



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica



Dissertação de Mestrado

***Estudos Fundamentais em Proteômica Estrutural:
Agentes de Ligação Cruzada Fotoativáveis e
Mudanças Conformacionais por Mobilidade Iônica***

Alexandre Ferreira Gomes

Orientador: Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo

**Campinas-SP
Julho de 2010**

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

G585e	<p>Gomes, Alexandre Ferreira. Estudos fundamentais em proteômica estrutural: agentes de ligação cruzada fotoativáveis e mudanças conformacionais por mobilidade iônica / Alexandre Ferreira Gomes. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.</p> <p>Orientador: Fábio Cesar Gozzo.</p> <p>Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Espectrometria de massas. 2. Proteômica. 3. Proteínas. 4. Mobilidade iônica. I. Gozzo, Fábio Cesar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Fundamental studies on structural proteomics: photoactivatable cross-linkers and conformational changes probed by ion mobility mass spectrometry

Palavras-chaves em inglês: Mass spectrometry, Proteomics, Proteins, Ion mobility

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora: Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo (orientador), Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro (ICB-USP) Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 30/07/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo (Orientador)

Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro (ICB-USP)

Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (IQ-UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **ALEXANDRE FERREIRA GOMES**, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de julho de 2010.

Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo
(Presidente da Banca)

*“Ice is forming on the tips of my wings
Unheeded warnings,
I thought I thought of everything
No navigator to find my way home
Unladen, empty and turned to stone*

*A soul in tension that's learning to fly
Condition grounded, but determined to try
Can't keep my eyes from the circling skies
Tongue-tied and twisted,
Just an earth-bound misfit, I... ”*

(Pink Floyd – Learning to Fly)

*Dedico esta dissertação
aos meus pais Eduardo e Márcia
e à minha namorada Marina,
por todo o carinho, amor e paciência
nesta etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Fabio Cesar Gozzo. Pela orientação e excelentes ensinamentos, desde a disciplina no LNLS até os dias de hoje, pela paciência, discussões científicas e ótimo convívio, por ter me acolhido no grupo de pesquisa e acreditado em mim.

Aos meus pais, Eduardo e Márcia, pelo carinho e paciência, por representarem todas as minhas bases como ser humano, e pelo apoio e incentivo incondicionais durante toda a minha vida. Sem vocês eu jamais chegaria até aqui. Aos meus tios Marina, João, Walter, Cláudia e Lygia, avós Antônio e Hermelinda e primos João Henrique, Daniel, Gabi e Raquel, por todo o incentivo e apoio. À minha avó Flora e avô Constantino (*in memoriam*), que sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

À Marina, pelo apoio incondicional, por todo o amor, carinho e companhia, por aguentar minhas teimosias e dias ranzinzas, e por compartilhar a vida comigo. Te amo muito!

Aos colegas do antigo Grupo MAS, atual Laboratório Dalton de Espectrometria de Massas, pelo ótimo convívio e amizade. São poucos, mas cada um tem suas características especiais e eu aprendi com todos: Alana, Amadeu, Carol, Eduardo Pilau, Luiz, e os mais novos, Mariana e Hugo. Agradeço especialmente ao Amadeu e Luiz, por toda a ajuda e paciência, principalmente ao me ensinar a trabalhar nessa área.

Ao Prof. Marcos Eberlin e a equipe do ThoMSon, por todo o apoio desde nossa época no LNLS até os dias de hoje, e principalmente por nos abrigar durante a nossa mudança para o IQ, como se fôssemos seus próprios alunos. Incontáveis vezes utilizamos diversos equipamentos e emprestamos muitos materiais, sem os quais ficaria muito mais difícil trabalhar.

Ao Prof. Munir Skaf e ao Paulo de Souza, pelas colaborações, por todo o auxílio indispensável nas simulações de dinâmica molecular e cálculos de seções de choque teóricas e pelas ótimas discussões científicas.

Ao Prof. Ronaldo Pilli e os colegas de lab da época de síntese orgânica, muitos dos quais foram as bases para o conhecimento que tenho hoje: Roberta, Ilton, Cilene, Manoel, Diogo, Francisco, César, Léo, Luís Gustavo, Luiz Galáctico, Nilton, Mayra, Betinho, Leila, Andréa, Vanessa C., Vanessa G., Renan, Lucas e a todos os outros colegas do andar, uma grande família praticamente.

Aos amigos de Campinas: os que restaram do colegial, Klaus, Flávia, Zé Octávio, Filéps e Stefan, pela grande amizade; e aos colegas e senseis do Senshin, pelos treinos fantásticos e excelente convívio. Aos amigos do antigo

fórum espalhados pelo Brasil e pelo mundo, pela ótima amizade e convívio. Muitos estão distantes mas ficarão na memória para sempre.

Aos vários especialistas de aplicações e engenheiros da Waters, por toda a ajuda e suporte. Em especial ao Wladimir, grande amigo que sempre nos socorre em momentos de pânico instrumental, ao Gustavo pelo apoio e discussões sobre mobilidade iônica, ao Michael pela oportunidade do curso e apoio, e ao Steve McDonald pelo curso e ensinamentos de calibração da cela de mobilidade iônica. Ao Renato, da Simetria, grande amigo e sempre prestativo.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela infraestrutura e por seus vários funcionários que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Aos funcionários das oficinas mecânica e eletrônica, à Rita e ao Jose pelo apoio e empréstimos durante a mudança para o IQ e por dividir o espaço de laboratório conosco, e aos funcionários da CPG por todo o suporte durante esse período.

Ao LNLS, pela infraestrutura e por seus vários funcionários que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Ao pessoal das oficinas pela construção ultra-rápida da fonte de luz UV, à Margareth, Thais, Renata e mais recentemente ao Prof. Kleber Franchini, Prof^a. Adriana Leme e Bianca, pela disponibilidade no uso das instalações.

À FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro.

A Deus, que torna tudo possível.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Alexandre Ferreira Gomes

Data de Nascimento: 05/10/1984

Endereço Eletrônico: alexandrefgo@gmail.com

Formação Acadêmica

- 08/2008 – 07/2010 **Mestrado em Química Orgânica**
Agência Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- 03/2004 – 12/2007 **Bacharelado em Química**
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Produção Científica

Artigos Aceitos para Publicação

- **Gomes, A. F.**; Gozzo, F. C. *Protein chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI- and ESI-MS/MS. Journal of Mass Spectrometry, 2010.*
- Santos, L. F. A.; Iglesias, A. H.; Pilau, E. J.; **Gomes, A. F.**; Gozzo, F. C. *Traveling-wave ion mobility mass spectrometry analysis of isomeric modified peptides arising from chemical cross-linking. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010.*

Trabalhos Apresentados em Eventos

- Santos, M. R.; Diniz, J. R.; Arouca, A. M.; **Gomes, A. F.**; Gozzo, F. C.; Suarez, P. A. Z.; Neto, B. A. D. *Novo catalisador de Fe (III) ionicamente marcado para epoxidação de olefinas com oxigênio do ar suportado em líquidos iônicos.* Painel. Evento: 33ª RASBQ - Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Maio de 2010, Águas de Lindóia, SP.

- Diniz, J. R.; Arouca, A. M.; Santos, M. R.; **Gomes, A. F.**; Gozzo, F. C.; Suarez, P. A. Z.; Neto, B. A. D. *Epoxidação do oleato de metila com H₂O₂ catalisada por um novo complexo de ferro(III) suportado em líquidos iônicos imidazólicos*. Painel. Evento: 33ª RASBQ - Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Maio de 2010, Águas de Lindóia, SP.
- Gozzo, F. C.; Santos, L. F. A.; Iglesias, A. H.; Pilau, E. J.; **Gomes, A. F.** *Traveling-wave ion mobility mass spectrometry analysis of isomeric modified peptides arising from chemical cross-linking*. Painel. Evento: 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Maio de 2010, Salt Lake City, UT.
- **Gomes, A. F.**; Gozzo, F. C. *Analysis of cross-linked proteins by travelling-wave ion mobility mass spectrometry*. Painel. Evento: 3º BrMASS - Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, Dezembro de 2009, Campinas, SP.
- Pilau, E. J. ; **Gomes, A. F.**; Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z.; Gozzo, F. C. *Protein footprinting by peroxide photolysis using Hg lamp and 213 nm laser as radiation sources*. Painel. Evento: 3º BrMASS - Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, Dezembro de 2009, Campinas, SP.
- Santos, L. F. A.; Iglesias, A. H.; Pilau, E. J.; **Gomes, A. F.**; Gozzo, F. C. *Use of ion mobility mass spectrometry to analyze single dead-end isomers arising from peptide cross-linking*. Painel. Evento: 3º BrMASS - Congresso da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, Dezembro de 2009, Campinas, SP.
- **Gomes, A. F.**; Gozzo, F. C. *ESI- and MALDI-MS/MS analysis of intramolecular cross-linked peptides with a photoactivated NHS-diazirine cross-linker*. Painel. Evento: 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Maio de 2009, Philadelphia, PA.
- Pilau, E. J.; **Gomes, A. F.**; Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z.; Gozzo, F. C. *Protein footprinting by peroxide photolysis using Hg lamp and 213 nm laser as radiation sources*. Painel. Evento: 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Maio de 2009, Philadelphia, PA.

