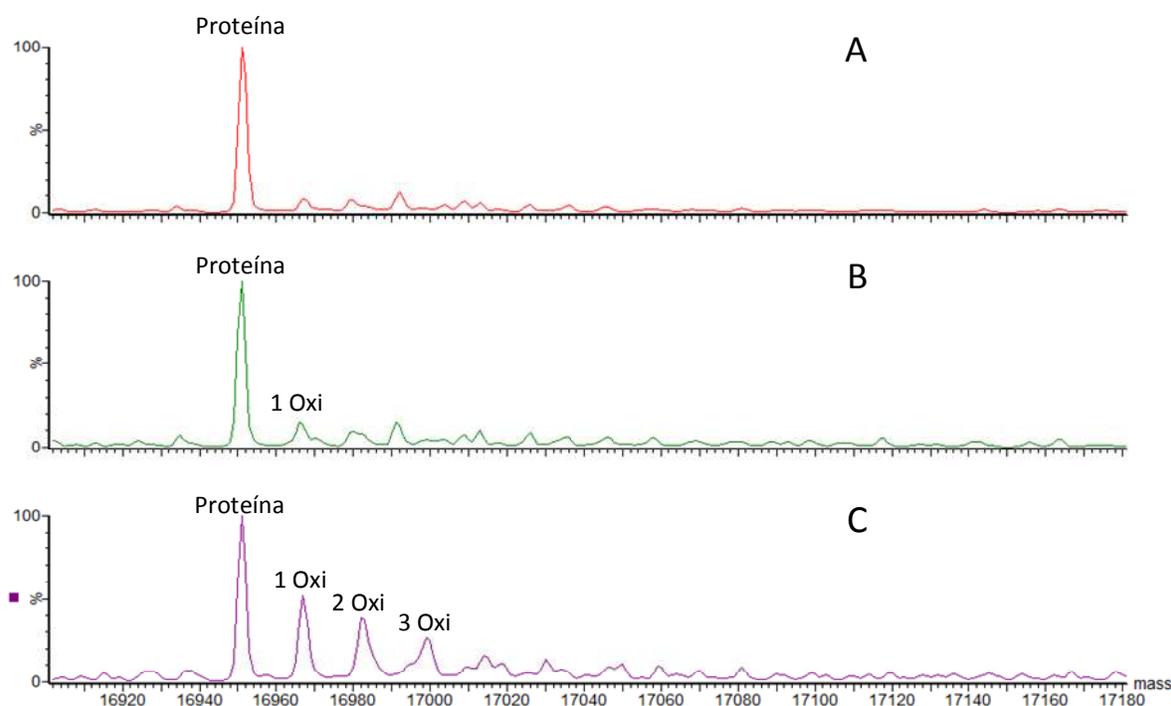
eliminar o excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As amostras foram diluídas e as proteínas intactas foram analisadas por LC-MS (Figura 16). O resultado mostrou que a adição de 1% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fornece os melhores resultados, mostrando uma quantidade de oxidação mais conveniente para as análises de cinética. Sendo assim, os ensaios subsequentes utilizando a lâmpada de Hg foram realizados com uma concentração de 1% (v/v) de peróxido de hidrogênio.



**Figura 16.** Quantidade de oxidação da Mioglobina utilizando diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. (A) 0,05%; (B) 0,2%; (C) 1,0%. (1 Oxi = 1 oxidação; 2 Oxi = 2 oxidações, 3 Oxi = 3 oxidações)

Após definir a concentração ideal de peróxido de hidrogênio para os experimentos de *footprinting* com lâmpada de Hg, foi avaliado o grau de oxidação da proteína pela adição de peróxido de hidrogênio, mas sem incidência de luz UV. Assim, foi feito um estudo comparativo entre três condições: i) Mioglobina  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; ii) Mioglobina  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  incubada com 1% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 s; e iii)

Mioglobina  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  com 1% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  após 30 s de irradiação UV (Figura 17).

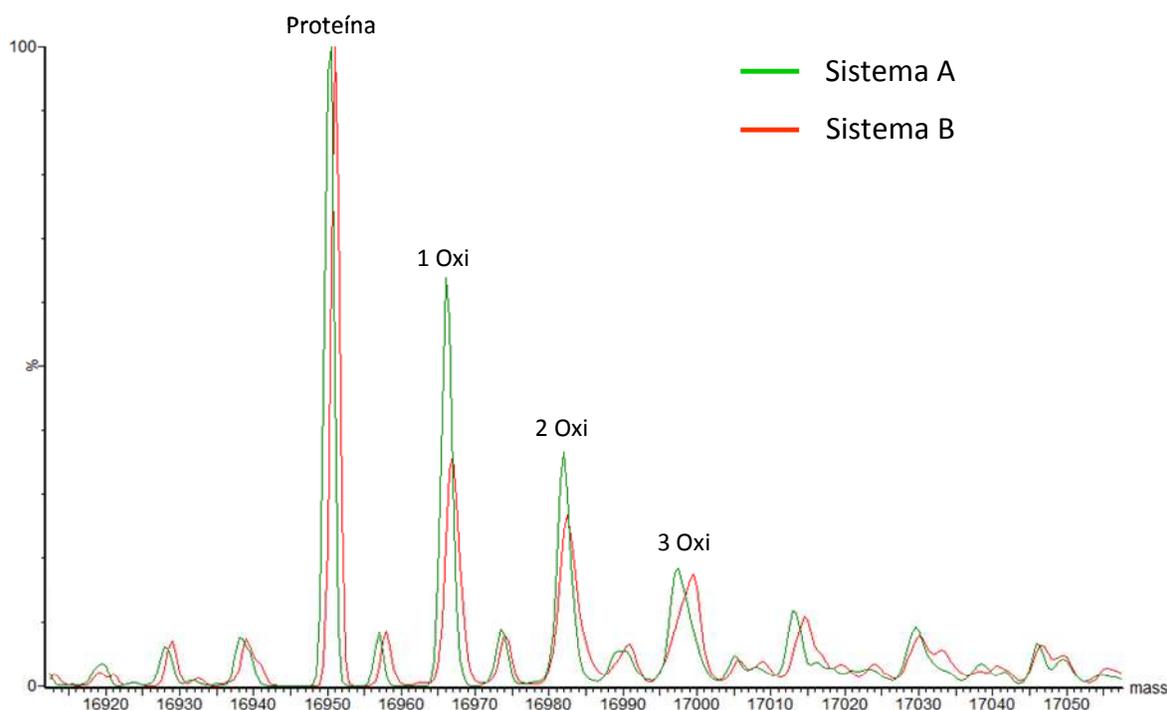


**Figura 17.** Quantidade de oxidação da Mioglobina utilizando diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. (A) Mioglobina  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Mioglobina  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  incubada com 1% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 s; (C) Mioglobina  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  com 1% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  após 30 s de irradiação (1 Oxi = 1 oxidação; 2 Oxi = 2 oxidações, 3 Oxi = 3 oxidações).

Como pode ser observado na Figura 17, mesmo a proteína incubada com 1% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 s, o nível de oxidação é consideravelmente menor, mostrando a eficiência do sistema utilizado. A oxidação observada na amostra que foi incubada somente com  $\text{H}_2\text{O}_2$  sem irradiação provavelmente se deve a presença do aminoácido metionina na sequência da Mioglobina, facilmente oxidado pela presença do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em solução.

Após a determinação da concentração ideal de peróxido de hidrogênio a ser utilizada no experimento, a eficiência dos dois sistemas desenvolvidos utilizando a lâmpada de Hg como fontes de radiação UV foram avaliadas. Uma solução de

mioglobina  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  contendo 1% (v/v) de peróxido de hidrogênio foi submetida a 30 segundos de irradiação em cada sistema. Após a irradiação, L-metionina ( $60 \text{mmol L}^{-1}$ ) foi adicionada, após extração com cartuchos Oasis HLB com descrito na seção 3.2.1. A Figura 18 mostra espectros comparativos obtidos a partir das oxidações em cada sistema. No sistema A, em que a lâmpada está em posição horizontal e mais próxima da amostra, apresentou melhores resultados quando comparado ao sistema B. Este resultado é possivelmente uma melhor utilização da irradiação incidente proveniente da lâmpada e uma menor distância entre a luz e amostra.



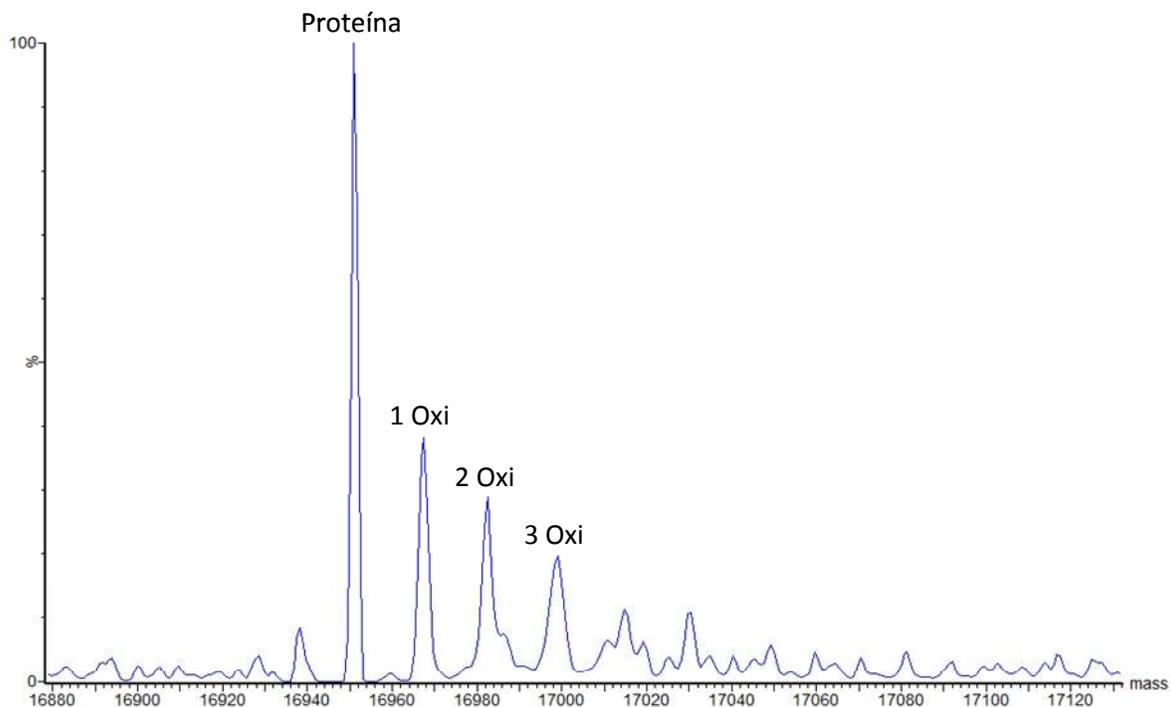
**Figura 18.** Teste de eficiência dos sistemas desenvolvidos empregando a lâmpada de Hg com fonte de radiação.

A partir dos resultados obtidos, o Sistema A foi utilizado para os estudos subsequentes de acessibilidade do solvente aos resíduos de aminoácidos da mioglobina através da oxidação fotoquímica. Para tais experimentos a

concentração de proteína foi mantida em  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  e a de peróxido de hidrogênio em 1% (v/v). Sempre após a irradiação, foi adicionada a solução de L-metionina para uma concentração final de  $120 \text{mmol L}^{-1}$  com posterior passagem das amostras em cartuchos OASIS HLB.

## **4.2 Experimentos de footprinting empregando o sistema alternativo de fotólise (lâmpada de Hg)**

Soluções de mioglobina  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  contendo 1% (v/v) de peróxido de hidrogênio foram irradiadas variando o tempo de exposição da radiação de 4-60 s para geração dos radicais hidroxila e dos produtos de oxidação. A quantidade de oxidação foi determinada analisando a mioglobina intacta por LC-MS. Foi observado que a quantidade de oxidação aumenta linearmente com o tempo de irradiação utilizando o sistema desenvolvido. Para realização do experimento para determinação dos sítios acessíveis ao solvente, a solução de mioglobina foi submetida a um tempo de irradiação de 30 s. O espectro deconvoluído da proteína para determinação do número de oxidações obtidas pode ser observado na Figura 19.

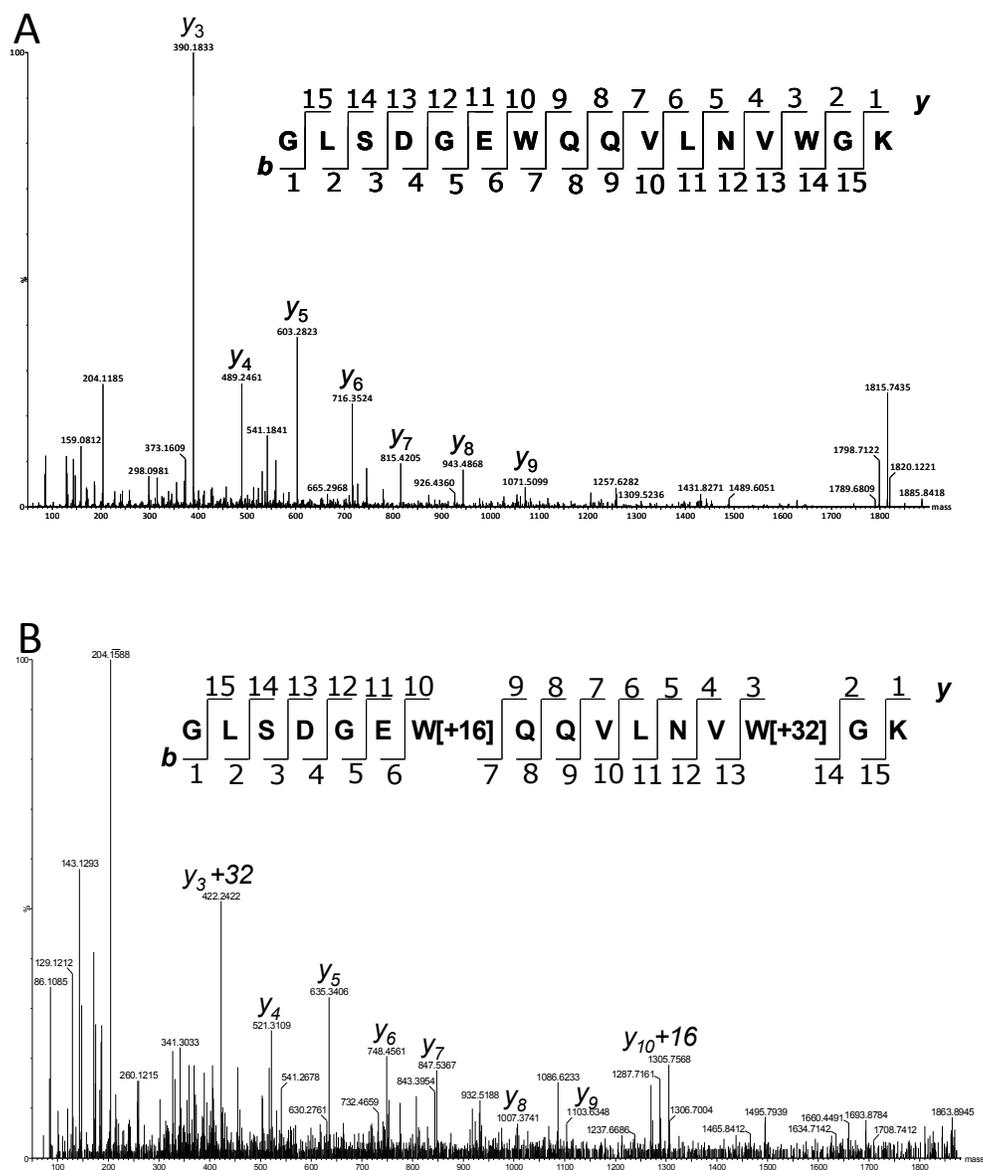


**Figura 19.** Espectro de LC-MS deconvoluido da mioglobina, após irradiação por 30 s com 1,0% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Após o experimento de *footprinting*, a amostra de mioglobina foi digerida, utilizando tripsina e os peptídeos obtidos analisados por LC-MS/MS para identificação dos sítios de oxidação.

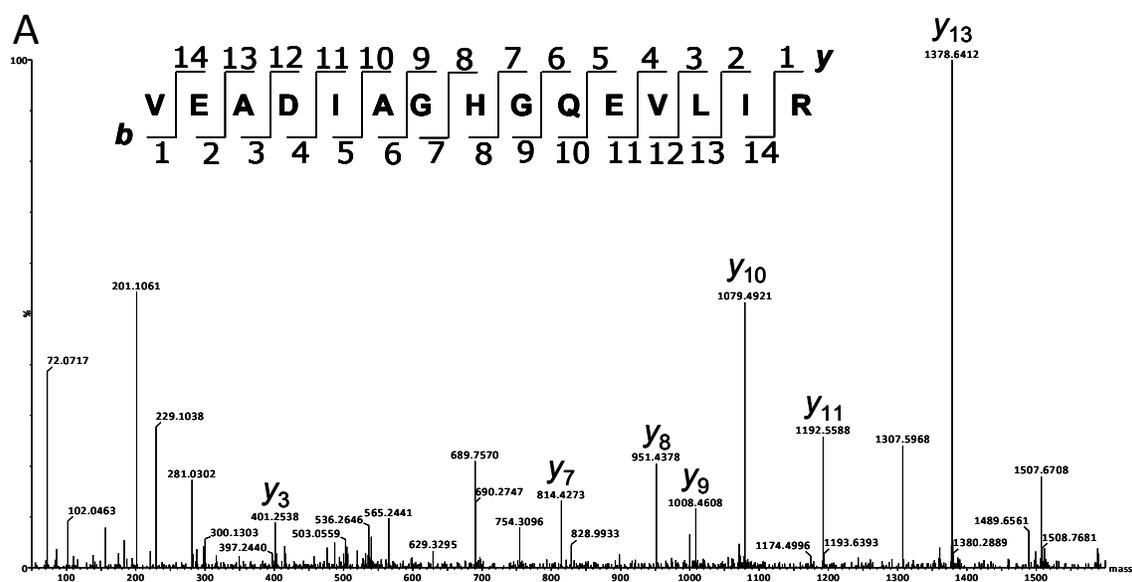
A fim de se determinar a superfície acessível ao solvente, a solução de mioglobina 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , após ser irradiada por 30 s na presença de 1% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e adição de metionina (60  $\text{mmol L}^{-1}$ ) foi submetida ao procedimento de SPE para remoção do excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e metionina. Após o processo de *clean up* da amostra, a proteína foi digerida utilizando tripsina. Após a digestão, a mistura de peptídeos obtidas da mioglobina oxidada foi diluída 20 vezes e 2  $\mu\text{L}$  da solução diluída foi submetida a análise por LC-MS/MS para identificação dos sítios de oxidação. A Figura 20 mostra o espectro de MS/MS para o peptídeo GLSDGEWQQVLNVWGK não-oxidado (Figura 20A) e oxidado (Figura 20B) da mioglobina. Este peptídeo foi encontrado possuindo uma diferença de massa de +48 Da ( $m/z$  932.4 para o íon com duas cargas  $[M+2H]^{2+}$ ), quando comparado com

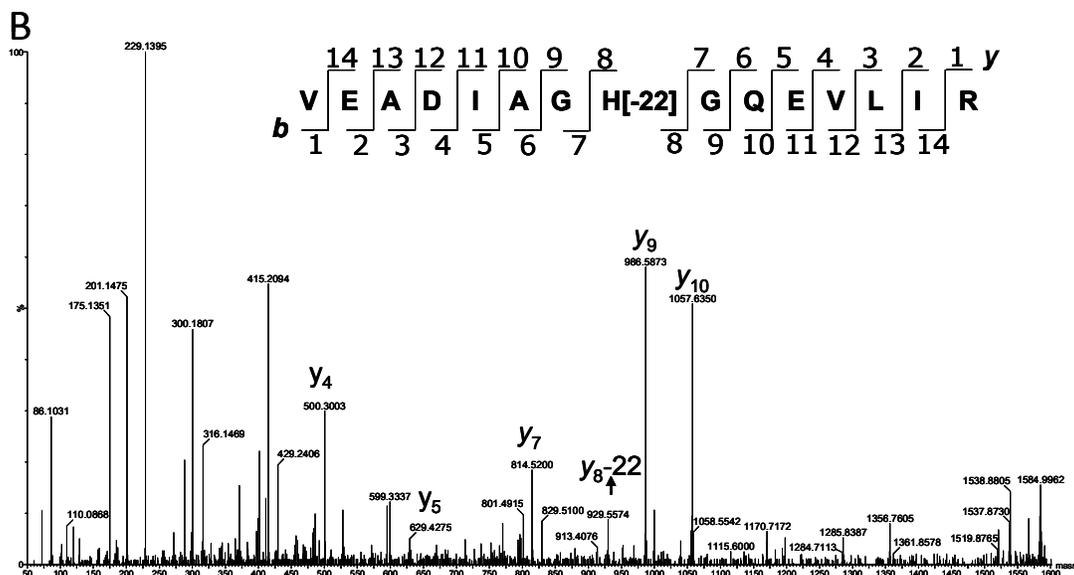
a espécie não oxidada do mesmo peptídeo ( $m/z$  908,5 para o íon com duas cargas  $[M+2H]^{2+}$ ).