Outras Produções

01/2006 – 12/2007

Iniciação Científica

Título: *Síntese de Análogo da Pironetina*

Agência Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

“ESTUDOS FUNDAMENTAIS EM PROTEÔMICA ESTRUTURAL: AGENTES DE LIGAÇÃO CRUZADA FOTOATIVÁVEIS E MUDANÇAS CONFORMACIONAIS POR MOBILIDADE IÔNICA”

Aluno: Alexandre Ferreira Gomes
Orientador: Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo

A aplicação da espectrometria de massas (MS) em análises proteômicas tem evoluído extensivamente, a ponto de se tornar rotineira no seqüenciamento e identificação de proteínas e determinação de modificações pós-traducionais. Entretanto, o uso de MS na análise de estruturas tridimensionais de proteínas é restrito, apesar das inúmeras vantagens potenciais que poderia apresentar nessa área. Nesse âmbito, a metodologia de ligação cruzada acoplada a MS visa obter informações estruturais de proteínas e complexos protéicos pela determinação de restrições espaciais de distância entre resíduos de aminoácidos, mediante reação com compostos bifuncionais, proteólise enzimática e análise dos peptídeos resultantes por MS. A primeira parte deste trabalho descreve a aplicação de um novo agente de ligação cruzada (ALC) heterobifuncional e clivável, contendo um grupo fotoativável do tipo diazirina, para formar ligações cruzadas em peptídeos e proteínas. O emprego desse ALC permitiu obter ligações cruzadas únicas nos alvos estudados, e os peptídeos modificados assim formados foram caracterizados por MS/MS, possibilitando a descoberta de um íon marcador característico para peptídeos ligados por esse ALC. A segunda parte do trabalho envolveu a aplicação da técnica de mobilidade iônica TWIM acoplada a MS na análise de íons de proteínas antes e após modificação por ALC, visando avaliar o efeito dessas modificações em termos de variações de seção de choque de colisão (CCS). Análises assim feitas demonstraram a presença de estruturas mais rígidas e com menor CCS após a adição de moléculas de ALC, evidenciando a existência de conformações mais compactas em fase gasosa após a reação de ligação cruzada para proteínas. Para validar a metodologia, os valores de CCS experimentais foram comparados com valores teóricos calculados computacionalmente para estruturas disponíveis.

ABSTRACT

“FUNDAMENTAL STUDIES ON STRUCTURAL PROTEOMICS: PHOTOACTIVATABLE CROSS-LINKERS AND CONFORMATIONAL CHANGES PROBED BY ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY”

Author: Alexandre Ferreira Gomes
Supervisor: Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo

The use of mass spectrometry (MS) in proteomics has evolved extensively, up to the point where it became routinely employed in protein sequencing and determination of post-translational modifications. However, the use of MS in structural studies of proteins is limited, despite the many advantages it could bring to the area. In this sense, chemical cross-linking coupled to mass spectrometry for structural studies of proteins aims to obtain structural information in terms of spatial distance restrictions, determined by intra- and intermolecular cross-links between side chains of amino acid residues. This is achieved by reaction of the target protein system with bifunctional compounds, followed by proteolysis and analysis of the modified peptides by MS. The first part of this work describes the application of a novel, heterobifunctional and cleavable cross-linker, containing a diazirine photoactivatable group, for cross-linking of peptides and proteins. Reaction with this cross-linker yielded unique cross-links for peptides and proteins, and such modified peptides were characterized by MS/MS, allowing the discovery of a marker ion, that may be used to identify cross-linked peptides. The second part of the work focused on the application of traveling-wave ion mobility (TWIM) coupled to MS for a comparative analysis of protein ions both before and after cross-linking reactions, aiming to evaluate the effect of these modifications on protein structures in terms of variation of collision cross sections (CCS) of their ions. TWIM-MS analysis of these systems demonstrated the presence of compact gas phase conformations of lower CCS after the cross-linking reaction and formation of intramolecular cross-links, indicating that chemical cross-linking restricts the structural dynamics of gas phase protein ions. To validate this method, experimental CCS values were then compared with theoretical values obtained computationally for available crystallographic or NMR structures.

SUMÁRIO

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Espectrometria de massas na análise de proteínas	1
1.2. Ligação cruzada e análise por MS para estudos de estruturas superiores de proteínas	3
1.3. Desafios da metodologia de ligação cruzada com análise por MS	6
2. Capítulo I – Agentes de Ligação Cruzada Fotoativáveis	9
2.1. Introdução	9
2.2. Objetivos	14
2.3. Procedimento Experimental	15
2.3.1. Materiais	15
2.3.2. Reação do SDAD com peptídeos.....	15
2.3.3. Reação do SDAD com mioglobina	18
2.3.4. Análise por MS	19
2.3.5. Identificação de produtos de ligação cruzada em experimentos de LC-MS/MS.....	20
2.4. Resultados e Discussão	22
2.4.1. Monitoramento das etapas de reação de ligação cruzada por MALDI(+)-QTOF-MS	22
2.4.2. Identificação de resíduos modificados pelo SDAD por MS/MS	30
2.4.3. Análise por LC-MS e MS/MS de ligação cruzada com SDAD em mioglobina.....	33
2.5. Conclusão	38
3. Capítulo II – Análise de mudanças conformacionais por mobilidade iônica acoplada a MS de proteínas contendo ligação cruzada	39
3.1. Introdução	39
3.2. Objetivos	47

3.3. Procedimento Experimental	48
3.3.1. Materiais	48
3.3.2. Reações de ligação cruzada com DSS e DSSeb	48
3.3.3. Análise por TWIM-MS	49
3.3.4. Cálculos de valores de CCS teóricos	51
3.4. Resultados e Discussão	52
3.4.1. Calibração da cela de TWIM para cálculos de CCS	52
3.4.2. Comparações de CCS para condição desnaturante	56
3.4.3. Comparações de CCS para condição nativa	61
3.4.4. Comparações entre CCS experimentais e teóricas	66
3.5. Conclusão	69
4. Referências bibliográficas	70

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

α-CHCA	Ácido α -ciano-4-hidróxicinâmico
ALC	Agente(s) de ligação cruzada
ATD	Distribuição por tempo de chegada (<i>Arrival time distribution</i>)
CCS	Seção de choque de colisão (<i>Collision cross section</i>)
CD	Espectroscopia de dicroísmo circular (<i>Circular dichroism</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>Collision induced dissociation</i>)
Da	Dalton (1 Da = $1,661 \cdot 10^{-24}$ g)
DC	Cela de mobilidade iônica do tipo <i>Drift cell</i>
DDA	Análise dependente de dados (<i>Data dependent analysis</i>)
DE	Modificação simples formada pela ligação de um dos grupos do ALC, antes ou após a hidrólise do outro (<i>dead-end</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DSS	Suberato de <i>N,N</i> -disuccinimidila
DSSeb	Sebacato de <i>N,N</i> -disuccinimidila
DT	Tempo de deslocamento (<i>Drift time</i>)
DTT	Ditiotreitol
EHSS	Método do espalhamento de esferas rígidas para cálculo de CCS (<i>Exact hard spheres scattering</i>)
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i> (<i>Electrospray ionization</i>)
FTICR	Analisador de massas do tipo ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IM	Mobilidade iônica (<i>Ion mobility</i>)

MALDI	Ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>)
MCP	Detector do tipo placa multicanais (<i>Multi-channel plate</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
MWCO	Peso molecular de corte (<i>Molecular weight cut-off</i>)
Nd:YAG	Granada de ítrio-alumínio ($Y_3Al_5O_{12}$) dopada com neodímio (<i>Neodymium-doped yttrium-aluminium garnet</i>).
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
Oa-TOF	Analisador de massas do tipo tempo de voo com aceleração ortogonal (<i>Orthogonal acceleration time of flight</i>)
PA	Método da projeção para cálculo de CCS (<i>Projection approximation</i>)
PEEK	Poli-éter-éter-cetona (<i>Polyether ether ketone</i>)
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein data bank</i>)
PIS	Varredura de íons precursores (<i>Precursor ion scan</i>)
Q	Analisador de massas do tipo quadrupolo (<i>Quadrupole</i>)
RMS	Erro quadrático médio (<i>Root mean square</i>)
NMR	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
SDAD	Agente de ligação cruzada heterobifuncional (éster de NHS/ diazirina) e clivável (ligação dissulfeto)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
SRIG	Guia de íons de eletrodos anelares empilhados (<i>Stacked ring ion guide</i>)
TCEP	<i>Tris</i> (2-carboxietil)fosfina
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
TM	Método da trajetória para cálculo de CCS (<i>Trajectory method</i>)

TOF	Analisador de massas do tipo tempo de vôo (<i>Time of flight</i>)
Tris.HCl	Cloridrato de <i>tris</i> (hidroximetil)aminometano
TWIM	Mobilidade iônica do tipo <i>Travelling-wave</i> (<i>Travelling-wave ion mobility</i>)
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (<i>Ultra performance liquid chromatography</i>)
XL	Modificação em que ambos os grupos do ALC se ligaram à cadeia da proteína ou peptídeo (ligação cruzada intra- ou intermolecular).
XRD	Difração de raios-X (<i>X-ray diffraction</i>)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos modificados (mioglobina) após ativação dos grupos diazirina, ou após ativação dos grupos diazirina e redução das ligações dissulfeto do ALC, identificados por LC-MS/MS.....	35
Tabela 2. Parâmetros instrumentais otimizados para análise de proteínas não-modificadas em condições nativa e desnaturante por ESI-TWIM-MS	50
Tabela 3. Valores de CCS obtidos experimentalmente para alguns íons de proteínas não-modificadas em condição desnaturante, usando-se curvas de calibração feitas com mioglobina e citocromo C	55
Tabela 4. Valores de CCS experimentais, obtidas por TWIM-MS para os vários estados de carga observados em condição nativa, e teóricos, obtidos computacionalmente através dos programas CCSCalc e MOBCAL para estruturas de XRD ou NMR representativas, das proteínas mioglobina, citocromo C e ubiquitina.....	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Utilização da espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento. Todos os dados foram obtidos de pesquisa realizada no Web of Science (www.isiknowledge.com), no período de 1993 a 2004, considerando as 500 primeiras citações de cada ano. No gráfico aparecem apenas áreas que atingiram mais de 1%.¹⁴ 2
- Figura 2.** Estruturas do suberato de disuccinimidila (DSS) e sebacato de disuccinimidila (DSSeb), ALC homólogos do tipo homobifuncional (contendo grupos éster de *N*-hidróxisuccinimida) mais utilizados em experimentos de ligação cruzada com análise por MS..... 3
- Figura 3.** Esquema representando os possíveis produtos da reação de uma proteína ou peptídeo com um ALC homobifuncional, do tipo éster de NHS. O produto *Dead-end* (DE) é formado quando um dos grupos éster de NHS é hidrolisado, antes ou após o outro se ligar a um resíduo de aminoácido. Para os produtos intra- e intermolecular (XL), inicialmente ambos os grupos éster de NHS se ligam a resíduos de aminoácido. Caso a proteólise enzimática clive a cadeia polipeptídica em algum resíduo localizado entre aqueles ligados pelo ALC, forma-se um produto intermolecular; caso contrário, um produto intramolecular..... 4
- Figura 4.** Representação esquemática de um experimento típico de ligação cruzada com análise por distância. **1)** Reação da proteína alvo com o ALC desejado; **2)** Digestão enzimática da proteína MS para obtenção de dados estruturais de proteínas na forma de restrições espaciais de modificada, de forma a gerar peptídeos modificados e não-modificados; **3)** Análise da mistura de peptídeos por LC-MS/MS, visando identificar os peptídeos modificados pelo ALC para formar espécies de ligação cruzada intra- e intermolecular (XL) e produtos do tipo DE (ver Figura 3). **4)** Agrupamento das restrições de distância obtidas pelo experimento e desenho de um mapa de ligações cruzadas. **5)** Uso do conjunto de restrições de distância na determinação de modelos estruturais compatíveis para a proteína alvo. 5
- Figura 5.** Erros quadráticos médios (RMS) e desvios padrões para comparações entre estruturas de XRD ou NMR previamente disponíveis e conjuntos de estruturas-modelo com 10, 30, 50, 70 e 90% de restrições de distância em relação ao número de resíduos, para os domínios **A)** Subunidade f da RNA polimerase (1GO3); **B)** Proteína ribossomal 50s 17/112 (1DD3); **C)** Neurotoxina b (1NXB); **D)** Di-hidrofolato redutase (1VIE); **E)** 1,4-alfa-maltotetrahidrolase (1JDC); **F)** Proteína g (1IGD); **G)** Proteína ribossomal 130 (1BXY); **H)** Proteína de divisão celular ftsa (1E4F); **I)** Proteína anticoagulante (1D0D). Os códigos entre parênteses se referem às estruturas do PDB⁴⁴ com as quais foram feitas as comparações. 7

Figura 6. Estrutura do SDAD, um ALC reativo frente a aminas (éster de NHS), fotoativável (diazirina) e clivável (dissulfeto), disponível comercialmente (Thermo Fisher).....	10
Figura 7. Esquema representando os produtos observados para reação de um ALC do tipo heterobifuncional, com um grupo éster de NHS, um grupo diazirina fotoativável e uma ligação dissulfeto clivável. A molécula é inicialmente ligada pelo grupo éster de NHS, e a seguir pelo carbeno gerado mediante eliminação de N ₂ da diazirina, em etapas separadas. Por fim, é possível clivar a ligação dissulfeto da cadeia do ALC, gerando duas modificações distintas.	10
Figura 8. Eliminação de nitrogênio molecular de diazirinas formando carbenos diretamente ou mediante rearranjo para espécie diazo.	11
Figura 9. Trabalho desenvolvido por Suchanek <i>et al</i> para mapeamento de interações proteína-proteína em meio intracelular. Esquerda: aminoácidos modificados com grupos diazirina empregados no estudos, photo-Leu, photo-Ile e photo-Met. Direita: fotografia de análises por <i>Western Blotting</i> , demonstrando a ocorrência de ligações cruzadas entre proteínas constituintes do complexo protéico estudado após incidência de radiação UV, quando as mesmas foram biossintetizadas incorporando os aminoácidos modificados do meio intracelular. ⁵⁸	12
Figura 10. Representação esquemática das etapas reacionais pra se obter peptídeos com ligação cruzada intramolecular pelo SDAD, com respectivos deslocamentos de massa. 1) Reação no grupo éster de NHS; 2) Digestão com tripsina; 3) Ativação dos grupos diazirina, eliminação de N ₂ e reação do carbeno; 4) Redução da ligação dissulfeto. Ao longo do texto, os produtos A, B, C e D para os peptídeos P1, P2 e P3 foram apresentados como [PX _A], [PX _B], [PX _C] e [PX _D], em que X = 1, 2 ou 3.....	16
Figura 11. Representação esquemática da fonte de luz UV empregada para fotoativação dos grupos diazirina.	17
Figura 12. Espectros de MALDI(+)-QTOF representativos para P1 (Ac-ARVALKAV) após A) Etapa 1; B) Etapa 2; C) Etapa 3 e D) Etapa 4 (ver Figura 10).	23
Figura 13. Espectros de MALDI(+)-QTOF representativos para P3 (Ac-ARAHVALKA) após A) Etapa 1; B) Etapa 2; C) Etapa 3 e D) Etapa 4 (ver Figura 10).	24

Figura 14. Espectros de ESI(+)-QTOF representativos com energia de colisão ajustada para **A)** 10,0 e **B)** 0,10. Note o íon $[P5_A-N_2+3H]^{3+}$ em m/z 609 representando a perda de N_2 no espectro superior ($\sim 10\%$ em intensidade em relação a m/z 618) e a ausência do mesmo no espectro inferior, demonstrando que a perda é unicamente resultado da energia de colisão aplicada na cela durante a análise. 25

Figura 15. Representação esquemática de possíveis rotas reacionais para o carbeno gerado mediante eliminação de N_2 de grupos diazirina em solução aquosa, mostrando também os produtos subsequentes após reações de redução das ligações dissulfeto (P1, P2 e P3) ou após redução e alquilação dos tióis (P4 e P5). **A)** Inserção em uma ligação da cadeia do peptídeo, gerando duas modificações distintas após redução das ligações dissulfeto (P1, P2 e P3), e redução seguida por alquilação dos tióis (P4 e P5). **B)** Inserção em uma molécula de água, gerando um composto com deslocamento de massa de + 18 Da que leva a perda parcial da cadeia do ALC após redução das ligações dissulfeto, formando um produto com uma modificação de +88 Da. **C)** Inserção em uma ligação da cadeia do ALC entre o grupo dissulfeto e o carbeno, resultando em diferentes possíveis isômeros, todos levando à perda parcial da cadeia do ALC após redução das ligações dissulfeto, formando um produto com uma modificação de +88 Da. 27

Figura 16. Espectros de MALDI(+)-QTOF representativos para **A)** P4 (Ac-ARAKGAFAVYAGVR) e **B)** P5 (Ac-ARAKGAFAVHAGVR) após alquilação dos grupos tiol com iodoacetamida (ver Figura 15). 29

Figura 17. Espectros de íons produtos para **A)** $[P1_D+H]^+$ de m/z 847,48 e **B)** $[P2_D+H]^+$ de m/z 982,50. O esquema da Figura 10 ilustra os deslocamentos de massa de +88 Da (modificação da porção éster de NHS) e +159 Da (modificação da porção diazirina). 31