**Figura 20.** Espectro de MS/MS do peptídeo da mioglobina. (A) não oxidado; (B) presença dos íons  $[y_3 + 32 \text{ Da}]$  e  $[y_{10}+16 \text{ Da}]$  identificam que os dois triptofanos do peptídeo foram oxidados.

Já a Figura 21 mostra o espectro de MS/MS para o peptídeo VEADIAGHGQEVILIR da mioglobina. Neste peptídeo é interessante notar que a espécie não oxidada (Figura 21A) aparece no espectro possuindo três cargas ( $[M+3H]^{3+}$ ) com íon possuindo  $m/z$  de 536.3. Entretanto, para a espécie oxidada (Figura 21B), o peptídeo é encontrado possuindo duas cargas ( $[M+2H]^{2+}$ ) e apresentando uma razão  $m/z$  de 793.0. Isso se deve, provavelmente, pelo fato que neste peptídeo o sítio de oxidação encontrado esta na histidina (-22 Da, Figura 21B). Como a histidina é um resíduo básico, sendo os resíduos básicos os responsáveis pela formação da espécie multicarregada devido a protonação desses resíduos, quando o mesmo é oxidado a carga não consegue se alocar neste aminoácido, fazendo com que a espécie oxidada apareça com 2 cargas e não 3 como no peptídeo não oxidado.





**Figura 21.** Espectro de MS/MS do peptídeo da mioglobina. (A) peptídeo não-oxidado; (B) peptídeo oxidado, presença do íon [ $y_8 - 22$  Da] como sítio de oxidação a histidina.

Após as análises por LC-MS/MS, a busca pelos sítios de oxidação nos peptídeos obtidos a partir da mioglobina oxidada foram realizados utilizando os softwares MASCOT e ByOnic. Para utilização do MASCOT, os possíveis produtos de oxidação para os resíduos de aminoácidos (+16 Da, +14 Da, -22 Da entre outros) foram adicionados ao software. O programa foi configurado para procurar por até 8 modificações simultaneamente. Já Para o ByOnic, como o software foi criado especialmente para análises de produtos de oxidação obtidos em experimentos de *footprinting* todas as 50 modificações possíveis já estão incluídas no programa. Durante o processo de busca pelas modificações, todas as modificações possíveis são utilizadas simultaneamente. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Sítios de oxidação e tipos de oxidação encontrados na mioglobina.

Aminoácido		Tipo Oxidação Observada	
Tipo	Posição	MASCOT	ByOnic
TRP	7	+16	+16
TRP	14	+32	+32
HIS	24	X	-22
ILE	21	X	+16
PHE	43	+16	+16
HIS	36	X	-22
PRO	88	+14	+14
PHE	151	+16	+16
HIS	119	-22	-22
PHE	123	+16	+48
MET	55	+16	+16
MET	131	+16	+16

X: nenhuma oxidação encontrada

Os dados apresentados na Tabela 3 mostram existir diferenças nos resultados obtidos no experimento de oxidação utilizando tanto o MSCOT como o ByOnic para identificação dos sítios de oxidação. Os resíduos de triptofano, metionina e fenilalanina foram encontrados modificados na sequência da proteína. Em trabalhos anteriores utilizando mioglobina como proteína modelo e um laser *excimer* KrF com fonte de radiação UV<sup>106</sup>, os autores relatam um conjunto de 15 resíduos de aminoácidos oxidados, incluindo Trp14, PHe151, His24, His119, demonstrando que nossos resultados são bastante semelhantes aos obtidos pelos autores<sup>106</sup>. Esses resultados demonstram que o sistema de irradiação UV

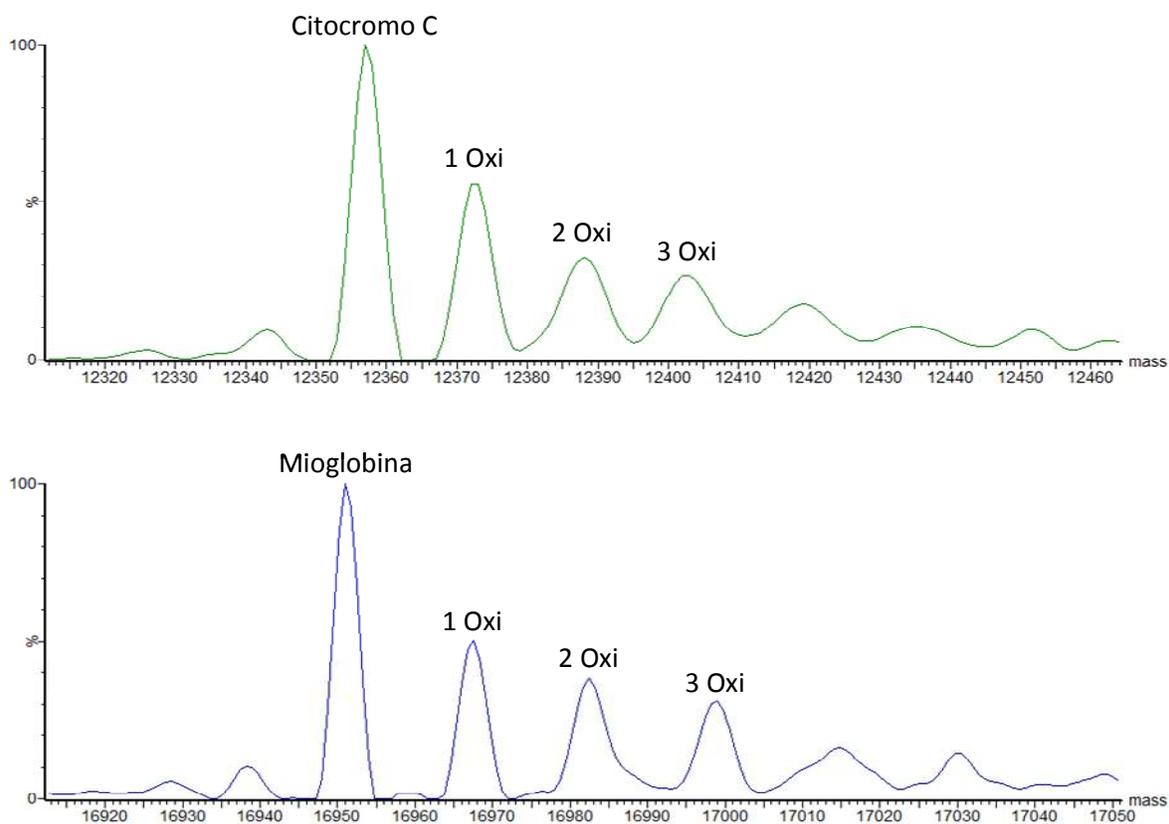
desenvolvido aqui é aplicável a experimentos de *footprinting* para mapeamento estrutural de proteínas. É importante salientar que após a identificação dos possíveis peptídeos contendo sítios de oxidação pelos softwares MASCOT e ByOnic, uma identificação manual era realizada para evitar a ocorrência de falsos positivos.

### **4.3 Desenvolvimento do método de quantificação para cinética de oxidação em experimentos de *footprinting*.**

#### ***4.3.1 Experimento de *footprinting* utilizando Mioglobina e Citocromo C***

Para o desenvolvimento do método de quantificação da cinética de oxidação, soluções de Mioglobina e Citocromo C de coração de cavalo contendo peróxido de hidrogênio foram irradiadas variando o tempo de exposição entre 4 e 90 s para geração dos radicais hidroxilas. Para os estudos de quantificação foram realizadas análises por LC-MS e LC-MS/MS dos peptídeos tripticos obtidos. Para realizar a quantificação da cinética de oxidação é necessário realizar corridas no modo LC-MS para obter um melhor formato do pico cromatográfico sendo isso em virtude do número de pontos adquiridos durante todo o tempo de eluição de um peptídeo (pico). Após, análises por LC-MS/MS são realizadas para identificação dos sítios de oxidação nas sequências dos peptídeos.

Na Figura 22, pode-se observar o número de oxidações formadas na Mioglobina e Citocromo C pela análise de LC-MS das proteínas intactas após 30 s de irradiação com 1% (v/v) de peróxido de hidrogênio.

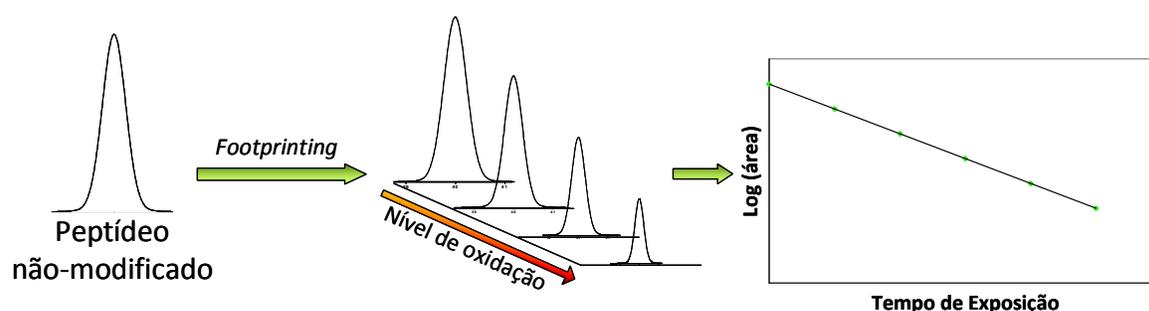


**Figura 22.** Espectro deconvolvido de LC-MS das proteínas após 30 s de irradiação com 1% (v/v)  $H_2O_2$ . (1 Oxi = 1 oxidação; 2 Oxi = 2 oxidações, 3 Oxi = 3 oxidações)

#### 4.3.1 Quantificação da cinética de oxidação pelo método *Label-free*.

Conforme descrito na seção 1.3.3, o método utilizado atualmente para o cálculo de cinética de oxidação de peptídeos em experimentos de *footprinting* pode subestimar tais taxas. Isso ocorre em virtude do fato de serem considerados como produtos de oxidação somente as espécies +14 e +16 Da. Com o objetivo de aumentar a confiabilidade nas taxas de oxidação obtidas nesse experimento, foi proposto um novo método de quantificação, conhecido como *label-free* (sem marcação isotópica).<sup>159,160,161</sup> Embora esse método tenha sido aplicado há muitos anos para moléculas pequenas, os primeiros exemplos com peptídeos datam de poucos anos, em virtude de dificuldades experimentais principalmente

relacionadas com a etapa cromatográfica. Nesse caso, ao invés de considerar somente algumas modificações específicas para realizar a quantificação, todas as modificações são consideradas, inclusive oxidações múltiplas do peptídeo e até mesmo eventuais modificações ainda não descritas na literatura. Experimentalmente, a quantificação é realizada calculando-se somente a área do pico cromatográfico referente ao peptídeo não-modificado. Com isso, mede-se o consumo do reagente e não a formação dos produtos (Figura 23).



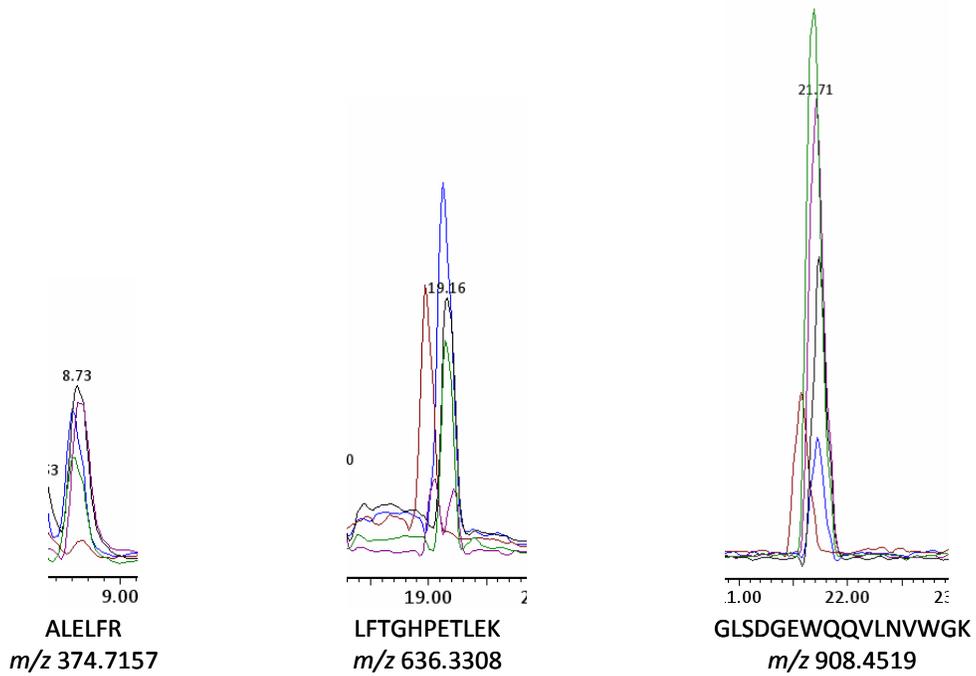
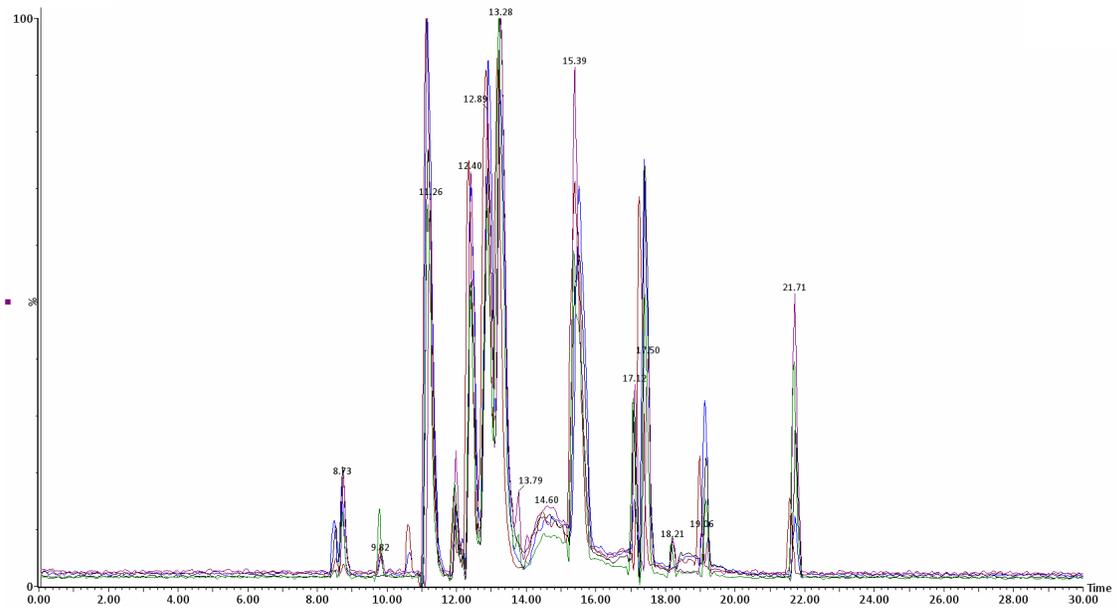
**Figura 23.** Representação do método proposto baseado em *label-free*. A intensidade do sinal do peptídeo não modificado decresce com o tempo de exposição. Os valores obtidos são então ajustados para uma reta de pseudo-primeira ordem.

Do ponto de vista experimental, além desse método considerar todas as possíveis modificações em um determinado peptídeo, ele é ainda mais simples de ser implementado, visto que para cada íon é necessária calcular a área de somente um pico cromatográfico e não mais três (peptídeo não-modificado e os produtos +14 e +16 Da). Além disso, existem softwares com a capacidade de automatizar todo esse processo, o que aumentaria significativamente a velocidade de análise.

A implementação do novo método baseado em *label-free* em análises de rotina passa pela necessidade de um sistema cromatográfico extremamente reprodutível, tanto em termos de qualidade e quantidade. Em geral, a análise quantitativa é realizada em experimentos LC-MS e não LC-MS/MS, isto é feito para a obtenção de um maior número de pontos do pico cromatográfico, que

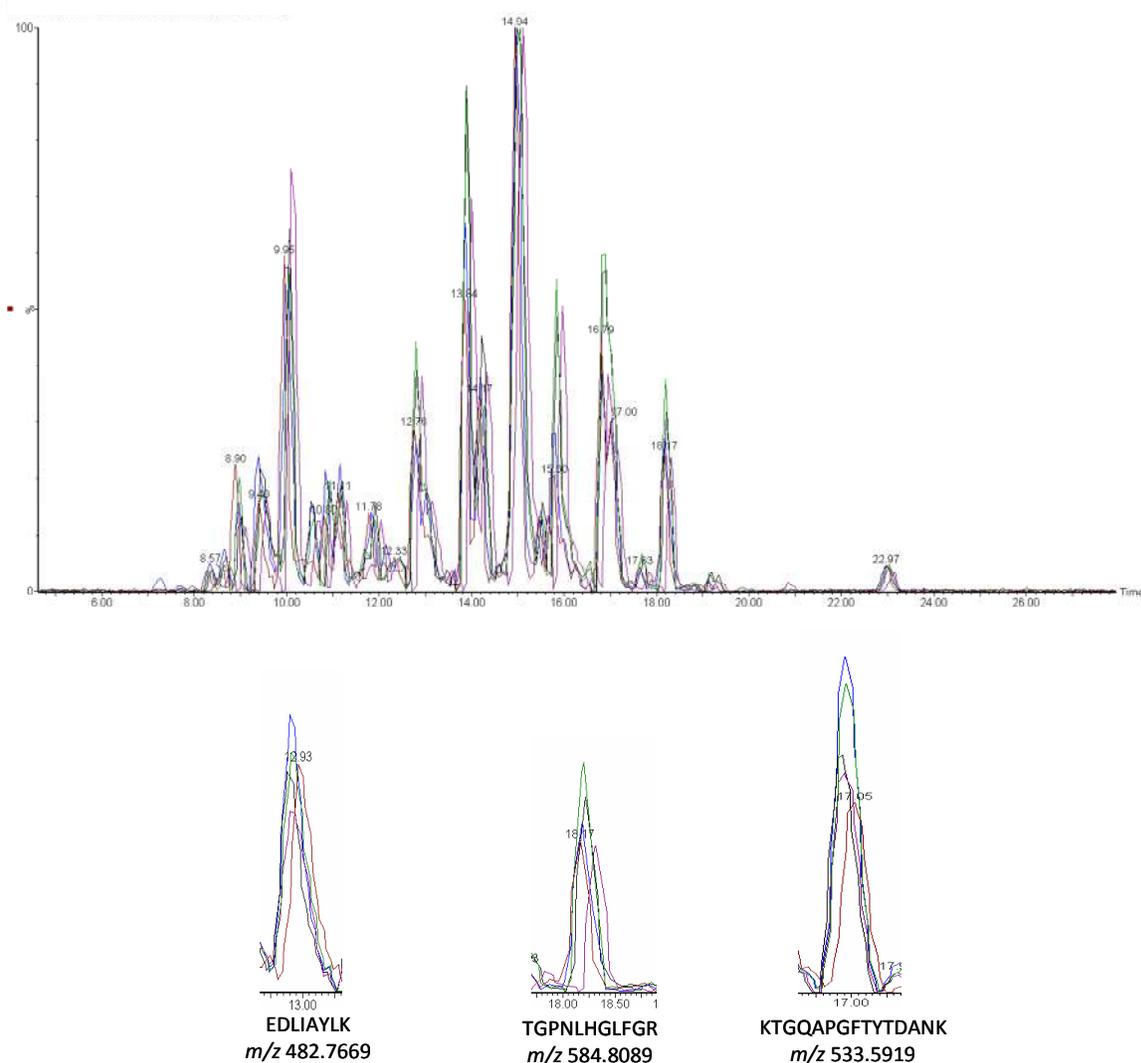
aumenta a exatidão das análises. Assim, a identidade dos peptídeos não está associada com o seu espectro de dissociação. Os únicos parâmetros que identificam uma espécie nestes ensaios são o tempo de retenção e a razão  $m/z$ . Além disso, do ponto de vista quantitativo, a análise realizada considerando-se os produtos +14 e +16 eram internamente normalizadas, ou seja, caso houvesse algum erro na injeção ou na própria separação cromatográfica, idealmente todas as espécies seriam afetadas proporcionalmente, o que permitia a normalização e, conseqüentemente, a eliminação desse erro; por outro lado, o método proposto não permite essa normalização, visto que somente uma espécie é quantificada.