Figura 18. Espectros de íons produtos para **A)** $[P4_D+114 Da+H]^+$ de m/z 1968,99 e **B)** $[P5_D+114 Da+H]^+$ de m/z 1942,96. Modificações de +145 Da e +216 Da são versões alquiladas das modificações +88 Da e +159 Da (Figura 15). 32

Figura 19. Espectros deconvoluídos de LC-MS após reação de mioglobina com **A)** SDAD (porção éster de NHS), excesso molar 10:1, sendo que no espectro foram anotados íons correspondendo a várias modificações na forma de reação apenas pela porção éster de NHS (+273 Da, Figuras 7 e 10); e **B)** DSS, excesso molar de 10:1; sendo que no espectro foram anotados íons correspondendo a várias modificações do tipo XL (+138 Da, Figura 3). As deconvoluções foram obtidas empregando-se o algoritmo MaxEnt1 (Waters) .. 33

Figura 20. Espectros de íons produtos representativos para ligação cruzada intra- e intermolecular em mioglobina. A) Peptídeo LFTGHPETLEKFDK com ligação cruzada intramolecular na forma de duas modificações distintas (+88 Da e +159 Da) após redução da ligação dissulfeto, $[M+3H]^{3+}$ de m/z 636,95. B) Ligação cruzada intermolecular entre peptídeos GLSDGEWQQVLNVWGK e ALELFR, $[M+3H]^{3+}$ de m/z 937,12.....	36
Figura 21. Estrutura tridimensional de mioglobina de coração de cavalo por difração de raios-X, registro 1WLA do PDB. ^{70,71} Os resíduos de glicina e ácido glutâmico envolvidos na ligação cruzada intermolecular foram destacados de forma a exibir suas cadeias laterais. As regiões em amarelo e azul correspondem aos peptídeos GLSDGEWQQVLNVWGK e ALELFR, respectivamente.....	37
Figura 22. Esquema representando a separação de dois íons hipotéticos, um com conformação compacta e outro com conformação estendida, por mobilidade iônica.....	40
Figura 23. Espectro bidimensional de IM-MS de uma mistura de metil- α e metil- β -D-galactopiranosídeos, mostrando a separação (gás da cela: N_2) de íons dos compostos na forma $[M+Na]^+$ em m/z 217. ⁹⁰ Apesar dos dois íons apresentarem a mesma relação m/z (eixo x) eles apresentam diferentes tempos de deslocamento (eixo y), permitindo assim a sua diferenciação.....	41
Figura 24. Esquema do guia de íons composto por eletrodos anelares empilhados (SRIG), com gráfico do potencial eletrostático efetivo típico produzido nos eletrodos de um SRIG. ¹⁰³	43
Figura 25. Representação esquemática do instrumento Synapt TM HDMS TM da Waters. ¹⁰⁵	44
Figura 26. Desmontagem de complexos protéicos em fase gasosa por CID, monitorada por IM-MS. ¹⁰⁸ Durante o processo de CID, estima-se que subunidades individuais de um complexo protéico sofram desenovelamento antes de serem ejetadas. De fato, a análise de IM-MS de íons da transtiretina ativada por CID demonstra um aumento na CCS associado com aumento da energia de colisão da cela. Com 90 V de energia, a CCS dos íons corresponde bem com a CCS calculada para a estrutura nativa do complexo. À medida que a energia de colisão aumenta, os valores de CCS passam a corresponder com estruturas hipotéticas de maior grau de desenovelamento e maiores valores de CCS, modeladas teoricamente.	46
Figura 27. Curva de calibração Ω' versus DT' para citocromo C. Condições de TWIM-MS: rampa de altura da onda 9 – 12 V, velocidade da onda 350 m s ⁻¹ ...	54

Figura 28. Esquema representando os possíveis produtos da reação de uma proteína ou peptídeo com um ALC homobifuncional, do tipo éster de NHS. O produto *dead-end* (DE) é formado quando um dos grupos éster de NHS é hidrolisado, antes ou após o outro se ligar a um resíduo de aminoácido. O produto intramolecular (XL) é formado quando ambos os grupos éster de NHS se ligam a resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica..... 56

Figura 29. Cromatogramas ATD extraídos e sobrepostos para experimentos de TWIM-MS com mioglobina em condições desnaturantes. **Cima:** estado de carga +13, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. **Baixo:** estado de carga +15, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. Linhas tracejadas indicam as diminuições percentuais nos valores de CCS para os picos observados no ATD após a reação com ALC, em comparação com o valor de CCS do íon da proteína não-modificada..... 57

Figura 30. Cromatogramas ATD extraídos e sobrepostos para experimentos de TWIM-MS com citocromo C em condições desnaturantes. **Cima:** estado de carga +10, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. **Baixo:** estado de carga +12, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. Linhas tracejadas indicam as diminuições percentuais nos valores de CCS para os picos observados no ATD após a reação com ALC, em comparação com o valor de CCS do íon da proteína não-modificada..... 58

Figura 31. Cromatogramas ATD extraídos e sobrepostos para experimentos de TWIM-MS com ubiquitina em condições desnaturantes. **Cima:** estado de carga +9, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. **Baixo:** estado de carga +10, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. Linhas tracejadas indicam as diminuições percentuais nos valores de CCS para os picos observados no ATD após a reação com ALC, em comparação com o valor de CCS do íon da proteína não-modificada..... 59

Figura 32. Cromatogramas ATD extraídos para experimentos de TWIM-MS com citocromo C em condição nativa. Íons do estado de carga +8, com a proteína não-modificada (topo) ou após ligação de 1 (meio) ou 2 (inferior) moléculas de DSS (coluna da esquerda) ou DSSeb (coluna da direita) na forma de XL (intramolecular)..... 61

Figura 33. Cromatogramas ATD extraídos para experimentos de TWIM-MS com citocromo C em condição nativa. Íons do estado de carga +8, com a proteína não-modificada (topo) ou após ligação de 1 (meio) ou 2 (inferior) moléculas de DSS (coluna da esquerda) ou DSSeb (coluna da direita) na forma de DE (*dead-end*)..... **63**

Figura 34. Cromatogramas ATD extraídos para experimentos de TWIM-MS com ubiquitina em condição nativa. Íons do estado de carga +6, com a proteína não-modificada (topo) ou após ligação de 1 (meio) ou 2 (inferior) moléculas de DSS (coluna da esquerda) ou DSSeb (coluna da direita) na forma de XL (intramolecular)..... **64**

Figura 35. Cromatogramas ATD extraídos para experimentos de TWIM-MS com ubiquitina em condição nativa. Íons do estado de carga +6, com a proteína não-modificada (topo) ou após ligação de 1 (meio) ou 2 (inferior) moléculas de DSS (coluna da esquerda) ou DSSeb (coluna da direita) na forma de DE (*dead-end*)..... **65**

1. Introdução Geral

1.1. Espectrometria de massas na análise de proteínas

A espectrometria de massas (MS) consiste no estudo de íons na fase gasosa, sendo a caracterização estrutural de compostos uma de suas principais aplicações. Já nos anos 70, havia um grande interesse na utilização de MS para a realização de experimentos de caracterização de proteínas e outras biomoléculas. Entretanto, uma das principais limitações nesse sentido envolvia a dificuldade de geração de íons de macromoléculas em fase gasosa pelos métodos de ionização então disponíveis.^{1,2} O advento das técnicas de ionização suaves denominadas ESI (*Electrospray Ionization*),³ por J. B. Fenn e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*),⁴ por M. Karas e F. Hillenkamp, no final da década de 80, possibilitou uma ampla aplicação da espectrometria de massas (MS) na análise de biomoléculas como peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Tais moléculas agora podiam ser eficientemente ionizadas e transferidas para a fase gasosa, sem fragmentação ou necessidade de derivação.³ O desenvolvimento dessas novas técnicas de ionização impulsionou uma grande evolução dos analisadores de massas associados nos anos subsequentes, de tal maneira que a partir da década de 90 tornaram-se disponíveis instrumentos comerciais com capacidade de experimentos de MS sequencial (MS^n) e diversas geometrias, como quadrupolo - tempo de voo (Q-TOF), tempo de voo – tempo de voo (TOF-TOF), ion trap linear (LIT), ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FTICR) e, mais recentemente, Orbitrap.^{5,6} Desde então, o uso da espectrometria de massas na análise de proteínas evoluiu extensivamente, a ponto de se tornar rotineiro no seqüenciamento e identificação de proteínas, determinação da massa molecular de proteínas e complexos protéicos intactos, determinação de parceiros de interação, identificação e localização de modificações pós-traducionais e quantificação absoluta e relativa de proteínas.⁷⁻¹³ Em particular, o desenvolvimento de metodologias envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a MS para análises de misturas complexas de peptídeos advindos de digestão enzimática, contendo uma enorme diversidade de

proteínas, aliada ao crescimento das ferramentas de bioinformática para busca em banco de dados possibilitou estudos de proteômica em larga escala, hoje denominados de proteômica *shotgun*.