Essa nova abordagem foi aplicada para as proteínas Mioglobina e Citocromo C após irradiação das amostras utilizando lâmpada de Hg. Na Figura 24, pode ser observado os 5 cromatogramas adquiridos por LC-MS da amostra de mioglobina exposta a diferentes tempos de exposição a radiação. É importante notar que a Figura 24 mostra a alta reprodutibilidade cromatográfica do sistema (tempo de retenção), combinada com uma alta resolução cromatográfica, que garante uma co-eluição mínima dos peptídeos, sendo isso altamente desejável quando se realiza uma análise quantitativa a fim de evitar a supressão iônica. Além disso, é possível observar pelas correntes iônicas extraídas para 3 diferentes peptídeos as diferentes cinéticas de oxidação: GLSDGEWQQVLNVWGK, LFTGHPETLEK e ALELFR, mostrando a diminuição da intensidade do sinal do peptídeo com o aumento do tempo de exposição.



**Figura 24.** Cromatogramas obtidos para mioglobina digerida após 4 intervalos de tempo de exposição a radiação UV e cromatograma de íons totais para 3 diferentes peptídeos da proteína (1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

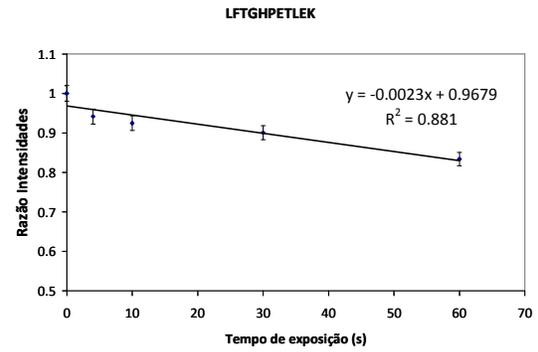
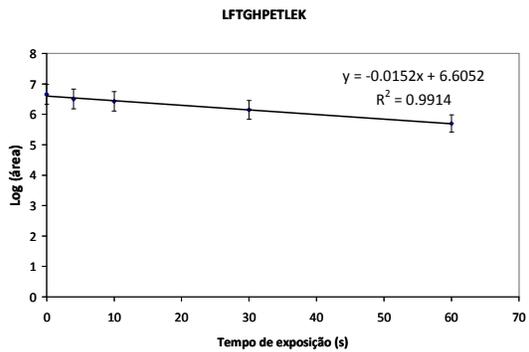
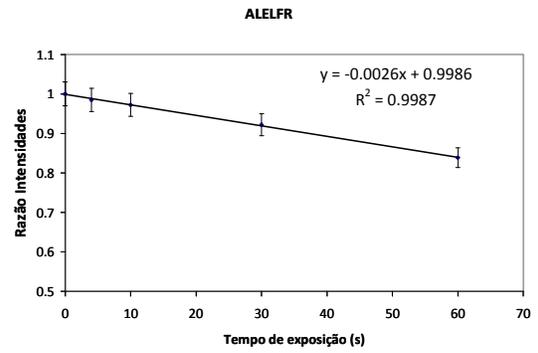
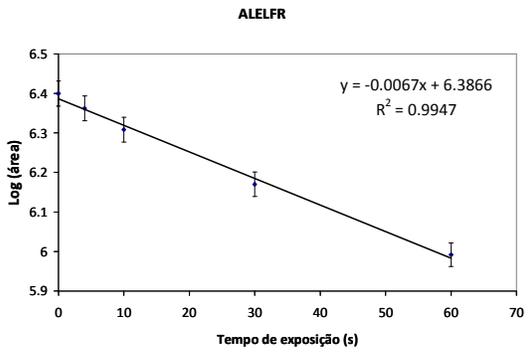
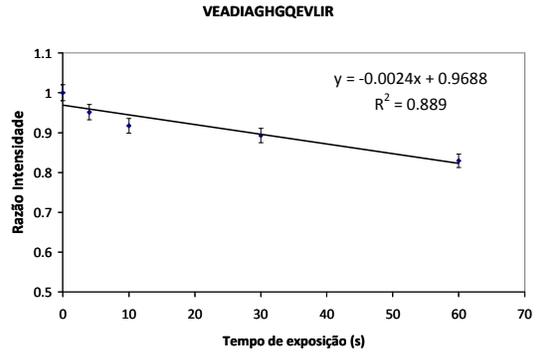
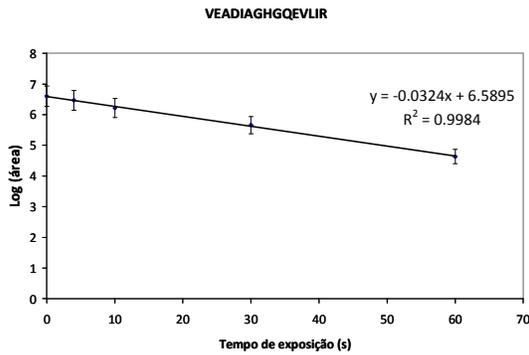
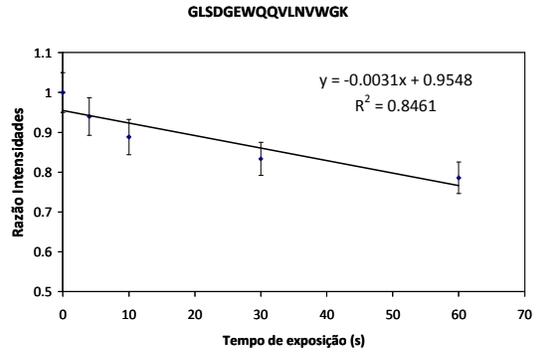
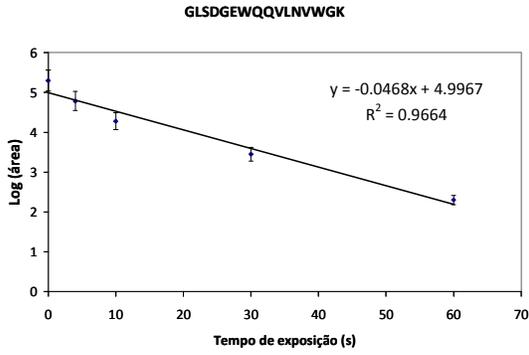
O mesmo ensaio foi realizado para Citocromo C (Figura 25), onde cromatogramas obtidos para os 4 diferentes tempos de exposição e as correntes de íons extraídos para 3 peptídeos diferentes para diferentes tipos de cinética de oxidação: EADLIAYLK, TGNLHGLFGR e KTGQAPGFTYTDANK.

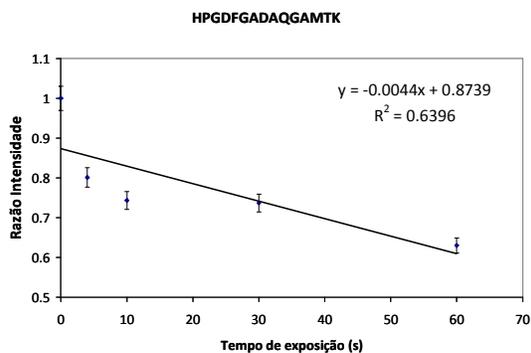
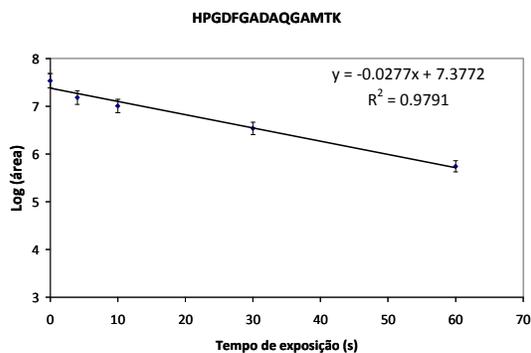


**Figura 25.** Cromatogramas obtidos para Citocromo C digerido após 4 intervalos de tempo de exposição a radiação UV e cromatograma de íons extraídos para 3 diferentes peptídeos da proteína. (1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

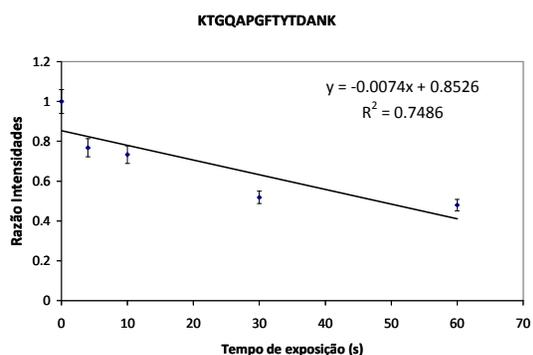
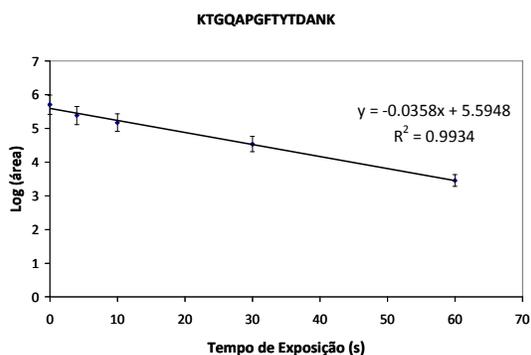
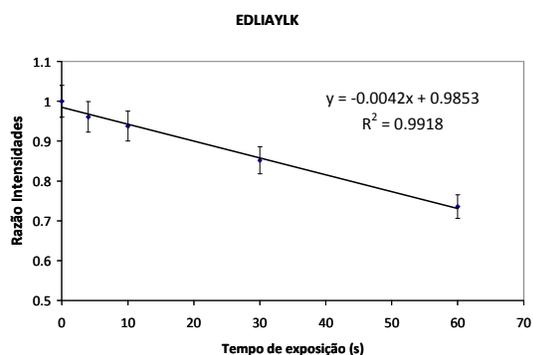
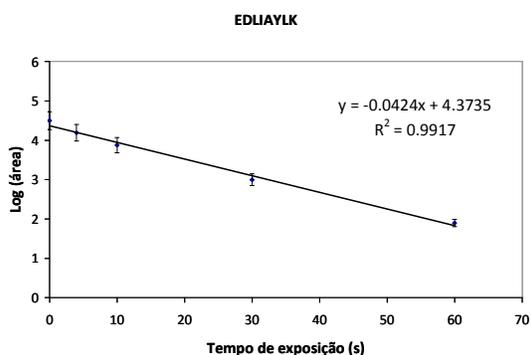
Conforme esperado, à medida que o tempo de exposição aumenta, a intensidade do peptídeo diminui. O cálculo da cinética de oxidação de cada peptídeo é feito considerando-se uma cinética de pseudo-primeira ordem, uma vez que a concentração de proteína é muito menor que a de radicais hidroxilas no meio e, portanto, é o fator limitante da reação. Com isso, temos que a taxa de decaimento do peptídeo não-modificado é dada pela equação  $dM/dt = -kM$ , onde  $M$  corresponde à concentração do peptídeo não-modificado,  $t$  ao tempo de exposição e  $k$  à constante de velocidade da reação. Integrando-se essa equação, obtemos  $M = e^{-kt}$ , e aplicando-se logaritmo nos dois lados dessa equação finalmente chegamos em  $\ln M = -kt$ . Construiu-se, então, uma reta onde o eixo  $y$  corresponde ao logaritmo de  $M$  (valor dado pela área do pico cromatográfico) e o eixo  $x$  à  $t$ . A cinética de oxidação é então obtida pelo coeficiente angular dessa reta.

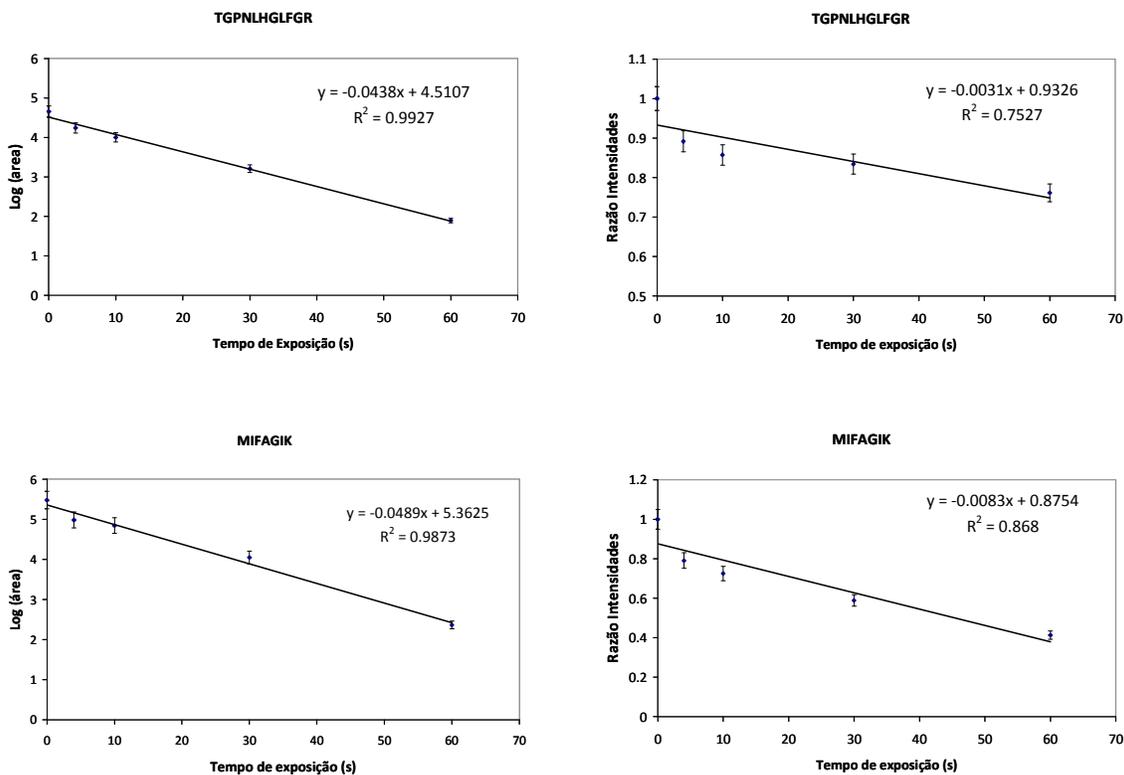
Após as análises, o sinal do peptídeo foi integrado e a intensidade do sinal foi ajustado para uma reação de pseudo-primeira ordem. Nas Figuras 26 e 27 podem ser observados os resultados obtidos para os peptídeos provenientes da mioglobina e do citocromo C utilizando o método de quantificação proposto e o método clássico. Pode-se observar que os melhores coeficientes de correlação são obtidos quando da utilização do método proposto (Figuras 26 e 27), mesmo para peptídeos que mostraram 2 oxidações (GLSDGEWQQVLNVWGK) na sequência, em comparação com o método clássico. Isso se deve principalmente ao fato de que no método proposto qualquer tipo de oxidação é levado em consideração, uma vez que diminuição do sinal do peptídeo não modificado é determinada.





**Figura 26.** Resultados obtidos para os peptídeos oxidados da mioglobina após diferentes tempos de exposição à irradiação. Coluna da esquerda mostra os gráficos obtidos pelo método proposto e a coluna da direita pelo método clássico

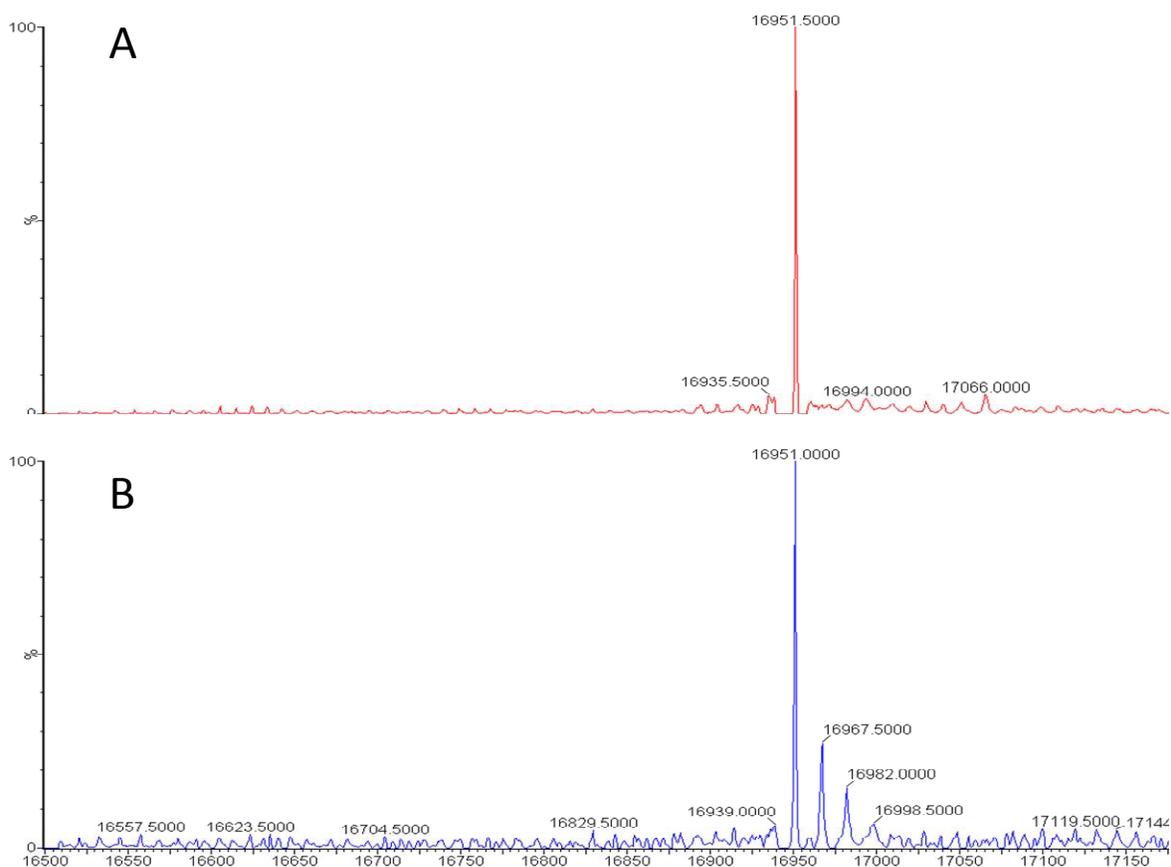




**Figura 27.** Resultados obtidos para os peptídeos oxidados do Citocromo C após diferentes tempos de exposição à irradiação. Coluna da esquerda mostra os gráficos obtidos pelo método proposto e a coluna da direita pelo método clássico

Outro fator importante na análise pelo método *label-free* é a necessidade de garantir que os fenômenos da diminuição do sinal cromatográfico do peptídeo modificado sejam exclusivamente provenientes de processo oxidativo. Tem sido relatado que, dependendo das condições experimentais (em particular com doses elevadas de radicais hidroxila), podem ser formadas ligações cruzadas entre as cadeias polipeptídicas e clivagem da cadeia principal da proteína (ligações carbono) (mediada pela formação de um sítio radicalar em carbonos da cadeia principal)<sup>102</sup>. Para provar que as condições experimentais não favorecem esse tipo de modificação, foram adquiridos espectros de MS da proteína intacta antes e depois do maior tempo de exposição utilizados, 60 s (Figura 28). Pode ser observado a partir da Figura que os espectros de MS da mioglobina não-oxidada e

oxidada diferem apenas pelos produtos de oxidação, e não foram observadas na amostra produtos irradiados de menor massa (degradação) ou muito maior (*cross-linking*).