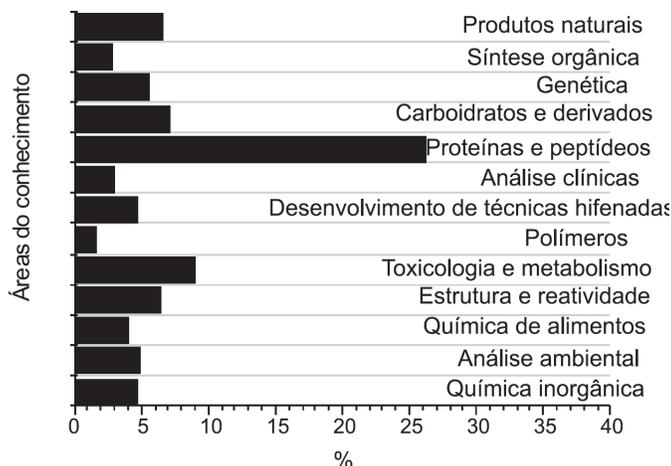


Figura 1. Utilização da espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento. Todos os dados foram obtidos de pesquisa realizada no Web of Science (www.isiknowledge.com), no período de 1993 a 2004, considerando as 500 primeiras citações de cada ano. No gráfico aparecem apenas áreas que atingiram mais de 1%.¹⁴

O interesse na ampla aplicação de MS para a caracterização de proteínas se deve às vantagens intrínsecas da técnica, como alta sensibilidade (permitindo análise de amostras contendo femtomols de peptídeos), rapidez, versatilidade, facilidade de operação e alta confiabilidade dos resultados. Como demonstrado acima, essas características fazem com que MS seja hoje uma técnica bastante consolidada para caracterizações envolvendo a estrutura primária de proteínas. No entanto, o emprego de MS na análise de estruturas superiores (terciárias e quaternárias) de proteínas ainda é restrito, apesar das inúmeras vantagens potenciais que poderia apresentar nessa área. Nesse âmbito, duas metodologias envolvendo análise por MS têm se destacado recentemente, com um número crescente de aplicações: mapeamento por oxidação com radicais hidroxila (que não será abordada aqui) e ligação cruzada.

1.2. Ligação cruzada e análise por MS para estudos de estruturas superiores de proteínas

O fenômeno de ligação cruzada (*cross-linking*) compreende a união de duas espécies através da formação de uma ligação covalente. Tais espécies podem representar diferentes classes químicas, variando de proteínas e ácidos nucleicos a partículas sólidas.¹⁵ Agentes de ligação cruzada (ALC) são compostos orgânicos multifuncionais, contendo em geral dois ou três grupos reativos, unidos por uma cadeia espaçadora de comprimento variável. Quando em contato com proteínas em solução, os ALC são capazes de se ligar covalentemente a cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, de acordo com suas respectivas especificidades.¹⁶ Os grupos reativos podem ser idênticos (homobifuncionais) ou distintos (heterobifuncionais), permitindo maior versatilidade na especificidade de cada reagente.

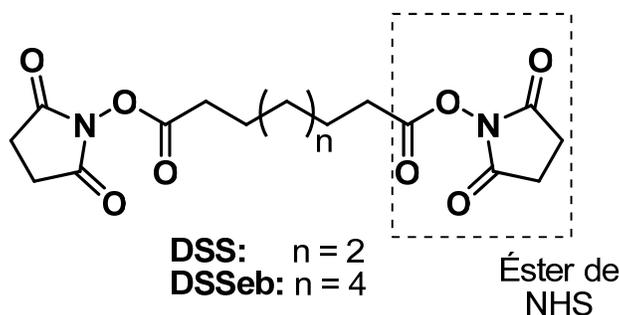


Figura 2. Estruturas do suberato de disuccinimidila (DSS) e sebacato de disuccinimidila (DSSeb), ALC homólogos do tipo homobifuncional (contendo grupos éster de *N*-hidróxisuccinimida) mais utilizados em experimentos de ligação cruzada com análise por MS.

Os ALC reagem com resíduos de aminoácidos unindo as cadeias laterais de dois resíduos distintos que estejam espacialmente separados, no máximo, pela distância da cadeia espaçadora. Como exemplos de grupos reativos mais empregados em ALC estão os reativos frente a aminas, álcoois e tióis, como ésteres de *N*-hidróxisuccinimida (NHS) e imidoésteres; frente a ácidos carboxílicos, como carbodiimidas;¹⁵ frente a álcoois, como isocianatos;¹⁵ e específicos para tióis, como maleimidas.¹⁵ Os ALC têm sido utilizados para

estabilização de estruturas espaciais de proteínas, determinação da distância entre grupos reativos em uma mesma proteína ou entre subunidades protéicas, na identificação de receptores de membranas e, mais recentemente, em estudos estruturais de complexos protéicos, aliando-se esta metodologia à análise por MS.^{17,18} A Figura 3 demonstra os tipos de produtos tipicamente formados em reações de ligação cruzada de proteínas ou peptídeos com reagentes homobifuncionais.

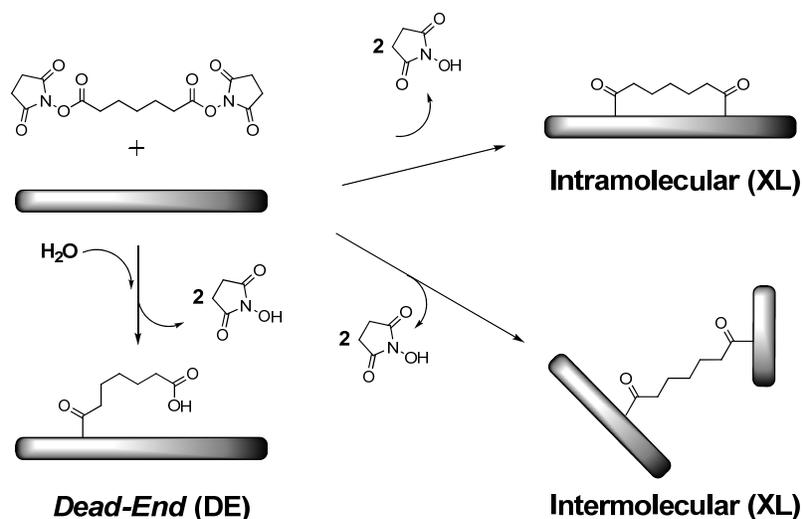


Figura 3. Esquema representando os possíveis produtos da reação de uma proteína ou peptídeo com um ALC homobifuncional, do tipo éster de NHS. O produto *dead-end* (DE) é formado quando um dos grupos éster de NHS é hidrolisado, antes ou após o outro se ligar a um resíduo de aminoácido. Para os produtos intra- e intermolecular (XL), inicialmente ambos os grupos éster de NHS se ligam a resíduos de aminoácido. Caso a proteólise enzimática clive a cadeia polipeptídica em algum resíduo localizado entre aqueles ligados pelo ALC, forma-se um produto intermolecular; caso contrário, um produto intramolecular.

O emprego da espectrometria de massas na análise de produtos de ligação cruzada permite identificar as espécies moleculares contendo a ligação cruzada e obter as informações estruturais desejadas, por meio de restrições de distância espaciais determinadas a partir de resíduos ligados pelo ALC, valendo-se de todas as vantagens intrínsecas associadas a MS. Isto é feito submetendo a proteína modificada pelo ALC à proteólise enzimática, e identificando os peptídeos modificados resultantes por LC-MS e LC-MS/MS, sendo a mistura de peptídeos submetida à separação cromatográfica seguida de análise por MS de forma contínua. Os íons de peptídeos são então automaticamente submetidos a experimentos de MS/MS durante a corrida de LC, o que permite sequenciá-los e

localizar as modificações do ALC. Essa abordagem experimental é bastante semelhante aos métodos de proteômica *shotgun* empregados em análises de misturas complexas de proteínas. A partir deste tipo de experimento é possível saber quais pares de resíduos de aminoácidos da proteína alvo sofreram ligação cruzada e, conseqüentemente, se estavam espacialmente próximos na estrutura nativa.

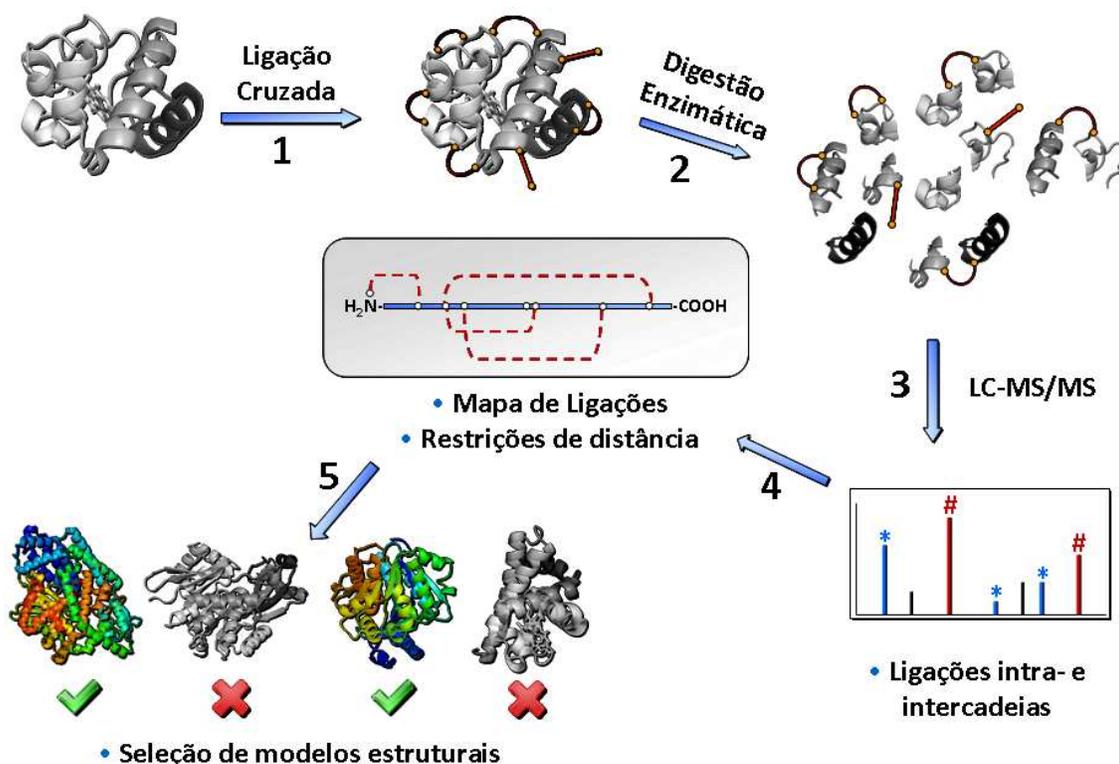


Figura 4. Representação esquemática de um experimento típico de ligação cruzada com análise por MS para obtenção de dados estruturais de proteínas na forma de restrições espaciais de distância. 1) Reação da proteína alvo com o ALC desejado; 2) Digestão enzimática da proteína modificada, de forma a gerar peptídeos modificados e não-modificados; 3) Análise da mistura de peptídeos por LC-MS/MS, visando identificar os peptídeos modificados pelo ALC para formar espécies de ligação cruzada intra- e intermolecular (XL) e produtos do tipo DE (ver Figura 3). 4) Agrupamento das restrições de distância obtidas pelo experimento e desenho de um mapa de ligações cruzadas. 5) Uso do conjunto de restrições de distância na determinação de modelos estruturais compatíveis para a proteína alvo.

A Figura 4 acima demonstra esquematicamente um experimento típico de ligação cruzada com análise por MS para uma proteína alvo, podendo ser estendida para estudos de complexos protéicos, caso em que é possível realizar uma etapa intermediária de purificação do complexo modificado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), imediatamente

após a reação de ligação cruzada. A banda do gel é então recortada e submetida a um procedimento de digestão apropriado, sendo as demais etapas equivalentes.

Utilizando essa metodologia, várias estruturas de baixa resolução foram modeladas, com vários graus de complexidade. Foram determinadas estruturas de proteínas até então não resolvidas por difração de raios-X (XRD), como é o caso da apolipoproteína A-I humana¹⁹ e da ATPase transportadora de cobre (CopA),²⁰ além de estruturas de homodímeros (protease humana C1r),²¹ heterodímeros (gp43/gp45 da holoenzima DNA-polimerase do bacteriófago T4, Ffh/Fts Y de *Escherichia coli*, complexo calmodulina-melitina),²²⁻²⁴ e de grandes complexos protéicos, como o composto pela RNA polimerase II (Pol II) e o fator de iniciação TFIIF, totalizando 15 subunidades e aproximadamente 670 kDa em massa.²⁵

1.3. Desafios da metodologia de ligação cruzada com análise por MS

Embora a metodologia de ligação cruzada com análise por MS tenha se mostrado bastante promissora em fornecer informações estruturais de proteínas, um dos grandes desafios da técnica ainda é a detecção e identificação dos peptídeos modificados no digesto após a reação, uma vez que os mesmos sempre estão presentes em quantidades subestequiométricas na mistura.^{16,26} Várias estratégias têm sido desenvolvidas visando contornar esse problema, como o uso de ALC marcados isotopicamente,^{27,28,29} ALC modificados com grupos específicos visando purificação por cromatografia de afinidade dos peptídeos modificados,^{30,31} ALC cliváveis visando facilitar a detecção dos peptídeos modificados,^{32,33,34} expressão de proteínas alvo marcadas isotopicamente com ¹⁴N^{35,36} e digestão enzimática em água marcada com ¹⁸O.^{37,38,39} Essas duas últimas estratégias baseiam-se no fato que após digestão trípica, os pares de peptídeos ligados pelo ALC terão dois resíduos *N*-terminal e *C*-terminal cada, sendo ambos ou lisina ou arginina, possibilitando a identificação dos peptídeos modificados pela diferença de massa proporcionada pela marcação isotópica. Há também estudos visando a elucidação dos mecanismos de fragmentação de peptídeos modificados por ALC em experimentos de MS/MS por dissociação induzida por colisão (CID),

resultando na descoberta de íons marcadores característicos para esses peptídeos.⁴⁰ Tais íons marcadores podem ser empregados para facilitar a detecção de peptídeos modificados por ALC em análises seletivas do tipo varredura de íons precursores (PIS) em instrumentos Q-TOF.⁴¹

A qualidade da informação estrutural obtida em experimentos de ligação cruzada com análise por MS depende diretamente do número de restrições de distância obtidas. Para um complexo protético, em geral mesmo um número baixo de restrições de distância já pode ser usado para se determinar a topologia do sistema. Se o número de ligações cruzadas for próximo de 20 a 30% do número de resíduos de aminoácido do sistema, então o tipo de enovelamento da proteína ou do complexo protéico pode ser determinado com um erro quadrático médio (RMS) de alguns poucos angstroms, como demonstrado pelos trabalhos de Dokholyan *et al* (Figura 5)⁴² e Young *et al*.⁴³

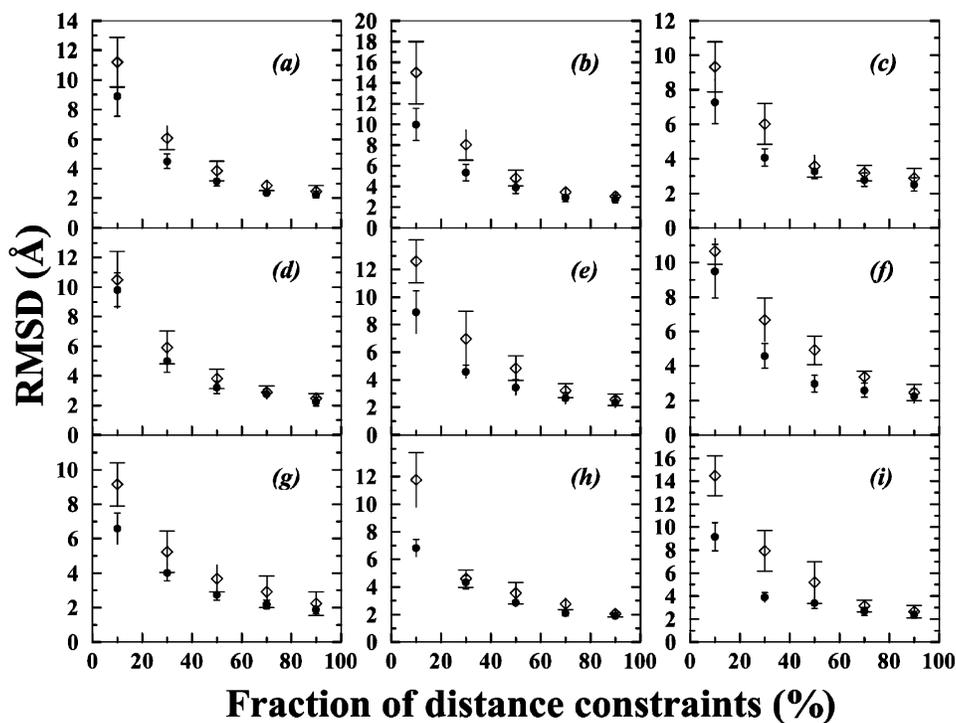


Figura 5. Erros quadráticos médios (RMS) e desvios padrões para comparações entre estruturas de XRD ou NMR previamente disponíveis e conjuntos de estruturas-modelo com 10, 30, 50, 70 e 90% de restrições de distância em relação ao número de resíduos, para os domínios A) Subunidade f da RNA polimerase (1GO3); B) Proteína ribossomal 50s 17/112 (1DD3); C) Neurotoxina b (1NXB); D) Di-hidrofolato redutase (1VIE); E) 1,4-alfa-maltotetrahidrolase (1JDC); F) Proteína g (1IGD); G) Proteína ribossomal 130 (1BXY); H) Proteína de divisão celular ftsa (1E4F); I) Proteína anticoagulante (1D0D). Os códigos entre parênteses se referem às estruturas do PDB⁴⁴ com as quais foram feitas as comparações.