**Figura 28.** Espectro de MS deconvolvido para as amostras controle (A) e (B) irradiada por 60 s.

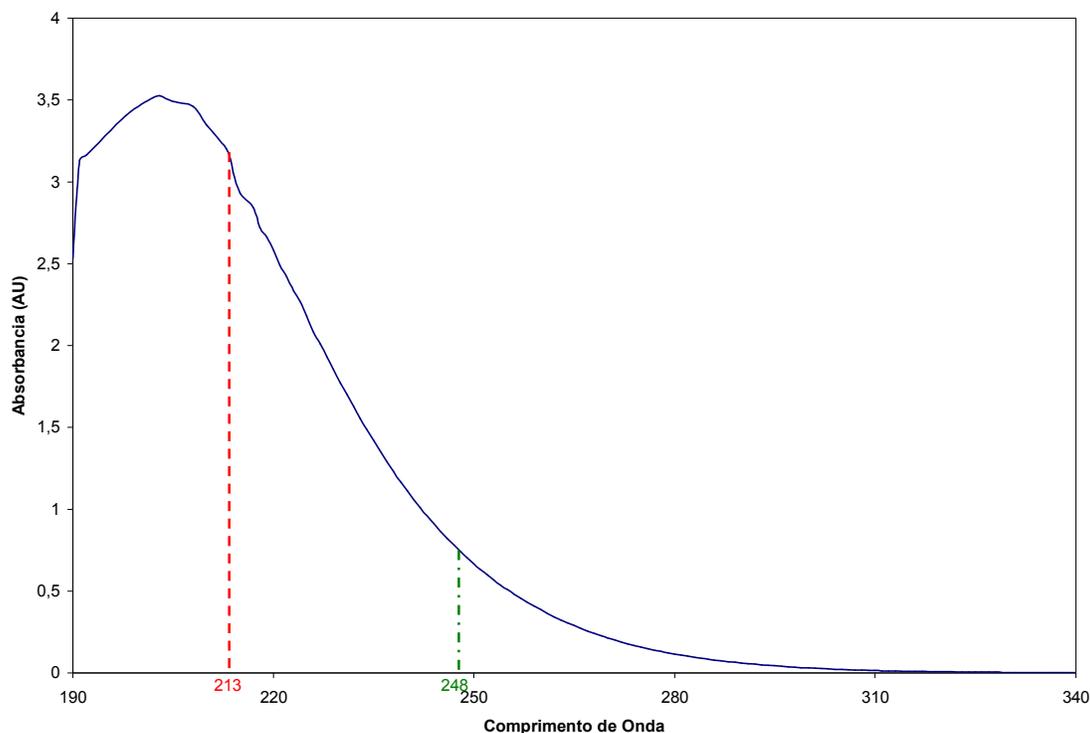
### 4.3 Experimentos de footprinting utilizando Laser de Nd:YAG com fonte de radiação UV.

O primeiro trabalho de *footprinting* utilizando um laser como fonte de radiação foi proposto por Hambly e Gross em 2005, como uma prova de conceito.

<sup>105</sup> Naquele trabalho o autor utilizava um laser *excimer* de KrF com um

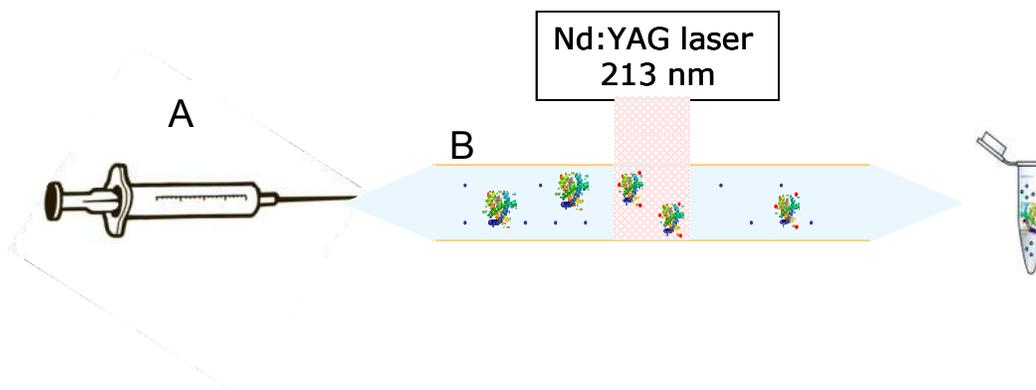
comprimento de onda de 248 nm. Como vantagens o autor descreve que a técnica utiliza baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , curtos tempos de irradiação da amostra, e alta eficiência no processo de fotólise do peróxido de hidrogênio. No entanto, o sistema de laser utilizado apresenta algumas desvantagens devido ao fato de ser um laser de gás. Em vista dos resultados obtidos pelo autor, buscou-se a utilização de um laser mais apropriado para realização de experimentos de *footprinting*.

Assim, foi utilizado como fonte de radiação um laser de Nd:YAG (UP-213 New Wave Research). Este laser apresenta várias vantagens em relação ao utilizado por Gross, tais como: ser um laser de estado sólido, apresentar sistema computadorizado de controle de intensidade e com comprimento de onda de 213 nm (1064 nm com cristal de multiplicação de 5x). A vantagem de se utilizar esse comprimento de onda é que este se encontra em uma faixa de grande absorção por parte do peróxido de hidrogênio (Figura 29) quando comparado ao laser de 248 nm sendo muito mais efetivo no processo de homólise do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  possui um rendimento quântico próximo a 1 em todos os comprimentos de onda entre 300 e 190 nm.



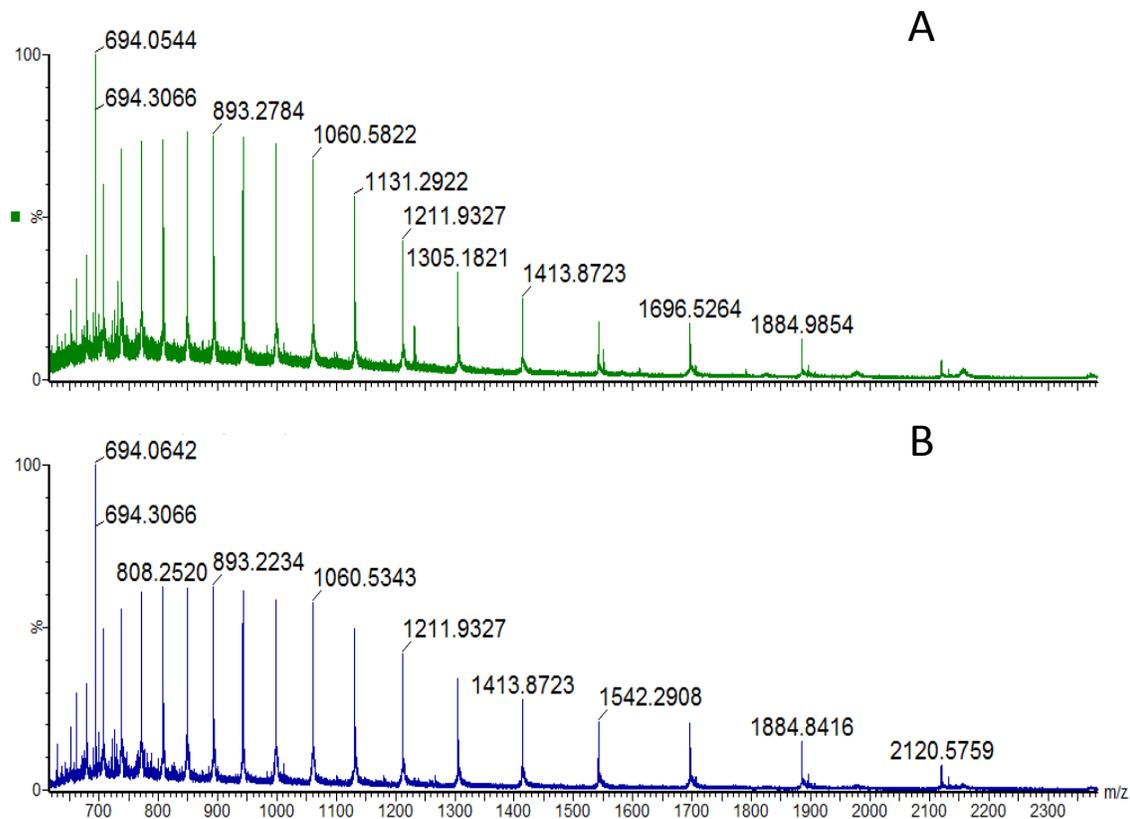
**Figura 29.** Espectro de absorção do peróxido de hidrogênio.

Em vista disso, experimentos de *footprinting* utilizando mioglobina como proteína padrão na presença de peróxido de hidrogênio e o laser de Nd:YAG foram realizados como prova de conceito. No sistema empregando o laser como fonte de radiação foi utilizado, para passagem da amostra, um capilar de sílica de 75  $\mu\text{m}$  d.i. no qual a polimida que reveste o capilar foi removida para passagem da radiação. Este capilar foi colocado na câmara de incidência do laser, sendo que para passagem da amostra foi utilizado uma bomba de infusão com fluxo de 1  $\mu\text{L min}^{-1}$  (Figura 30).



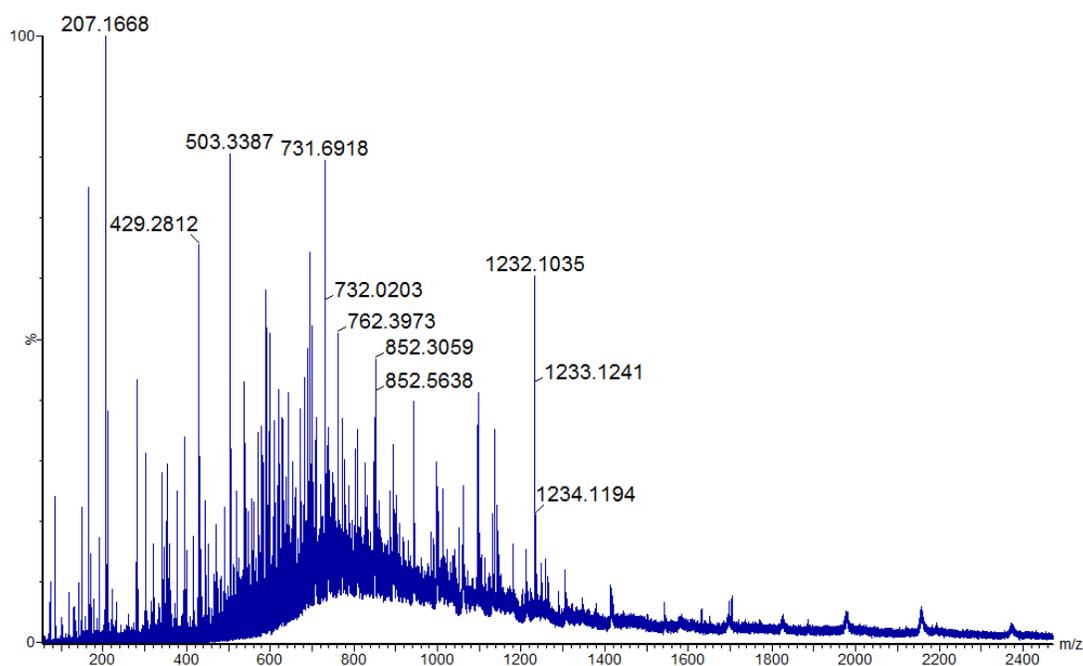
**Figura 30.** Esquema do experimento de *footprinting* utilizando laser. A) Bomba peristáltica, B) Capilar de sílica.

Nos primeiros ensaios realizados, soluções de mioglobina  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de foram passadas através do sistema com o capilar pelo laser medindo de haveria alguma degradação da proteína em virtude da absorção da radiação UV por parte da proteína. Na Figura 31 o espectro de MS da solução de mioglobina submetida à radiação UV pelo laser é comparado com o espectro da mesma solução sem sofrer irradiação. A incidência da radiação UV sobre a proteína não causou nenhuma modificação estrutural ou mesmo diminuição do sinal relacionado a degradação da proteína em virtude da radiação.



**Figura 31.** Espectro de MS da mioglobina. (A) solução controle; (B) após a irradiação.

Após os resultados obtidos, os primeiros ensaios de *footprinting* foram realizados utilizando soluções contendo mioglobina ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 0,05% (v/v) de peróxido de hidrogênio<sup>162, 163</sup>. Nestas condições, a concentração de radicais hidroxilas geradas no meio foi muito alta, causando a degradação da proteína pela clivagem radicalar da cadeia principal (Figura 32). Como consequência, durante a análise da mioglobina intacta era possível ver peptídeos formados em solução pela degradação da proteína.

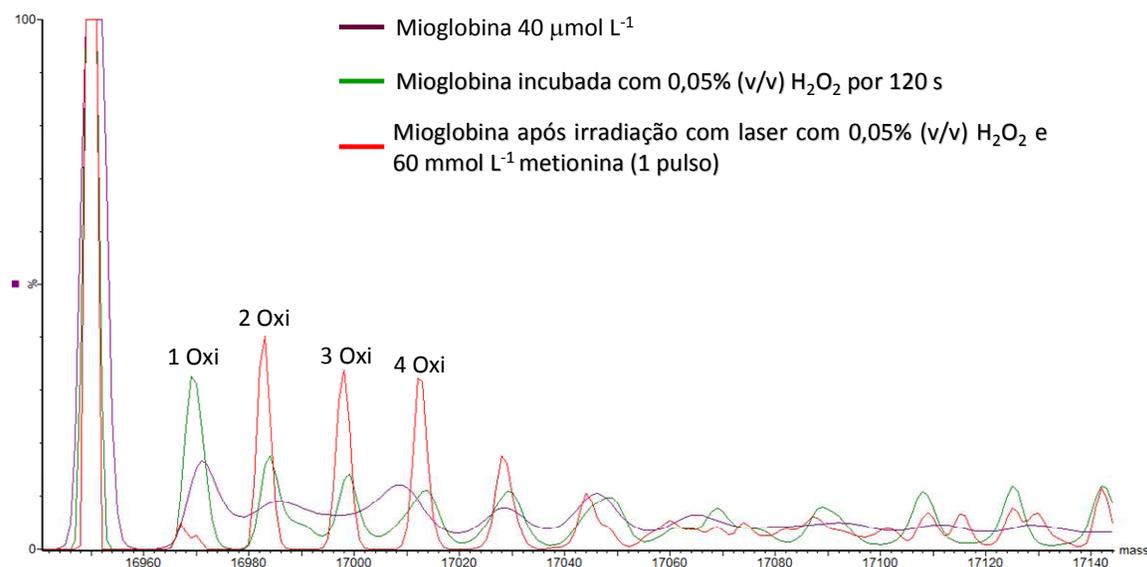


**Figura 32.** Espectro de MS da mioglobina degradada devido à grande concentração de radicais gerada no meio após radiação.

Para contornar esse problema, uma solução de metionina ( $120 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi adicionada à solução contendo proteína e peróxido antes mesmo da passagem da solução pelo laser, de forma a controlar a concentração de radicais hidroxilas no meio. No trabalho publicado por Hambly e Gross em 2005<sup>106</sup>, o autor adiciona à solução da proteína catalase como *scavenger* antes da passagem desta pelo laser para controlar os radicais hidroxila formados pelo processo de homólise do peróxido de hidrogênio.

Após a radiação, a proteína não-digerida, foi analisada por LC-MS, onde foi observada a grande eficiência de oxidação do processo, (Figura 33), sem que houvesse degradação da mioglobina. É importante ressaltar aqui que as oxidações observadas são decorrentes de um único pulso de 4 ns do laser, trazendo a escala de tempo do experimento para a faixa de baixos nanosegundos. Isso abre a possibilidade de se utilizar esse sistema de oxidação não apenas para

análise de estruturas estáticas de proteínas, mas também de se realizar análises estruturais resolvidas no tempo (dinâmica molecular).



**Figura 33.** Espectro da Mioglobina após passagem da solução pelo laser Nd:YAG (213 nm).

Estudos adicionais ainda estão sendo realizados para se determinar as condições ótimas para o experimento como energia do laser a ser utilizada, fluxo de passagem da amostra pelo capilar bem como concentração de proteína e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 4.3. Estudo da especificidade do agente de ligação cruzada frente aos diferentes aminoácidos

A elucidação de estruturas terciárias ou quaternárias de proteínas por ligação cruzada e espectrometria de massas (MS) tem ganho uma grande importância na área de proteômica estrutural. Para localizar a modificação na sequência da proteína, softwares dedicados são aplicados para analisar a massa

ou espectros de massas dos fragmentos dos peptídeos (MS/MS). Esses tipos de softwares exigem informações sobre os aminoácidos alvos pelo agente de ligação cruzada a ser utilizado no experimento para limitar o tempo de análise dos dados e aumentar a eficiência dos métodos.

Uma das estratégias mais comuns em estudos de ligação cruzada é o uso de ésteres de N-hidroxi succinimida (NHS) homobifuncionais como reagentes de ligação cruzada. A literatura desses agentes relata uma especificidade desses reagentes apenas para aminas, que no caso de proteínas, estariam localizadas no grupo amino N-terminal e no grupo  $\epsilon$ -amino da cadeia lateral da lisina. Entretanto, alguns estudos com certos ésteres de NHS homobifuncionais revelaram reações colaterais inesperadas. Como relatado anteriormente por Swaim et al.,<sup>152</sup> que encontraram vários produtos de reação durante o seu estudo sobre a proteína  $\alpha$ -cristalina com agente de ligação cruzada clivável 3,3-ditiobis [sulfosuccinimidilpropionato] (DTSSP), é esperado que alguns aminoácidos que contenham grupos nucleofílicos também reajam com este tipo de ALC, tais como His, Tyr, Ser e Cys.

Tendo em vista a possibilidade do reagente de ligação cruzada reagir com outras cadeias laterais dos aminoácidos, foi realizado um estudo detalhado da reação de ALC's baseados em ésteres de NHS frente a esses aminoácidos. Como o pH tem uma grande influência na nucleofilicidade dos aminoácidos descritos (seção 1.5.3), esses estudos foram realizados em uma larga faixa de valores de pH.

Para este estudo, foram sintetizados peptídeos específicos (Figura 34). A sequência dos peptídeos foi mantida sempre a mesma, buscando apenas modificar o resíduo nucleofílico entre eles. O N-terminal de cada peptídeo foi acetilado para que o grupo  $-NH_2$  do N-terminal não reagisse com o ALC utilizado. Como agente de ligação cruzada foi utilizado o DSS devido, principalmente, à sua disponibilidade comercial e ao tamanho e flexibilidade de sua cadeia espaçadora. Ésteres de NHS são suscetíveis a ataque nucleofílico, levando a perda do anel succinimida e formação da ligação entre a cadeia espaçadora e o resíduo de aminoácido.

P1) Ac-ARAKGAEFAVKAGVR  
P2) Ac-ARAKGAEFAVYAGVR  
P3) Ac-ARAKGAEFAVCAGVR  
P4) Ac-ARAKGAEFAVHAGVR  
P5) Ac-ARAKGAEFAVSAGVR

**Figura 34.** Sequência dos peptídeos utilizados no estudo de reatividade.

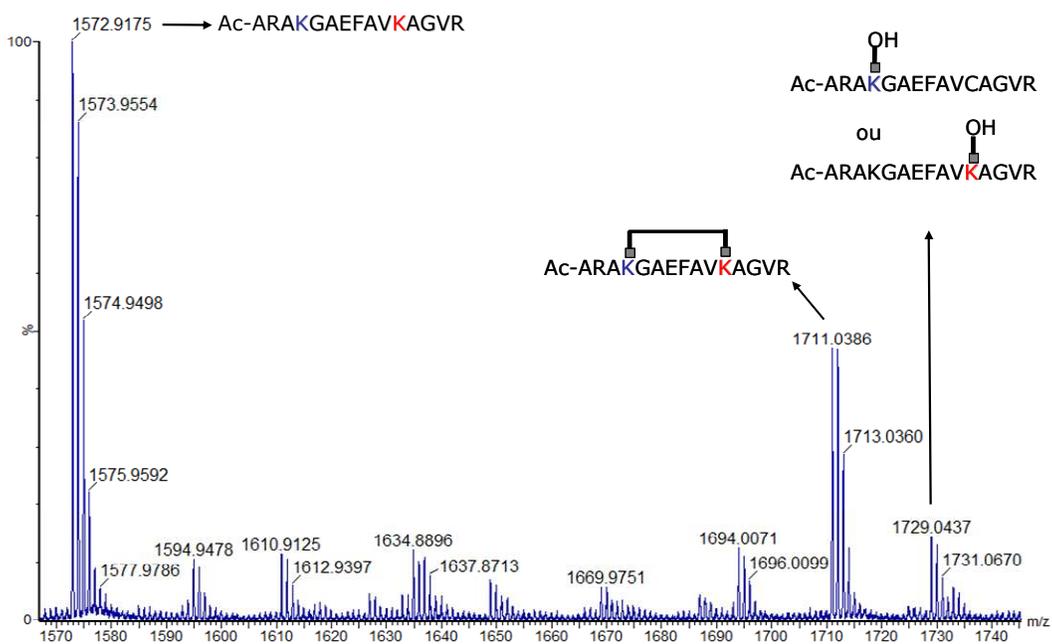
Para os ensaios de reatividade foram utilizadas concentrações de peptídeos de 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em soluções de fosfato de sódio 50  $\text{mmol L}^{-1}$  em 9 diferentes valores de pH: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0. Nas soluções de peptídeos foi adicionado o reagente de ligação cruzada (DSS - suberato de disuccinimidila) num excesso molar de 50x em relação à concentração de peptídeo. Essas amostras foram incubadas à temperatura ambiente por cerca de duas horas e a reação foi finalizada adicionando-se tampão 1  $\text{mol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7,2 (concentração final de 50  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Essa reação foi então novamente incubada por 15 minutos. Após a reação as amostras foram passadas por cartuchos de SPE (OASIS HLB - Waters, Milford, MA, USA) para eliminar resíduos de DSS bem com de Tris-HCl.

Como o DSS é um reagente homobifuncional, os produtos da reação entre o ALC e os peptídeos formados podem ser de três tipos diferentes: i) *dead-end*, onde um dos grupos reativos reagiu com um resíduo enquanto o outro foi hidrolisado (adição de 156 Da à massa do peptídeo); ii) intramolecular, onde os resíduos ligados encontram-se na mesma cadeia (adição de 138 Da à massa do peptídeo); ou iii) intermolecular, onde os resíduos ligados encontram-se em cadeias distintas (Figura 12). Para evitar a formação deste último, utilizou-se uma baixa concentração dos peptídeos.

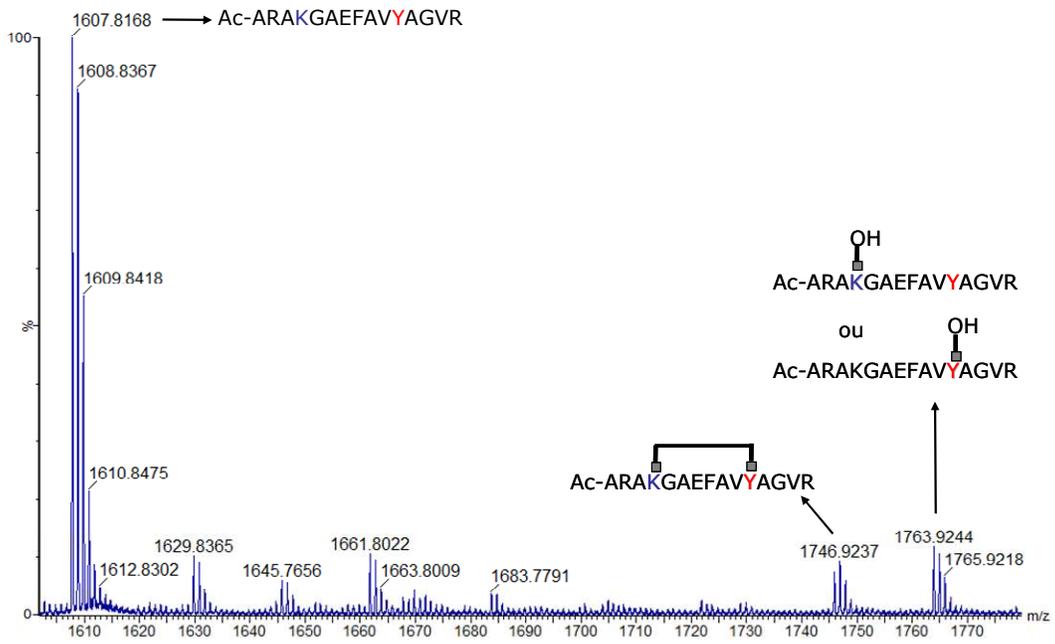
Após a reação de ligação cruzada, as análises foram realizados por MALDI-MS; as amostras foram ressuspensas em 1 mL de solução aquosa contendo 50% ACN

e 0.1% (v/v) TFA. A amostra foi preparada pelo método *dried droplet*, utilizando-se como matriz a  $\alpha$ -ciano-4-hidróxi-cinâmico ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , na mesma solução do peptídeo). A Figura 35 mostra os espectros de MS adquiridos para a reação entre os peptídeos e o ALC em pH 7,0 com a atribuição para cada uma das espécies formadas.

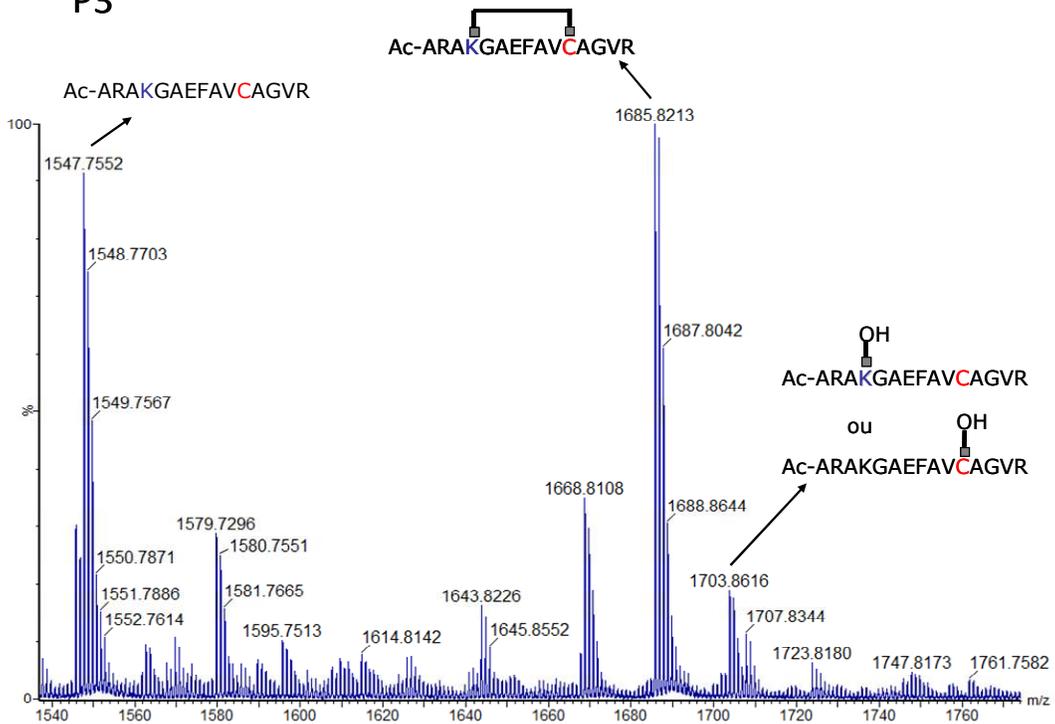
P1



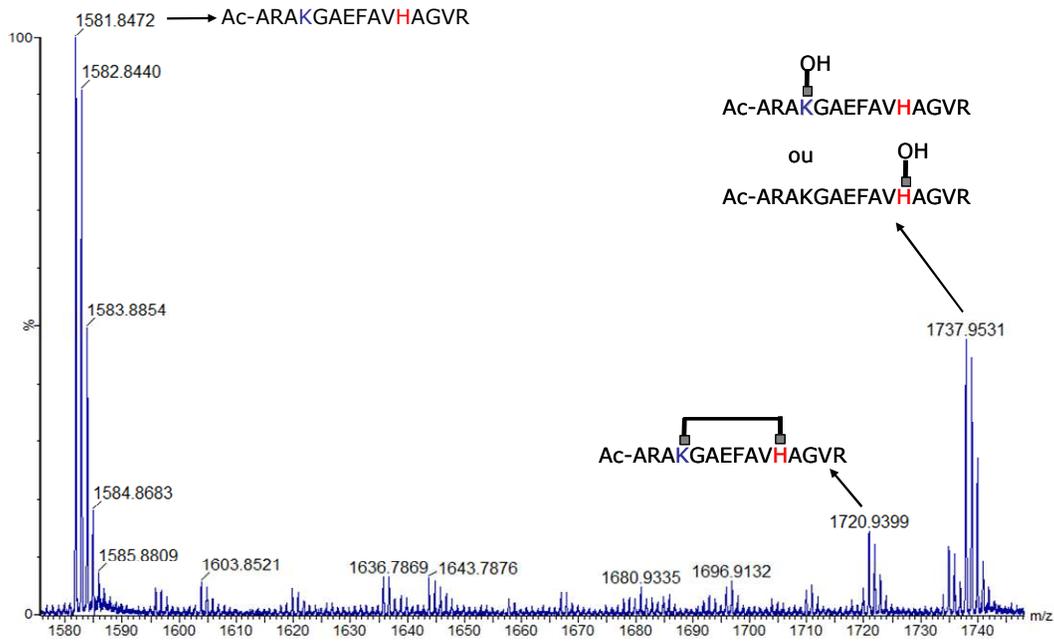
## P2



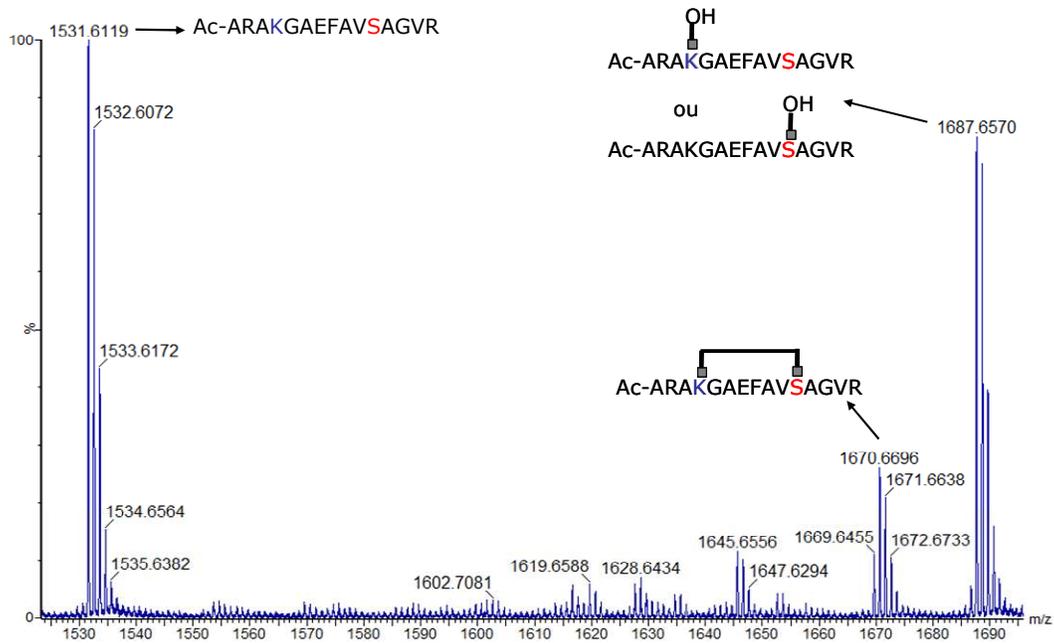
## P3



## P4

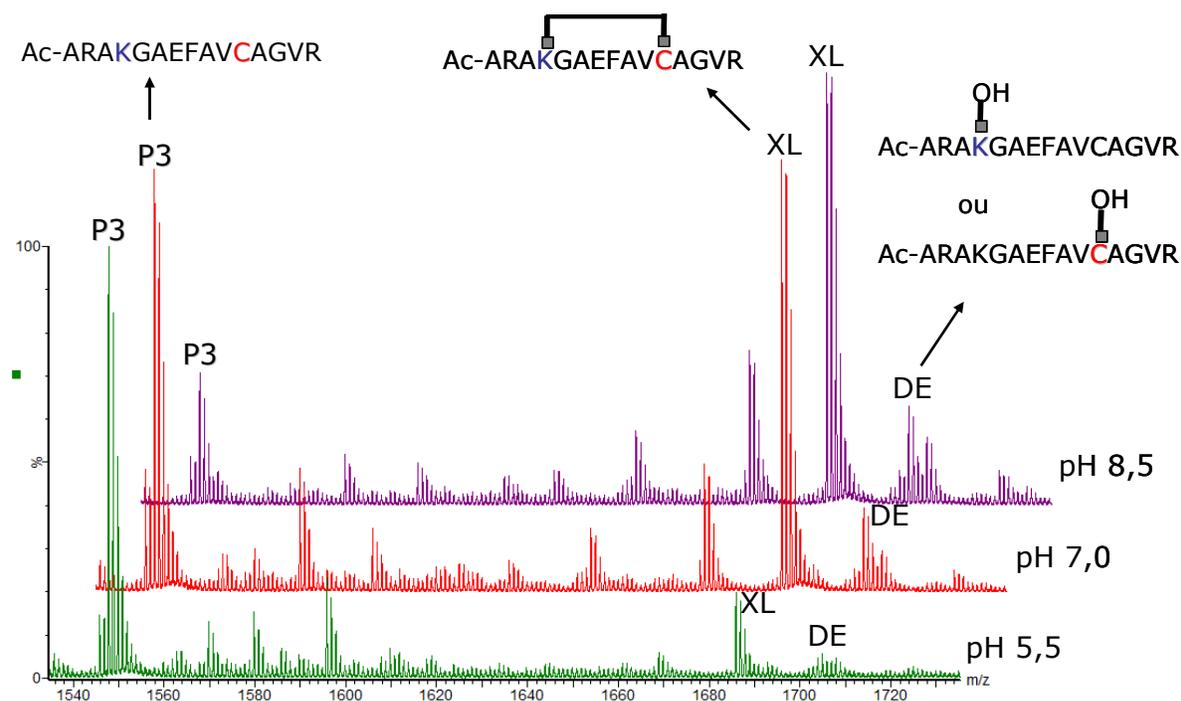


## P5



**Figura 35.** Espectros de MALDI dos peptídeos com as respectivas identificações das espécies formadas após reação com DSS em pH 7.0.

Para se determinar a formação de cada uma das espécies (intramolecular e *dead-end*) e a sua proporção frente ao peptídeo nativo nas reações realizadas nas soluções tampão nos 9 diferentes valores de pH, foram utilizadas as intensidades dos sinais de cada uma dessas espécies nas diferentes condições de pH por meio do espectro de MALDI obtido, Figura 36.

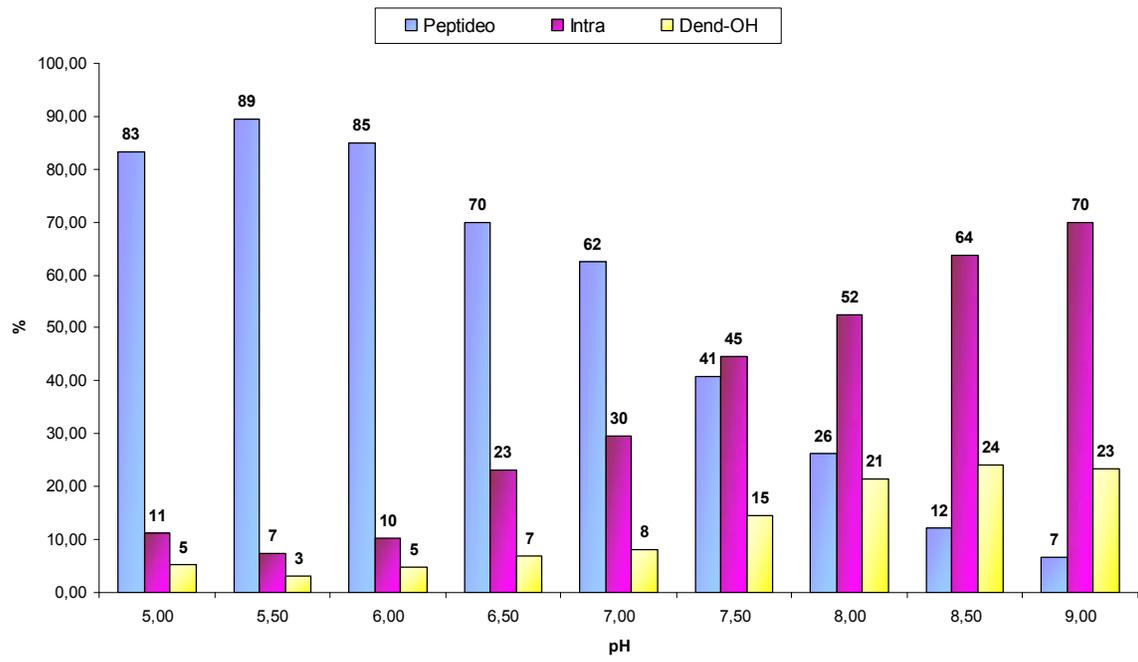


**Figura 36.** Formação das espécies em função do pH (MALDI) para o peptídeo P3.

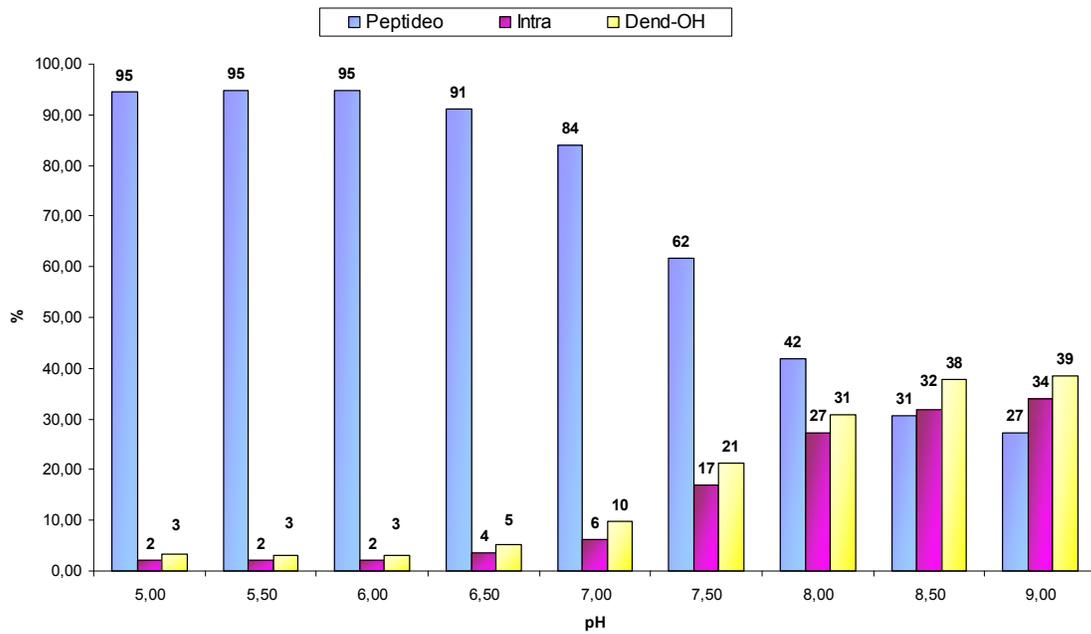
Como pode ser observado, a formação das espécies intramolecular e *dead-end* aumentou com o aumento dos valores de pH. Este aumento pode ser racionalizado uma vez que os grupos das cadeias laterais dos aminoácidos ficam desprotonadas em valores de pH mais elevados, aumentando a nucleofilicidade.

De posse dos valores das intensidades, foi determinada a porcentagem de formação de cada espécie frente ao peptídeo, como pode ser observado nos gráficos da Figura 37.