Nesse sentido, outro desafio relacionado com essa metodologia envolve a dificuldade de obtenção de um número apreciável de ligações cruzadas dependendo do sistema alvo e do ALC utilizado. Como nos ALC homobifuncionais tradicionais são empregados ésteres de NHS, reativos principalmente frente a aminas primárias dos resíduos de lisina e do resíduo *N*-terminal, as ligações cruzadas formadas ficam restritas a pares desses resíduos expostos ao solvente e dentro da faixa de alcance estipulada pela cadeia espaçadora do ALC. Dessa maneira, o uso de ALC menos seletivos, capazes de formar ligações cruzadas entre mais tipos de resíduos de aminoácidos, tem o potencial de aumentar o número de ligações cruzadas formadas e, conseqüentemente, a qualidade da informação estrutural obtida.

Uma última consideração associada à metodologia de ligação cruzada diz respeito ao efeito que tais ligações causam nas estruturas secundária e terciária da proteína. Embora seja de interesse obter um grande número de tipos diferentes de ligações cruzadas, que produziriam um conjunto mais completo de restrições de distância, é também desejado que o número de ligações cruzadas distintas por molécula de proteína não seja demasiadamente alto, sob o risco de ocasionar deformações na estrutura da proteína. Sob essa ótica, outro ponto a se considerar é que a ligação de ALC do tipo homobifuncionais com ésteres de NHS em resíduos de lisina e no resíduo *N*-terminal torna as aminas desses resíduos comprometidas em ligações N-C=O do tipo amida, bloqueando sítios de carga que os mesmos teriam em solução e pH fisiológico. Pouca informação acerca desses aspectos está disponível na literatura, sendo o estudo de Haniu *et al*⁴⁵ um dos poucos nesse sentido. Foi observado, em estudos de ligação cruzada de eritropoietinas recombinantes humanas, que a ligação de cinco moléculas de ALC do tipo homobifuncional com ésteres de NHS não causou mudanças significativas na estrutura secundária da proteína, como demonstrado em espectros de dicroísmo circular (CD).

2. Capítulo I – Agentes de Ligação Cruzada Fotoativáveis

2.1. Introdução

Uma classe distinta de ALC é formada por compostos contendo grupos reativos fotossensíveis, capazes de ativação quando da incidência controlada de radiação na região do ultravioleta (UV). Uma vez ativados tais grupos reagem rápida e indiscriminadamente com cadeias laterais de resíduos de aminoácidos próximas a si, formando vários produtos estáveis, também passíveis de identificação mediante análise por MS.¹⁶ É importante ressaltar que tais reagentes são desenvolvidos para sofrer ativação em comprimentos de onda específicos (>300 nm) da região do UV, de forma a evitar quaisquer danos fotoquímicos diretos à estrutura das proteínas, como pela incidência de radiação em 254 nm. Além disso, a fotólise desses reagentes fornece os produtos ativados eficientemente, com alto rendimento quântico.⁴⁶

Normalmente, são empregados ALC's fotoativáveis do tipo heterobifuncional, contendo um grupo reativo fotossensível, como diazirina,^{46,47} arilazida^{47,48,49} ou benzofenona,^{50,51} e um grupo reativo tradicional (ex. éster de NHS), também separados por uma cadeia espaçadora de comprimento variável. O grupo fotossensível é estável nas condições que levam à ligação cruzada com o grupo reativo tradicional,^{16,52} de forma que é possível reagir o ALC com uma proteína em solução, acoplado a molécula do ALC a cadeias laterais de resíduos específicos pelo grupo reativo apropriado, isolar a proteína modificada por filtração em gel ou diálise, e então submetê-la a luz ultravioleta (UV), o que ativará especificamente os grupos fotossensíveis, convertendo-os em grupos altamente reativos, que reagem rápida e inespecificamente formando ligações cruzadas. Alguns ALC fotoativáveis do tipo heterobifuncional possuem ainda um grupo dissulfeto em sua cadeia espaçadora, permitindo que a cadeia seja clivada após reações de ligação cruzada sucessivas em ambos os grupos reativos, mediante tratamento com agentes redutores como ditioneitol (DTT), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) ou 2-mercaptoetanol, efetivamente separando a cadeia do ALC na forma de modificações distintas sobre duas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos.

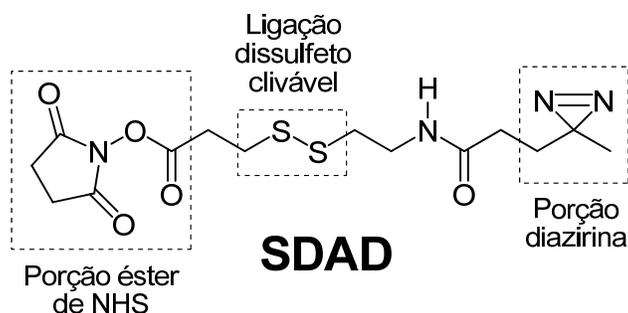


Figura 6. Estrutura do SDAD, um ALC reativo frente a aminas (éster de NHS), fotoativável (diazirina) e clivável (dissulfeto), disponível comercialmente (Thermo Fisher).

Tal procedimento facilita a identificação dos resíduos de aminoácidos que sofreram modificação, pois após proteólise enzimática e análise dos peptídeos resultantes por espectrometria de massas, cada fragmento da cadeia original do ALC se comportará como uma modificação simples e distinta nos resíduos de aminoácidos aos quais estão ligados (Figura 7).

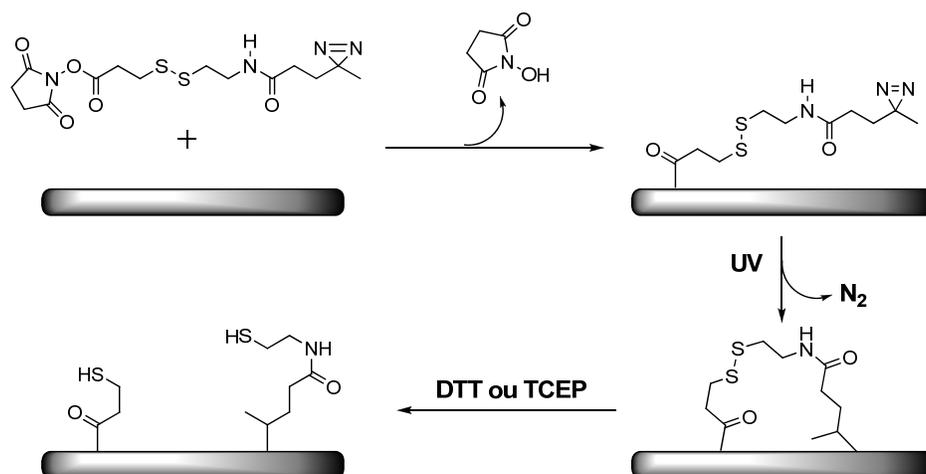


Figura 7. Esquema representando os produtos observados para reação de um ALC do tipo heterobifuncional, com um grupo éster de NHS, um grupo diazirina fotoativável e uma ligação dissulfeto clivável. A molécula é inicialmente ligada pelo grupo éster de NHS, e a seguir pelo carbeno gerado mediante eliminação de N₂ da diazirina, em etapas separadas. Por fim, é possível clivar a ligação dissulfeto da cadeia do ALC, gerando duas modificações distintas.

Embora as diazirinas constituam heterociclos de três membros com alta tensão do anel, as mesmas possuem ótima estabilidade química a diversas condições.^{53,54} A incidência de radiação UV ao redor de 350 nm em alquil^{55,56} e arildiazirinas⁴⁶ provoca eliminação de N₂ e formação de carbenos altamente

reativos.⁵² Há também a possibilidade de formação de espécies diazo isoméricas que, por sua vez, podem formar carbenos por eliminação de N₂, além de agirem como eletrófilos⁵² e alquilantes fortes.⁴⁸

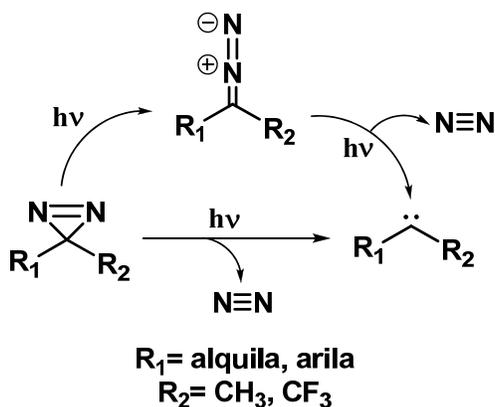


Figura 8. Eliminação de nitrogênio molecular de diazirinas formando carbenos diretamente ou mediante rearranjo para espécie diazo.