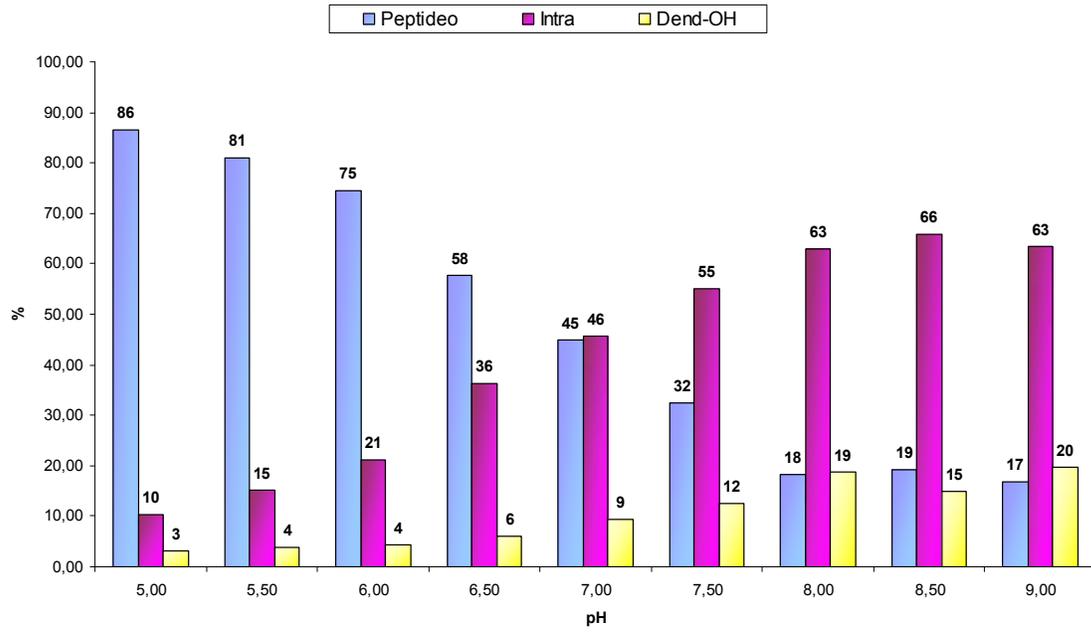
**P1 Ac-ARAKGAEFAVKAGVR**



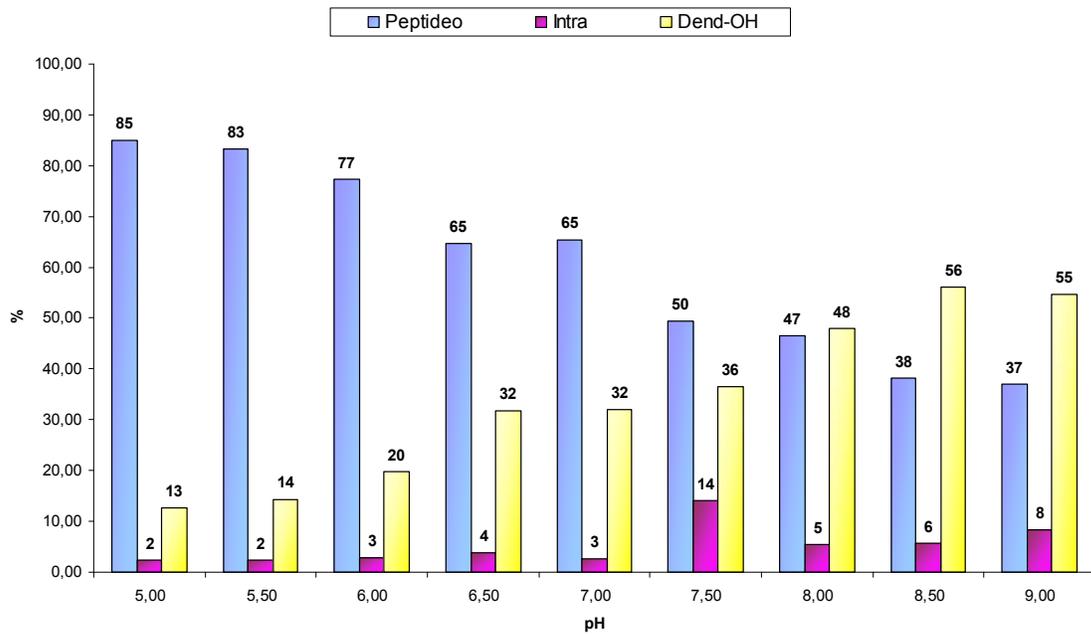
**P2 Ac-ARAKGAEFAVYAGVR**

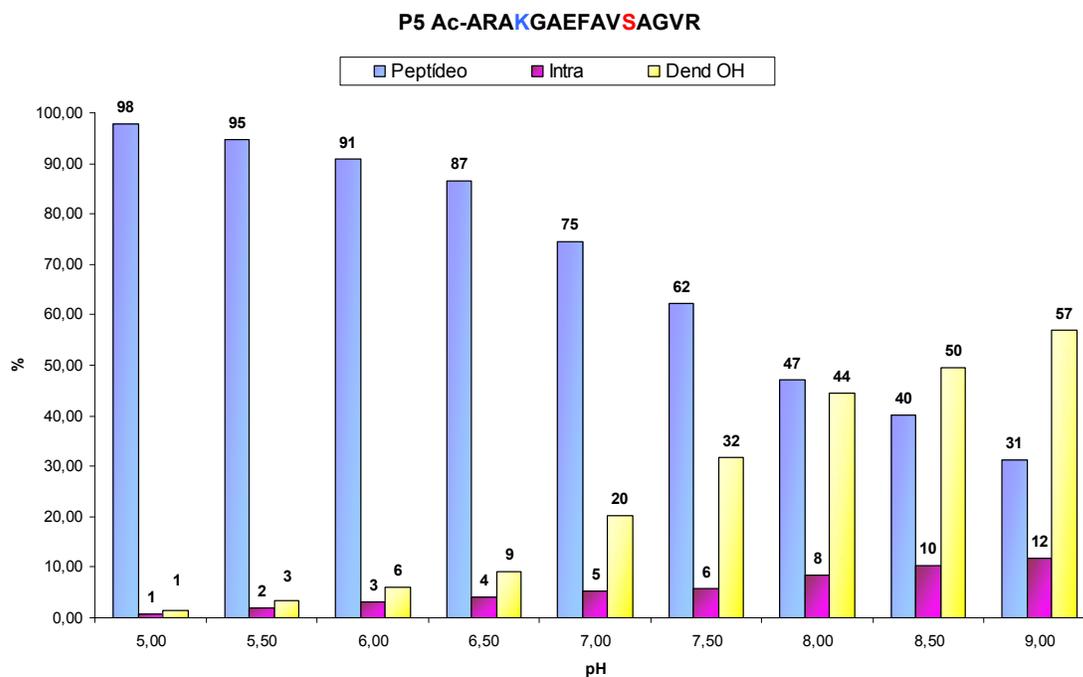


**P3 Ac-ARAKGAEFAVCAGVR**



**P4 Ac-ARAKGAEFAVHAGVR**





**Figura 37.** Gráficos com a porcentagem de cada espécie formada após a reação entre peptídeo e DSS nos diferentes valores de pH. (A) P1; (B) P2; (C) P3; (D) P4; (E) P5.

Como pode ser observado nos gráficos da Figura 37, a formação da espécie intra-molecular ocorre com grande rendimento para o peptídeo P1, mostrando que a lisina é realmente um bom nucleófilo frente a ésteres de NHS como já relatado na literatura. A maior reatividade em valores pH maiores para a lisina (pKa 10.8) é coerente com a maior nucleofilicidade da amina neutra em relação a amina protonada, que não é nucleofílica. É interessante notar no peptídeo P3, que contém cisteína, que o rendimento da reação de ligação cruzada é ainda maior que no caso do P1. Isso se deve ao fato da cisteína ser um excelente nucleófilo, principalmente em maiores valores de pH (pKa 8.3), em pleno acordo com os dados publicados por Edwards e Pearson<sup>156</sup> onde o grupo tiol da cisteína é o mais forte nucleófilo presente na proteína, em particular na sua forma tiolada. Essa reatividade da cisteína não havia sido relatada antes e possui várias implicações práticas como nos métodos de quantificação que utilizam iTRAQ, TMAB, entre outros.

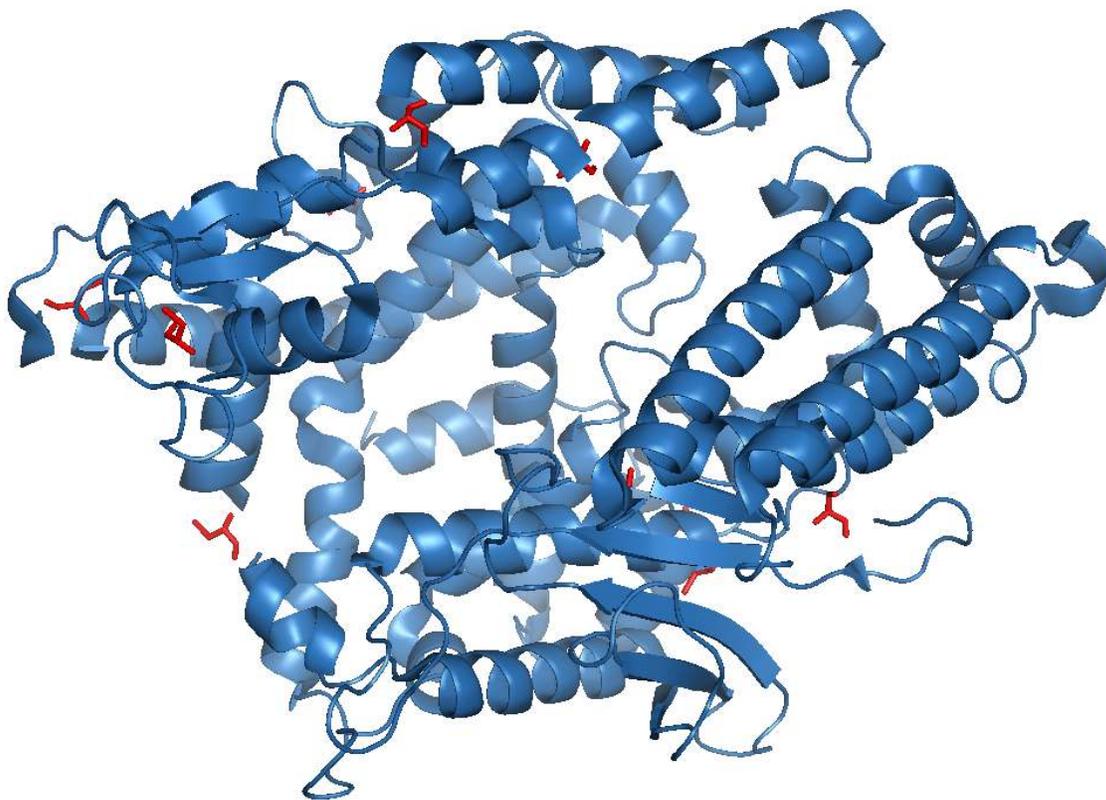
Para o peptídeo contendo tirosina (pKa 10.9) (P2) houve uma maior formação da espécie *dead-end*, provavelmente na lisina presente na sequência desse aminoácido. Trabalhos da literatura<sup>164</sup> relatam que modificações com ésters de NHS em resíduos de tirosina acontecem somente quando este aminoácido é vizinho a algum outro resíduo básico, com, por exemplo, a histidina.<sup>164</sup> Sendo isso uma das evidências da menor formação da espécie intramolecular entre a lisina e a tirosina da sequência. Para o peptídeo contendo histidina (pKa 6,0) houve quase que exclusivamente a formação da espécie *dead-end*. Isso se deve pelo fato da instabilidade do produto formado pela histidina e o ALC, sendo este produto rapidamente hidrolisado.<sup>165</sup> Já para o peptídeo contendo serina (pKa >13) (P5) houve baixa reatividade para a formação da espécie intramolecular, havendo uma preferência pela formação da espécie *dead-end*. Isso se deve pelo fato de uma das pontas do reagente se ligar inicialmente na lisina e sua outra extremidade sofrendo hidrólise antes de reagir com a serina.

#### **4.5 Estudo da reatividade do agente de ligação cruzada DSS frente ao resíduo de cisteína utilizando a proteína Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15)**

Em vista da alta formação da espécie intramolecular no peptídeo contendo uma cisteína na sequência, foi utilizado uma proteína com a intenção de validar o resultado obtido com este peptídeo. Em todos os trabalhos utilizando agentes de ligação cruzada do tipo ésteres NHS, praticamente não são realizadas buscas utilizando *software*, colocando o resíduo de cisteína como possível sítio de modificação. Isso se deve ao fato que na maioria das proteínas, os resíduos de cisteína estão envolvidos em ligações dissulfeto. Entretanto, as ligações dissulfeto são geralmente formadas quando as proteínas são excretadas para o meio extracelular. Como a maioria dos ambientes intracelulares tem caráter redutor, as ligações dissulfeto são, com algumas exceções, instáveis no citoplasma<sup>167</sup> Ou

seja, quando da realização de um estudo de ligação cruzada em um ambiente intracelular é recomendado considerar a cisteína como um possível sítio de modificação.

A Thimet Oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15) é uma enzima envolvida na degradação de oligopeptídeos (5-17 aminoácidos), sejam eles neuropeptídeos ou peptídeos intracelulares e, possivelmente, participe da geração de peptídeos antigênicos apresentados pelo processo de histocompatibilidade da classe I (MHCI) após processar fragmentos protéicos gerados pelo proteassomo.<sup>168</sup> Quinze resíduos de cisteína estão presentes na proteína EP24.15 de rato, sendo sete acessíveis ao solvente, dois encontrados no interior da fissura do sítio catalítico; e nenhuma ligação dissulfeto intraproteína é encontrada.<sup>168</sup> (Figura 38)



**Figura 38.** Estrutura da Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15, MM ~78 KDa). Resíduos de cisteínas em vermelho.

Para reação entre a proteína e o agente de ligação cruzada, foi utilizado uma solução de Thimet oligopeptidase em solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,0 a uma concentração final de 1 μmol L<sup>-1</sup>; DSS por sua vez foi dissolvido em DMF em concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup> e adicionado em 100 vezes de excesso molar à solução anterior. A quantidade de DSS a ser utilizada foi determinada levando-se em conta o número de resíduos de lisina e cisteína na sequência da proteína. A reação foi mantida a temperatura ambiente por duas horas, e após isso adicionou-se tampão Tris•HCl (1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.6) a concentração final de 50 mmol L<sup>-1</sup> para cessar a reação. Uma solução controle contendo somente a proteína também foi utilizada. A cobertura obtida da sequência da proteína pode ser observada na Figura 39.

MKPPAACAGD VVDTVSPCST VNHLRWDLA QQIRALTTQL IEQTKCVYDR VGAQDFEDVS  
YESTLKALAD VEVYTVQRN ILDFPQHVSP NKDIRAASTE ADKKLSEFDV EMSMRQDVYQ  
RVVWLQEKIP KDSLKPEAAR YLERLIKLR RNGLHLPQDT QEKIKNIKKR LSLLCIDFNK  
NLNEDTTFLP FTREELGGLP EDFLNSLEKT EDGKLVTKL YPHYFLLKK CHVPETRLL  
EEAFNCRCKE ENCAILKELV SLRAQKSNLL GFRTHADYVL EMNMAKTSQT VATFLDELAR  
KPKPLGEQER AVILELKEAE SAKRGLPFDG RIHAWDMRYY MNQVEEDSYR VDQNLLKEYF  
PMQVVTRGLL AIYQELLGLT FTLEEGAAAW HEDVRLYSVR DAASGEEIGK FYLDLYPREG  
KYGHAACFGL QPGCLRQDGS RQLAIAAMVA NFKTKTPDVP SLLQHDEVET YFHEFGHVMH  
QLCSQAEFAM FSGTHVERDF VEAPSQMLEN WVWEKEPLMR MSQHYRTGGE APEDLLEKLI  
KSRQANAGLF NLRQIVLAKV DQVLHTQTDV DPAAEYARLC QEILGVPATP GTNMPATFGH  
LAGGYDAQYY GYLWSEVYSM DMFHTRFKQE GVLSPKVGMD YRTSILRPGG SEDASTMLKQ  
FLGRDPKQDA FLLSKGLQVE GCEPPAC

**Figura 39.** Sequência primária da Thimet Oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15). Em azul estão os peptídeos encontrados na análise por LC-MS/MS (cobertura 63%)

Após confirmação da sequência da proteína [score 2236, com confiança > 95%], foi realizada a busca pela modificação em cisteínas. Para essa busca, foi criada a modificação *dead-end* no MASCOT (+ 156 Da) e a modificação foi

colocada como variável (Figura 40). Também foi colocada como modificação variável a oxidação da metionina.

### MASCOT MS/MS Ions Search

<b>Your name</b>	Eduardo Jorge Pilau	<b>Email</b>	eduardo@iqm.unicamp.br
<b>Search title</b>	Thimet Oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15)		
<b>Database</b>	MSDB		
<b>Taxonomy</b>	All entries		
<b>Enzyme</b>	Trypsin	<b>Allow up to</b>	1 missed cleavages
<b>Fixed modifications</b>	Acetyl (K) Acetyl (N-term) Acetyl (Protein N-term) Amidated (C-term) Amidated (Protein C-term)	<b>Variable modifications</b>	Cation:Na (DE) CytoC-Heme (C) Dead End DSS (Cys) (C) Dead End DSS (His) (H) Dead End DSS (K)
<b>Quantitation</b>	None		
<b>Peptide tol. ±</b>	0.1 Da # <sup>13</sup> C 0	<b>MS/MS tol. ±</b>	0.1 Da
<b>Peptide charge</b>	2+	<b>Monoisotopic</b>	<input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/>
<b>Data file</b>	G:\Doutorado\Leituras\Peptide( Browse...		
<b>Data format</b>	Micromass (.PKL)	<b>Precursor</b>	m/z
<b>Instrument</b>	ESI-QUAD-TOF	<b>Error tolerant</b>	<input type="checkbox"/>
<b>Decoy</b>	<input type="checkbox"/>	<b>Report top</b>	AUTO hits
<b>Start Search ...</b>		<b>Reset Form</b>	

**Figura 40.** Parâmetros empregados na identificação da modificação na cisteína.

Após a busca utilizando o programa MASCOT, duas cisteínas foram identificadas contendo a modificação de ALC nos peptídeos LLEEAFNCR (score 54) e CHVPETR (score 46). A Figura 41 apresenta os espectros de MS/MS para os dois peptídeos contendo cisteínas modificadas pelo agente de ligação cruzada DSS.

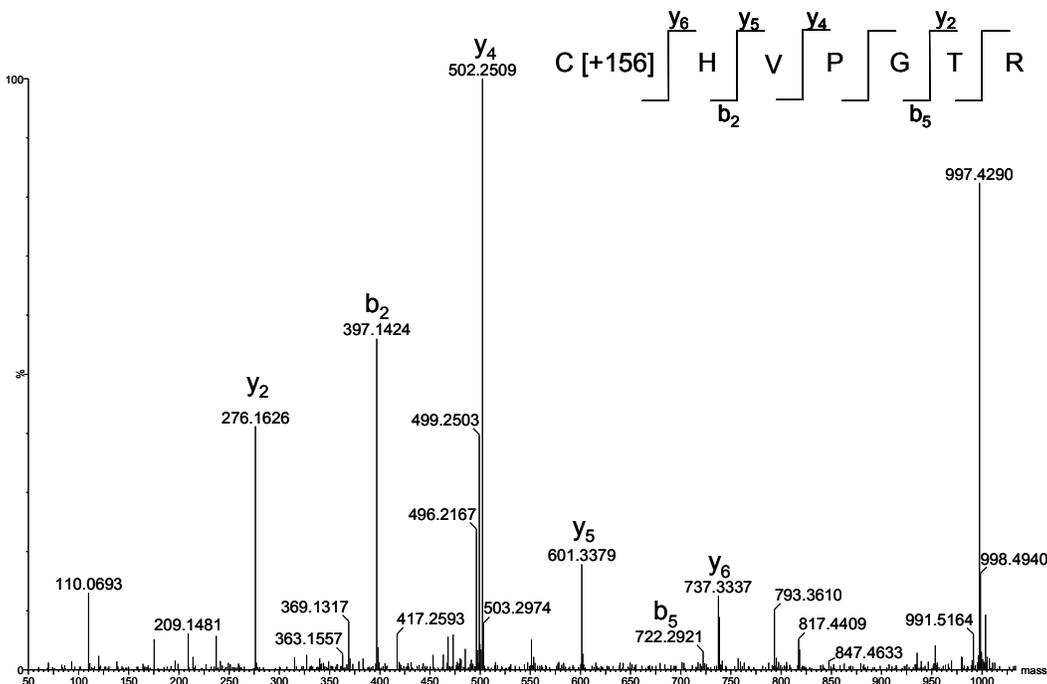
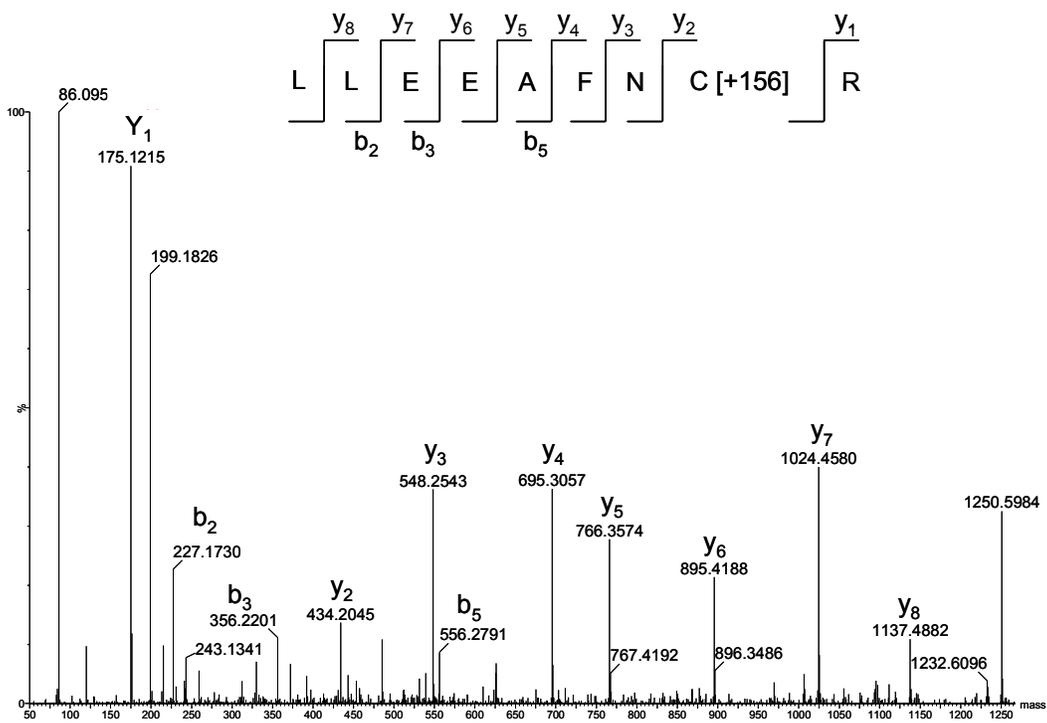


Figura 41. Espectros de MS/MS dos peptídeos contando modificação na cisteína.

Assim, podemos afirmar que o agente de ligação cruzada DSS pode reagir com resíduos de cisteína quando estes resíduos estão acessíveis ao solvente e não estão em ponte de dissulfeto.

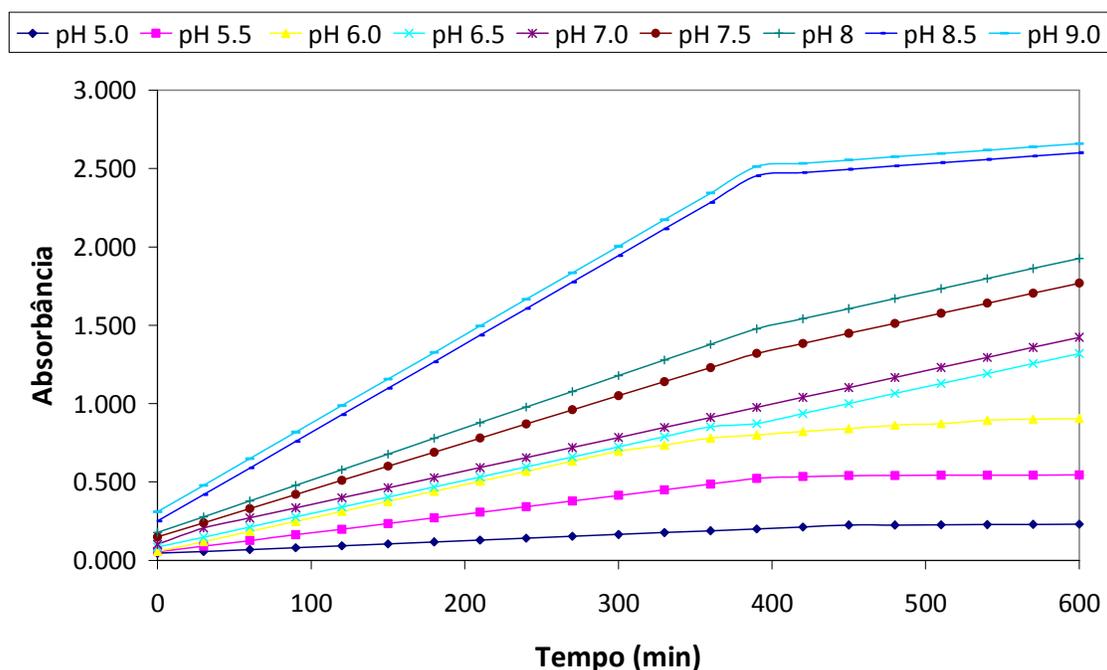
#### **4.6 Estudos de cinética de reação entre os ALC's com proteínas e da reação competitiva de hidrólise**

Os agentes de ligação cruzada baseados em ésteres de N-hidroxisuccinimida são os mais comumente utilizados em reações de *cross-linking* devido a sua reatividade frente a grupo aminas. Duas formas de reagentes de éster de NHS estão disponíveis: NHS (permeável à membrana, solúvel em solventes orgânicos DMF ou DMSO) e Sulfo-NHS (impermeável à membrana, diretamente solúvel em água). Segundo informações do fornecedor desses reagentes<sup>169</sup>, bem como, de alguns trabalhos da literatura<sup>170, 171</sup> a reação entre uma proteína e o ALC é completa dentro de 10 a 20 min em pH 6,0 a 9,0. Uma vez que as espécies desprotonadas dos grupos aminos sejam as espécies reativas, o aumento do pH faz com que a taxa da reação também aumente. Entretanto, em condições mais básicas a reação de hidrólise do éster de NHS compete em oposição a reação entre o ALC e os grupos reativos da proteína.

Alguns trabalhos relatam que o tempo de meia-vida de hidrólise dos ésteres de NHS é de aproximadamente 10 min em pH 8,6.<sup>172</sup> e de 4 a 5 h em pH 7,0.<sup>173</sup> Em pH 7,0, a reatividade do ALC é considerada ser a metade da reatividade em relação ao pH 9. A temperatura também apresenta um efeito na reação, que lhe permite reagir de forma eficiente até próximo a temperatura de congelamento da solução.<sup>161</sup> A hidrólise do ester de NHS esta ligada a perda do grupo NHS, sendo que esse grupo abandonador absorve fortemente em um comprimento de onda de 280 nm. Portanto, ao comparar a absorvância do reagente a 280 nm, antes e após a hidrólise, pode-se avaliar a reatividade do ALC para estudos de ligação cruzada.

Assim, realizamos um estudo para determinar o tempo de hidrólise do agente de ligação cruzada DSS e também determinar a cinética de reação entre o ALC e a proteína mioglobina em soluções tampão em diferentes valores de pH para saber se as condições normalmente utilizadas (pH 7,0, 1 h de reação) em experimentos de ligação cruzada são as mais adequadas.

Para os estudos de hidrólise, uma solução de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  de suberato de disuccinimidila (DSS) foi preparada. Devido a baixa solubilidade do DSS, primeiramente era adicionado  $250 \text{ }\mu\text{L}$  de DMF para solubilização do ALC sendo o volume completado até  $2 \text{ mL}$  utilizando tampão fosfato de sódio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ . Imediatamente após o preparo da solução, as mesmas foram submetidas a análise por UV-vis monitorando o comprimento de onda de  $280 \text{ nm}$ . As medidas foram realizadas utilizando uma cubeta de quartzo (caminho ótico de  $1 \text{ cm}$ )  $2 \text{ mL}$  de solução e o tempo total da cinética foi de  $10 \text{ h}$  sendo tirado um espectro a cada  $5 \text{ min}$ . Os dados obtidos podem ser observados na Figura 42.

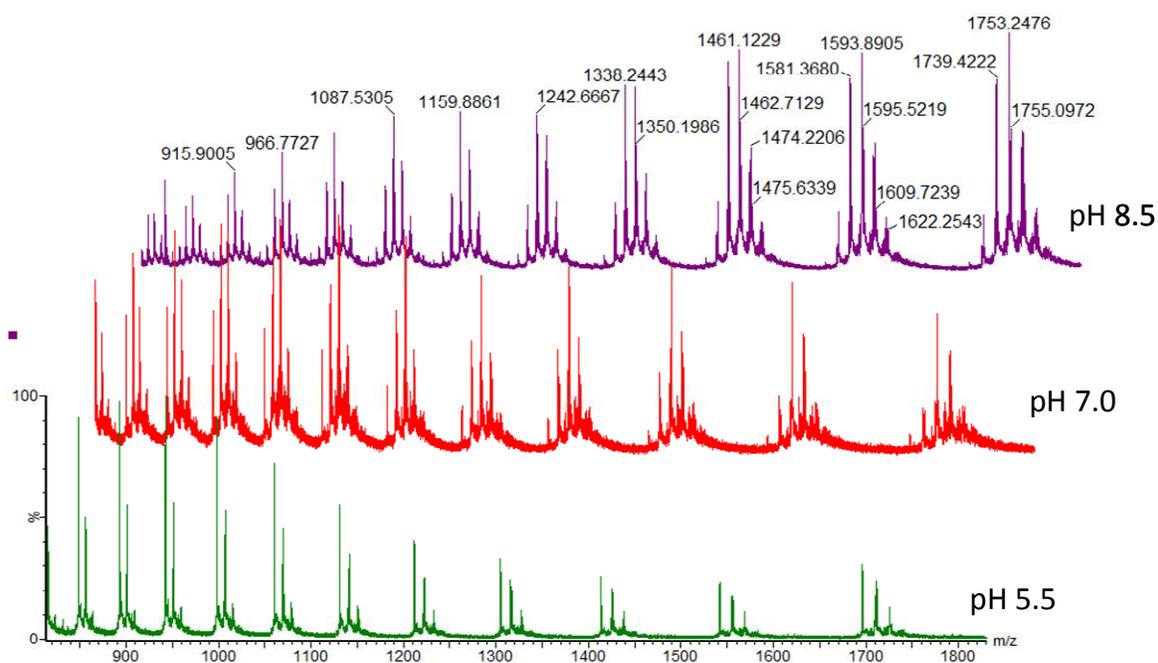


**Figura 42.** Cinética da hidrólise do DSS em soluções tampão (fosfato de sódio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a diferentes valores de pH.

Pelos valores de absorvância medidos é possível notar claramente que à medida que o valor de pH do meio aumenta de 5 até 9, a taxa de hidrólise do éster de NHS também aumenta (representada pelo aumento de concentração de NHS livre e conseqüente aumento da absorvância em 280 nm). Observa-se em particular um acentuado aumento para valores de pH maiores que 8, indicando uma maior eficiência da reação de hidrólise nessas condições de pH.

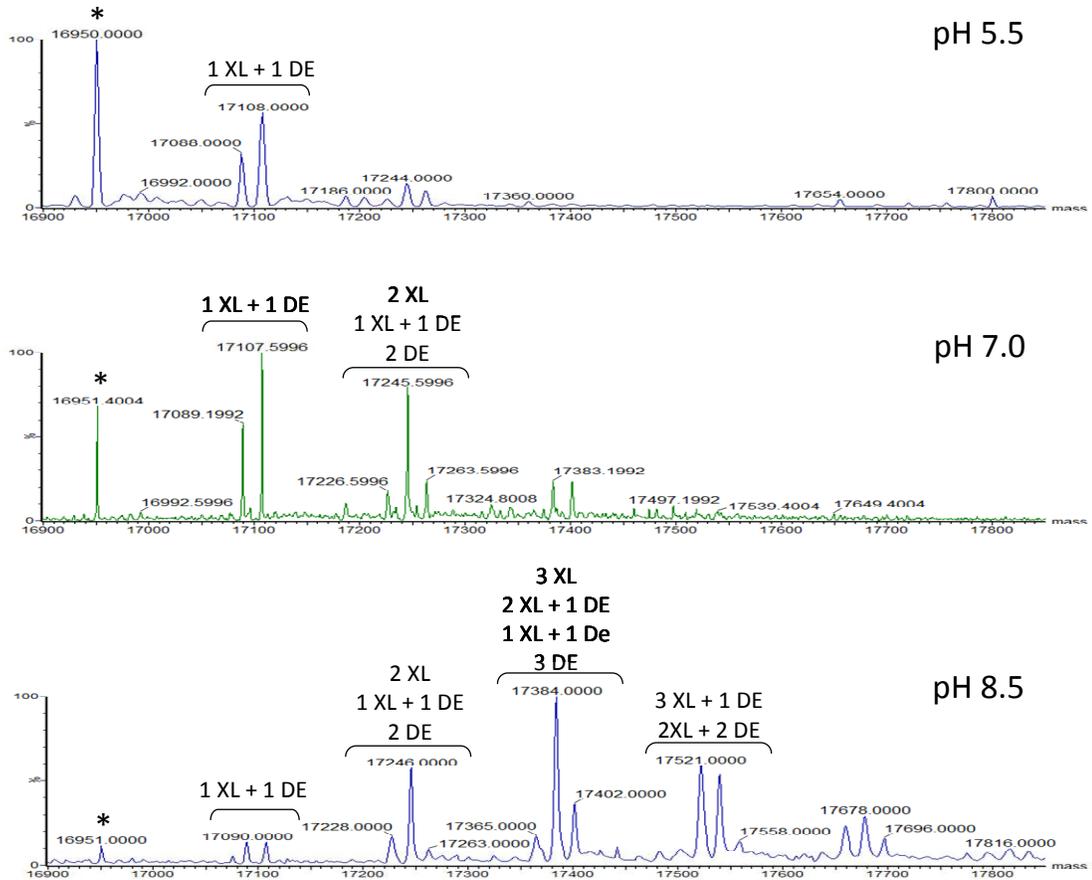
Como pode ser observado, em pH 8,5 e 9,0 a hidólise se completa em aproximadamente 400 min dando uma meia vida de 200 min. Para menores valores de pH, a reação de hidrólise não se completa em 600 min. Para os valores de pH próximos a 7,0, vemos que o tempo de meia vida é perto de 400 min.

De posse desse estudo sobre a cinética de hidrolise do DSS, foram realizados ensaio utilizando mioglobina ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) como proteína modelo em soluções de fosfato de sódio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  em 3 diferentes pHs: 5,5, 7,0 e 8,5. Com esse estudo buscou-se verificar se o número de modificações seria o mesmo nas três diferentes condições e se a reação de hidrólise iria possuir uma taxa de hidrólise mais rápida que a reação de modificação mesmo em pH mais elevado, onde as cadeias laterais dos grupos aminos estariam na forma desprotonada (nucleofilo mais forte). O tempo total de reação foi de 120 min, sendo que a cada 5 min uma alíquota de  $3 \mu\text{L}$  da reação era retirada e diluída com  $30 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  para análise. Para cessar a reação na alíquota retirada era adiciona a solução ácido fórmico (concentrado) baixando o pH da solução para perto de 2,0. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 43.



**Figura 43.** Espectro da reação entre a mioglobina e DSS em diferentes pH.

À medida que o pH do meio foi aumentando, maior foi o número de modificações encontradas em curto espaço de tempo de reação (Figura 44). Isso se deve ao fato de que o grupo  $\epsilon$ -amino da cadeia lateral da lisina em pHs mais elevados se encontra mais desprotonado aumentando sua nucleofilicidade e, conseqüente, a velocidade da reação. A reação realizada na solução tampão pH 5,5 foi a que apresentou o menor número de modificações, provavelmente pelo pequeno número de lisinas com o grupo  $\epsilon$ -amino desprotonada.



**Figura 44.** Espectro de MS deconvolvido para as amostras de mioglobina após reação com DSS.

Como pode ser observado na Figura 44, novamente o pH teve uma grande influência nos resultados obtidos em experimentos de ligação cruzada levando a formação de um maior número de espécies a medida que o valor de pH aumenta.

## 5. CONCLUSÕES

Com os estudos realizados, pode-se avançar no desenvolvimento de duas das principais técnicas de proteômica estrutural: footprinting e ligação cruzada.

Com relação à técnica de *footprinting*:

- Um novo sistema de geração de radicais OH foi desenvolvido utilizando uma lâmpada de Hg como fonte de radiação UV;
- As condições experimentais desta nova fonte foram otimizadas realizando estudos sistemáticos utilizando mioglobina com proteína padrão.
- Um novo sistema para fotólise de peróxido a laser foi implementado. Foi caracterizada a altíssima eficiência do sistema no processo de fotólise do peróxido de hidrogênio, permitindo que esse sistema possa ser utilizado em análises resolvidas no tempo, uma vez que altas concentrações de metionina tiveram que ser utilizadas no meio para não ocorrer degradação da proteína, além de no experimento de *footprinting* realizado, foram formadas espécies com 2 oxidações em maior proporção do que espécies contendo 1 oxidação;
- Foi utilizado um novo programa de análise de produtos de oxidações ByOnic. O programa se mostrou muito eficiente na identificação de sítios de oxidação.
- Foi desenvolvido um novo método de quantificação da cinética de oxidação. O novo método utiliza apenas o decaimento do sinal do peptídeo em função da variação do tempo de exposição a radiação UV. Mesmo em peptídeos contendo mais de 1 sítio de oxidação o método se mostrou adequado obtendo-se valores de coeficientes lineares muito bons.

Com relação à ligação cruzada:

- Foi realizado um estudo sistemático da reatividade de ésteres de NHS frente aos aminoácidos com grupos nucleófilos na cadeia lateral. Ficou comprovado que os ésteres de NHS reagem com cadeias laterais nucleofílicas quando o pH da solução tampão é alterado. Além disso, a ALC mostrou ser mais reativo frente ao grupo tiol da cadeia lateral da cisteína do que em relação ao grupo  $\epsilon$ -amino da cadeia lateral da lisina. Essa reatividade foi demonstrada tanto em peptídeos modelo quanto em proteínas.

Com relação ao estudo realizado sobre a reação de hidrólise do DSS pode ser observado que o aumento do valor de pH da solução tampão faz aumentar a velocidade da reação de hidrólise do ALC. Entretanto, foi possível verificar também que em valores maiores de pH, a reação entre o ALC e as cadeias laterais dos aminoácidos também se torna mais rápida, devido o aumento da nucleofilicidade das cadeias laterais. No estudo competitivo, fica claro que utilizar condições mais básicas para reações de ligação cruzada aumenta o rendimento da reação.

## 6. Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Davis R., Frearson M., *Mass Spectrometry – Analytical Chemistry by Open Learning*, John Wiley & Sons, London **1987**.
- <sup>2</sup> Munson M.S.B.; Field, F.H., *Chemical Ionization Mass Spectrometry*. I. General Introduction **1966**.
- <sup>3</sup> Thorgersen D. F., Skowronsky, R. P., Macfarlane, R. D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1974**, 60, 616.
- <sup>4</sup> Harkansson, P., Kamenski, I., Sundquist, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 2498.
- <sup>5</sup> Barber M., Bordoli R. S., Sedwick R. D., Tyler, A. N., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, 7, 325.
- <sup>6</sup> Cotter R.J., *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 485A.
- <sup>7</sup> Hoffmann E., Stroobant V., *Mass Spectrometry – Principles and Applications*, Willey, Third Edition. **2007**.
- <sup>8</sup> Adams M. A.; Suits M. D. L.; Zheng J.; Jia Z. *Proteomics*, **2007**, 7, 2920-2932.
- <sup>9</sup> Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Whitehouse, C.M., *Science*, **1989**, 104, 2498.
- <sup>10</sup> Karas, M., Hillenkamp, F., *Anal. Chem*, **1988**, 60, 2299.
- <sup>11</sup> Kinter M.; Sherman N. E. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, New York, John Wiley & Sons, **2000**.
- <sup>12</sup> Lopes, N. P.; Crotti, E. M.; Vessechi, R.; Lopes, J. L. C.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 2.
- <sup>13</sup> Fersht A. *Structure and Mechanism in Protein Science*. Cambridge, W. H. Freeman, **1999**.
- <sup>14</sup> Bai H.; Ma W.; Liu S.; Lai L. *Proteins*, **2008**, 70, 1323-1331,.
- <sup>15</sup> Aebersold R.; Goodlett D. R., *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 269.
- <sup>16</sup> Aebersold R.; Mann M., *Nature*, **2003**, 422, 198-207.
- <sup>17</sup> Patterson S. D.; Aebersold R., *Nature Genet.*, **2003**, 33, 311-323.
- <sup>18</sup> Steen H.; Mann M., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, 5, 699-711.
- <sup>19</sup> Yates III J. R., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 297-316, 2004.
- <sup>20</sup> Domon B.; Aebersold R., *Science*, **2006**, 312, 212-218.

- 
- <sup>21</sup> Cravatt B. F.; Simon G. M.; Yates III J. R.; *Nature*, **2007**, 450, 991-1000.
- <sup>22</sup> Alber F.; Förster F.; Korkin D.; Topf M.; Sali A., *Annu. Rev. Biochem.*, **2008**, 77, 443-477.
- <sup>23</sup> Sali A.; Glaeser R.; Earnest T.; Baumeister W. *Nature*, **2003**, 422, 216-225.
- <sup>24</sup> [www.pdb.org](http://www.pdb.org), acessado em 18 de abril de 2010
- <sup>25</sup> Puglise J. D., *Nature*, 450, **2007**, 1171-1172.
- <sup>26</sup> E. P. Romijn, J. Krijgsveld, A.J. R. Heck; *J. Chrom. A* **2003**, 6 (1-6), 589-608.
- <sup>27</sup> Y. Jin, Y. Yin, H. Fu, Y. Jiang, Y. Zhao; *Int. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 248 (3), 108-114
- <sup>28</sup> S. A. Carr; *Dav. Drugs Del. Reviews*, **1989**, 4 (2), 113-147
- <sup>29</sup> Hunt D. F.; Zhu N. Z.; Shabanowitz, *J. Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1989**, 3, 122-124..
- <sup>30</sup> Hunt D. F.; Henderson R. A.; Shabanowitz J.; Sakaguchi K.; Michel H.; Sevilir N.; Cox A. L.; Appella E.; Engelhard V. H. *Science*, **1992**, 255, 1261-1263.
- <sup>31</sup> Covey T. R.; Huang E. C.; Henion J. D., *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 1193-1200,.
- <sup>32</sup> Patterson D. H.; Tarr G. E.; Regnier F. E.; Martin S. A., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 3971-3978.
- <sup>33</sup> James P.; Quadroni M.; Carafoli E.; Gonnet G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 58-64,
- <sup>34</sup> Yates III J. R.; Speicher S.; Griffin P. R.; Hunkapiller T., *Anal. Biochemistry*, **1993**, 214, 397-408,
- <sup>35</sup> Henzel W. J.; Billeci T. M.; Stults J. T.; Wong S. C.; Grimley C.; Watanabe C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 5011-5015.
- <sup>36</sup> Eng J. K.; McCormack A. L.; Yates III J. R., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, 5, 976-989,.
- <sup>37</sup> Pappin D. J. C.; Hojruo P.; Bleasby A., *J. Curr. Biol.*, **1993**, 3, 327-332.
- <sup>38</sup> Bieman K.; Scoble H. A., *Science*, **1987**, 237, 992-998.
- <sup>39</sup> Oda Y.; Huang K.; Cross F. R.; Cowburn D.; Chait B. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 6591-6596.
- <sup>40</sup> Gygi S. P.; Rist B.; Gerber S. A.; Turecek F.; Gelb M. H.; Aebersold R., *Nature Biotechnol.*, **1999**, 17, 994-999.

- 
- <sup>41</sup> Benesch J. L. P.; Ruotolo B. T.; Simmons D. A.; Robinson C. V. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 3544-3567.
- <sup>42</sup> Loo J. A. *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, 16, 1-23.
- <sup>43</sup> Heck A. J. R.; van den Heuvel R. H. H. *Mass. Spectrom. Rev.*, **2004**, 23, 368-389.
- <sup>44</sup> Steen H.; Mann M., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, 5, 699-711.
- <sup>45</sup> Yates III J. R., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2004**, 33, 297-316,.
- <sup>46</sup> Domon B.; Aebersold R., *Science*, **2006**, 312, 212-218.
- <sup>47</sup> Cravatt B. F.; Simon G. M.; Yates III J. R.; *Nature*, **2007**, 450, 991-1000.
- <sup>48</sup> Gingras A. C.; Gstaiger M.; Raught B.; Aebersold R., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, 8, 645-654,.
- <sup>49</sup> Berggard T.; Linse S.; James P., *Proteomics*, **2007**, 7, 2833-2842.
- <sup>50</sup> Zhou M.; Veenstra T. D., *Proteomics*, **2007**, 7, 2688-2697.
- <sup>51</sup> Wodak S. J.; Pu S.; Vlasblom J.; SérapHin B., *Mol. Cell. Proteomics*, **2009**, 8, 3-18.
- <sup>52</sup> Hoofnagle A. N.; Resing K. A.; Ahn N. G., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2003, 32, 1-25,
- <sup>53</sup> Yan X.; Watson J.; Ho P.S; Deinzer M. L., *Mol. Cell. Proteomics*, 2004, 3, 10-23.
- <sup>54</sup> Busenlehner L. S.; Armstrong R. N., *Arch. Biochemistry Biophys.*, **2005**, 433, 34-46,
- <sup>55</sup> Englander S. W., Kallenbach N. R., *Q Rev Biophys.* **1983**, 16(4), 521-655.
- <sup>56</sup> McLafferty F. W.; Guan Z.; Haupts U.; Wood T. D.; Kelleher N. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4732-4740.
- <sup>57</sup> Carulla N.; Caddy G. L.; Hall D. R.; Zurdo J.; Gairí M.; Feliz M.; Giralt E.; Robinson C. V.; Dobson C. M., *Nature*, **2005**, 436, 554-558.
- <sup>58</sup> Wang F.; Li W.; Emmett M. R.; Hendrickson C. L.; Marshal A. G.; Zhang Y. L.; Wu L.; Zhang Z. Y., *Biochemistry*, **1998**, 37, 15289-15299.

- 
- <sup>59</sup> Eyles S. J.; Speir J. P.; Kruppa G. H.; Gierasch L. M.; Kaltashov I. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 495-500.
- <sup>60</sup> Mandell J. G.; Falick A. M.; Komives E. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 14705-14710,.
- <sup>61</sup> Katta V.; Chait B. T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, 5, 214-217.
- <sup>62</sup> Ganem B.; Li Y. T.; Henion J. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7818-7819,.
- <sup>63</sup> Carulla N.; Caddy G. L.; Hall D. R.; Zurdo J.; Gairí M.; Feliz M.; Giralt E.; Robinson C. V.; Dobson C. M., *Nature*, **2005**, 436, 554-558.
- <sup>64</sup> Wang F.; Li W.; Emmett M. R.; Hendrickson C. L.; Marshal A. G.; Zhang Y. L.; Wu L.; Zhang Z. Y., *Biochemistry*, **1998**, 37, 15289-15299.
- <sup>65</sup> Eyles S. J.; Speir J. P.; Kruppa G. H.; Gierasch L. M.; Kaltashov I. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 495-500.
- <sup>66</sup> Mandell J. G.; Falick A. M.; Komives E. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 14705-14710,.
- <sup>67</sup> Juhasz P.; Biemann K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 4333-4337, 270.
- <sup>68</sup> Hyzer C. S. H.; Counterman A. E.; Clemmer D. E., *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 3037-3080.
- <sup>69</sup> Jarrold M. F., *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2000**, 51, 179-207,
- <sup>70</sup> McLean J. A.; Ruotolo B. T.; Gillig K. J.; Russell D. H., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2005**, 240, 301-315.
- <sup>71</sup> Ruotolo B. T.; Robinson C. V., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, 10, 402-408,
- <sup>72</sup> Kanu A. B.; Dwivedi P.; Tam M.; Matz L.; Hill Jr. H. H. *J. Mass Spectrom.*, **2008**, 43, 1-22,.
- <sup>73</sup> Shelimov K. B.; Clemmer D. E.; Hudgins R. R.; Jarrold M. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2240-2248,.
- <sup>74</sup> Shelimov K. B.; Jarrold M. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2987-2994,.
- <sup>75</sup> Koeniger S. L.; Merenbloom S. I.; Clemmer D. E., *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 7017-7021.
- <sup>76</sup> Shvartsburg A. A.; Li F.; Tang K.; Smith R. D., *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 3304-3315.
- <sup>77</sup> Jarrold M. F., *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 360-367.

- 
- <sup>78</sup> Ruotolo B. T.; Giles K.; Campuzano I.; Sandercock A. M.; Bateman R. H.; Robinson C. V., *Science*, **2005**, 310, 1658-1661,.
- <sup>79</sup> Bernstein S. L.; Wyttenbach T.; Baumketner A.; Shea J. E.; Bitan G.; Teplow D. B.; Mowers M. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 2075-2084,
- <sup>80</sup> Loo J. L.; Berhane B.; Kaddis C. S.; Wooding K. M.; Xie Y.; Kaufman S. L.; Chernushevich I. V., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**, 16, 998-1008.
- <sup>81</sup> Wyttenbach T.; Helden G.; Bowers M. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 8355-8364,
- <sup>82</sup> Bernstein S. L.; Liu D.; Wyttenbach T.; Bowers M. T.; Lee J. C.; Gray H. B.; Winkler J. R. J., *Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 1435-1443.
- <sup>83</sup> Guan, J.Q. and Chance, M.R., *In Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine (Meyers, R.A., ed.)*, **2004**, pp. 549–568, Wiley-VCH
- <sup>84</sup> Takamoto, K. and Chance, M., *In Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine (Myers, R.A., ed.)*, **2004**, pp. 569–578, Wiley-VCH
- <sup>85</sup> Galas, D.J. and Schmitz, A., *Nucleic Acids Res.* **1978**, 5, 3157–3170
- <sup>86</sup> Schmitz, A. and Galas, D.J., *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 6, 111–137
- <sup>87</sup> Hanai R., Wang J. C., *Proc. Natl. Acad Sci USA*, **1994**, 91, 11904.
- <sup>88</sup> Jay D. G. J., *Biol. Chem.*, **1984**, 259, 15572-15578,
- <sup>89</sup> Heyduk E., Heyduk T., *Biochemistry*, **1994**, 33, 9643.
- <sup>90</sup> Takamoto K., Chance M. R., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2006**, 35:251–76.
- <sup>91</sup> Garrison W. M., *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 381-398.
- <sup>92</sup> Maleknia S. D.; Brenowitz M.; Chance M. R., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 3965-3973.
- <sup>93</sup> Xu G, Chance MR., *Anal. Chem.*, **2005**, 77:4549–55
- <sup>94</sup> Maleknia S. D.; Brenowitz M.; Chance M. R., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 3965-3973.
- <sup>95</sup> Xu G.; Chance M. R., *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 2437-2449.
- <sup>96</sup> Xu G.; Chance M. R. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 4549-4555.
- <sup>97</sup> Sharp, J.S. et al. *Anal. Biochem.* **2003**, 313, 216–225
- <sup>98</sup> Tong X, Wren J. C, Konermann L., *Anal. Chem*, **2008**, 80, 2222-2231

- 
- <sup>99</sup> Guan J.Q., Chance M.R., *TRENDS in Biochemical Sciences*, **2005**, 30, 583.
- <sup>100</sup> Gupta S., Sullivan M., Toomey J., Kiselar J, Chance M.R., *J. Synchrotron Rad.*, **2007**, 14, 233–243
- <sup>101</sup> Xu G, Takamoto K., Chance M. R., *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 6995-7007.
- <sup>102</sup> Xu G., Chance M. R., *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1213-1221.
- <sup>103</sup> Sharp J. S., Becker J. M., Hettich R. L., *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 672-683
- <sup>104</sup> Sharp J. S., Guo J., Uchiki T., Xu Y, Dealwis C., Hettich R. L., *Anal. Biochem*, **2005**, 340 201–212.
- <sup>105</sup> D. M Hambly.; M. L.Gross; *Int, J, Mass Spectrom.***2007**, 259, 124-129.
- <sup>106</sup> D. M.Hambly; M. L.Gross; *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, **2005**, 16, 2057-2063.
- <sup>107</sup> Kamal J. K. A.; Chance M. R., *Protein Sci.*, **2008**, 17, 79-94.
- <sup>108</sup> Zheng X.; Wintrode P. L.; Chance M. R, *Structure*, **2008**, 16, 38-51.
- <sup>109</sup> Maleknia S. D.; Downard K. M., *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 5578-5588.
- <sup>110</sup> Chance M. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 287, 614-621.
- <sup>111</sup> Volman, D. H.; Chen, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 4141.
- <sup>112</sup> Weeks, J. L.; Matheson, M. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1273.
- <sup>113</sup> Dainton, F. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1278.
- <sup>114</sup> Macgregor, R. B., *Jr. Anal. Biochem.* **1992**, 204, 324.
- <sup>115</sup> Aye, T. T.; Low, T. Y.; Sze, S. K., *Anal. Chem.* **2005**, 77, 5814.
- <sup>116</sup> Zhang H., Gross M.L., *Pôster ASMS*, **2005**.
- <sup>117</sup> Bernstein S. L.; Wytttenbach T.; Baumketner A.; Shea J. E.; Bitan G.; Teplow D. B.; Mowers M.T.J. *Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 2075-2084.
- <sup>118</sup> Xu G.; Chance M. R., *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 3514-3543.
- <sup>119</sup> Xu G.; Takamoto K.; Chance M. R., *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 6995-7007.
- <sup>120</sup> Chelius D.; Bondarenko P. V., *J. Proteome Res.*, **2002**, 1, 317-323.
- <sup>121</sup> Claiborne, A.; Mallett, T. C.; Yeh, J. I.; Luba, J.; Parsonage, D., *Adv. Protein Chem.* **2001**, 58, 215.
- <sup>122</sup> Petrotchenko E. V.; Olkhovik V. K.; Borchers C. H. *Mol. Cell. Proteomics*, **2005**, 4, 1167-1179.
- <sup>123</sup> van Vlijmen, H. W.; Gupta, A.; Narasimhan, L. S.; Singh, J., *J. Mol. Biol.* **2004**, 335, 1083.

- 
- <sup>124</sup> Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem.* **1988**, *17*, 513.
- <sup>125</sup> El-Shafey A.; Tolic N.; Young M. M.; Sale K.; Smith R. D.; Kery V. *Protein Sci.*, **2006**, *15*, 429-440.
- <sup>126</sup> Wells J. A.; McClendon C. L., *Nature* **2007**, *450*, 1001-1009.
- <sup>127</sup> Fujioka M., Takata Y., Konishi K., Ogawa H., *Biochem.* **1987**, *26*, 5696
- <sup>128</sup> Duggleby K. G., Kaplan H., *Biochem.*, **1975**, *14*, 5168.
- <sup>129</sup> Schewale J. G., Brew. K., *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 9406.
- <sup>130</sup> Chothia C., *Annu. Ver. Biochem.*, **1984**, *53*, 537.
- <sup>131</sup> Wong S. S. *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*. CRC Press, **1991**.
- <sup>132</sup> Hermanson G. T. *Bioconjugate Techniques*. 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier, **2008**.
- <sup>133</sup> Sinz, A. *Mass. Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 663.
- <sup>134</sup> Staros J. V. ,*Biochemistry*, **1982**, *21*, 3950.
- <sup>135</sup> Back J. W.; Jong L.; Muijsers A. O.; Koster C. G., *J. Mol. Biol.*, **2003**, *331*, 303-313.
- <sup>136</sup> Hung B. X.; Kim H. Y.; Dass C., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, *15*, 1237-1247.
- <sup>137</sup> Dihazi G. H.; Sinz A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**,*17*, 2005-2014.
- <sup>138</sup> Lee Y. J.; Lackner L. L.; Nunnari J. M.; PHinney B. S., *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 3908-3917.
- <sup>139</sup> Rappsilber J.; Siniosoglou S.; Hurt E. C.; Mann M., *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 267-275.
- <sup>140</sup> El-Shafey A.; Tolic N.; Young M. M.; Sale K.; Smith R. D.; Kery V., *Protein Sci.* **2006**,*15*, 440.
- <sup>141</sup> Kitatsuji C.; Kuroguchi M.; Nishimura S. I.; Ishimori K.; Wakasugi K. *J. Mol. Biol.*, **2007** *368*, 150-160.
- <sup>142</sup> Carven G. J.; Stern L. J., *Biochemistry* **2005**, *44*, 13625-13637.
- <sup>143</sup> Bhat S.; Sorci-Thomas M. G.; Alexander E. T.; Samuel M. P.; Thomas M. J., *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33015-33025.
- <sup>144</sup> Huang B. X.; Kim H. Y., *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1045-1053.

- 
- <sup>145</sup> Gertz M.; Seelert H.; Dencher N. A.; Poetsch A., *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1774, 566-574.
- <sup>146</sup> Suchanek M.; Radzikowska A.; Thiele C., *Nat. Methods* **2005**, 2, 261-268.
- <sup>147</sup> Taverner T.; Hall N. E.; O'Hair R. A. J.; Simpson R. J., *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 46487-46492.
- <sup>148</sup> Chang Z.; Kuchar J.; Hausinger R. P., *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 15305-15313.
- <sup>149</sup> Azim-Zadeh O.; Hillebrecht A.; Linne U.; Marahiel M. A.; Klebe G.; Lingelbach K.; yalwidhe J., *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 21609-21617,.
- <sup>150</sup> Pimenova T.; Nazabal A.; Roschitzki B.; Seebacher J.; Rinner O.; Zenobi R., *J. Mass Spectrom.* **2008**, 43, 185-195,.
- <sup>151</sup> Gabant G.; Augier J.; Armengaud J. *J. Mass Spectrom.* **2008**, 43, 360-370.
- <sup>152</sup> Swaim C. L., Smith J. B., Smith D. L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 736.
- <sup>153</sup> Means, G. E., Feeney, R. E., *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, San Francisco, **1971**.
- <sup>154</sup> Kruppa G. H.; Schoeniger J.; Young M. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, 17, 155-162.
- <sup>155</sup> Schilling B.; Row R. H.; Gibson B. W.; Guo X.; Young M. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, 14, 834-850.
- <sup>156</sup> Roepstorff P.; Fohlman J. *Biomed. Mass Spectrom.*, **1984**, 11, 601.
- <sup>157</sup> M. Bern, Y. Cai, D. Goldberg; *Anal. Chem.* **2007**, 79 (4), 1393-1400.
- <sup>158</sup> Tong, X; Wren, JC; Konermann, L, *Anal. Chem.* **2008**, 80(6), 2222-2231.
- <sup>159</sup> Bondarenko P. V.; Chelius D.; Shaler T. A., *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 4741-4749.
- <sup>160</sup> Chelius D.; Bondarenko P. V. , *J. Proteome Res.*, **2002**, 1, 317-323.
- <sup>161</sup> Wang W.; Zhou H.; Lin H.; Roy S.; Shaler T. A.; Hill L. R.; Norton S.; Kumar P.; Anderle M.; Becker C. H., *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 4818-4826.
- <sup>162</sup> B. B. Stocks, Konermann L., *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 20-27.
- <sup>163</sup> L. Konermann, B. B. Stocks, Y. Pan, and X. Tong *Mass Spectrom. Rev.* in press **2009**.
- <sup>164</sup> Mädler S., Bich C., Touboul D., Zenobi R., *J. Mass. Spectrom.* , **2009**, 44, 694–706

- 
- <sup>165</sup> Cuatrecasas P., Parikh I., *Biochemistry*, **1981**, 20, 6754.
- <sup>166</sup> Huddleston M. J.; Bean M. F.; Carr S. A. *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 877-884.
- <sup>167</sup> Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt, *Fundamentos de Bioquímica*, Ed. Artmed, **2000**.
- <sup>168</sup> Demasi M, Filho G M. P, Castro L. M., Ferreira J. C., Rioli V., Ferro E. S., *Free Radical Biology & Medicine* **2008**, 44, 1180.
- <sup>169</sup> Pierce Biotechnology, *Determine reactivity of NHS ester biotinylation and cross-linking reagents*, *Technical Resource*.
- <sup>170</sup> Lindsay, G. G., *FEBS Lett.*, **1972**, 21, 105.
- <sup>171</sup> Vanin, E. F., Ji T. H., *Biochemistry*, **1981**, 20, 6754.
- <sup>172</sup> Cuatrecasas P., Parikh I., *Biochemistry*, **1972**, 11, 2291.
- <sup>173</sup> Lomant A. J., Fairbanks G., *J. Mol. Biol.*, **1976**, 104, 243.