Pela combinação dessas características, as diazirinas constituem ótimos precursores de carbenos,⁵⁷ sendo assim excelentes grupos fotossensíveis para ALC fotoativáveis. Os carbenos resultantes da ativação são capazes de inserção em quaisquer ligações C-H, N-H, O-H ou S-H espacialmente próximas.⁵² A suposta inespecificidade de ligação do carbeno tem o potencial para formação de um maior número de ligações cruzadas, que agora podem ocorrer entre aminas primárias (lisinas e N-terminal) e quaisquer outros resíduos de aminoácido em distância apropriada.

A possibilidade de controle do momento em que se iniciará a reação de ligação cruzada pelo uso de ALC's fotoativáveis permite uma nova gama de experimentos visando mapear a estrutura tridimensional de proteínas. Como exemplo de tais aplicações há o trabalho de Suchanek *et al*,⁵⁸ envolvendo o emprego de versões modificadas dos aminoácidos leucina, isoleucina e metionina com grupos diazirina fotoativáveis, diretamente em células vivas.⁵⁸ A alta similaridade estrutural entre esses aminoácidos modificados e suas respectivas versões naturais possibilita que os mesmos escapem dos mecanismos de controle de identidade durante a biossíntese de proteínas e sejam incorporados às proteínas pelo maquinário de tradução de células de mamíferos.⁵⁸ A então

incidência controlada de radiação UV ativa os grupos diazirina, procedendo à eliminação de N₂, geração de carbenos e conseqüente formação de ligações cruzadas entre os três tipos resíduos de aminoácidos modificados e suas vizinhanças. Tais ligações covalentes são capazes de fixar proteínas interagindo entre si, o que permite mapear parceiros de interação em complexos protéicos por meio da técnica de *Western Blotting*.

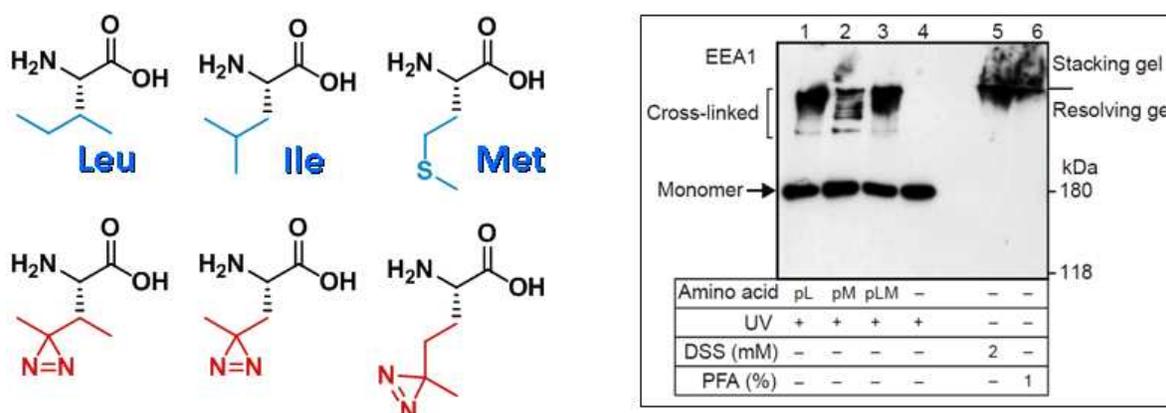


Figura 9. Trabalho desenvolvido por Suchanek *et al* para mapeamento de interações proteína-proteína em meio intracelular. Esquerda: aminoácidos modificados com grupos diazirina empregados no estudos, photo-Leu, photo-Ile e photo-Met. Direita: fotografia de análises por *Western Blotting*, demonstrando a ocorrência de ligações cruzadas entre proteínas constituintes do complexo protéico estudado após incidência de radiação UV, quando as mesmas foram biossintetizadas incorporando os aminoácidos modificados do meio intracelular.⁵⁸

Usando essa metodologia, Suchanek *et al* estudaram o complexo composto pelas proteínas de membrana SCAP, Insig-1 e SREBP, entre outras, responsável pela regulação do metabolismo de lipídeos, determinando a participação de mais uma proteína no complexo (PGRMC1), bem como sua interação direta com SCAP e Insig-1 pela formação de complexos protéicos covalentes, unidos pelas ligações cruzadas. Outros estudos recentes relatam também a síntese de outros aminoácidos contendo diazirinas (Hatanaka *et al*⁵⁹) e de nucleosídeos modificados (He *et al*⁶⁰).

Embora haja diversos estudos empregando ALC com grupos fotoativáveis,^{61,62} incluindo estudos com tRNA⁶³ e carboidratos,⁶⁴ não há estudo detalhado da aplicação dos mesmos envolvendo análise por MS e visando obter informações estruturais de proteínas. Desta forma, a metodologia de ligação

cruzada com ALC fotoativáveis acoplada à espectrometria de massas possui grande potencial para o estudo de estruturas superiores de proteínas, valendo-se das já descritas vantagens intrínsecas da técnica de análise e do potencial associado aos ALC fotoativáveis de gerar ligações cruzadas em maior número e entre peptídeos únicos, quando comparada com ALC homobifuncionais tradicionais.

2.2. Objetivos

O objetivo geral dessa parte do trabalho foi realizar estudos fundamentais da aplicação do ALC fotoativável SDAD em peptídeos e proteínas modelo com análise por MS, de forma a se caracterizar seu comportamento nesses sistemas. Como objetivos específicos temos:

A) Investigar a fragmentação de peptídeos sintéticos contendo modificações oriundas de ligação cruzada mediada pelo SDAD, de forma a caracterizar a fragmentação dessas espécies.

B) Avaliar os resultados de experimentos ligação cruzada obtidos a partir da aplicação do ALC SDAD em proteínas modelo como mioglobina, de forma a testar esse reagente com um sistema protéico real, e confirmar as observações feitas para peptídeos sintéticos.

2.3. Procedimento Experimental

2.3.1. Materiais

Os peptídeos Ac-ARVALKAV (P1), Ac-ARRAYVALKA (P2), Ac-ARAHVALKA (P3), Ac-ARAKGAFAVYAGVR (P4), Ac-ARAKGAFAVHAGVR (P5) e Ac-AGRVNFYFLGCAR (P6) foram obtidos da Proteimax (São Paulo, SP). O ALC NHS-SS-Diazirine (SDAD) foi obtido da ThermoFisher. Mioglobina equina foi obtida da Sigma-Aldrich. Tripsina modificada de pâncreas suíno (grau sequenciamento) foi obtida da Promega. A água utilizada foi obtida de um purificador Milli-Q (Millipore). Todos os outros reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich, Merck ou Tedia, sendo usados sem purificação prévia.

2.3.2. Reação do SDAD com peptídeos

Os peptídeos foram solubilizados em tampão fosfato (50 mM pH 8,0) para um volume final de 500 μ L e concentração de 40 μ M. O ALC SDAD foi dissolvido em DMF anidra (10 mg mL⁻¹), e imediatamente adicionado às soluções de peptídeos em excesso molar 20:1. As reações foram mantidas sob agitação leve à temperatura ambiente por 1 h, sendo então finalizadas por adição de tampão Tris. HCl (1 M, pH 7,6) para concentração final de 50 mM. Após 30 min, as misturas reacionais foram purificadas em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) Oasis HLB, feitos de resina polimérica (capacidade 1 cm³, tamanho de partícula 30 μ m, tamanho de poro 80 Å² – Waters, Milford). Após carregamento da amostra, os peptídeos imobilizados foram dessalinizados com 2 mL de H₂O com 0,1% de ácido fórmico, e eluídos com 3 mL de H₂O/MeCN 75:25 com 0,1% de ácido fórmico, para garantir co-eluição mínima de ALC não reagido com os peptídeos. As frações de eluição foram combinadas, concentradas e diluídas a 100 μ L com H₂O. Para os peptídeos P1, P2 e P3 (Figura 10), uma etapa de digestão enzimática (Etapa 2) foi realizada após a reação nos grupos éster de NHS, sendo a alíquota de 100 μ L da etapa anterior diluída a 500 μ L com tampão NH₄HCO₃ 50 mM pH 8,0, seguido de adição de tripsina em proporção enzima/substrato de 1:50 e incubação a 37°C por

24 h. Uma alíquota de 400 μL foi separada para ativação dos grupos diazirina (Etapa 3), sendo os 100 μL restantes reservados para análise por MS. Para os peptídeos P4, P5, P6 e P7, a fração de 100 μL resultante da Etapa 1 foi diluída para 500 μL com H_2O , dos quais 100 μL foram separados para análise por MS e os 400 μL restantes foram destinados à ativação dos grupos diazirina (Etapa 3) diretamente, sem digestão (Etapa 2).

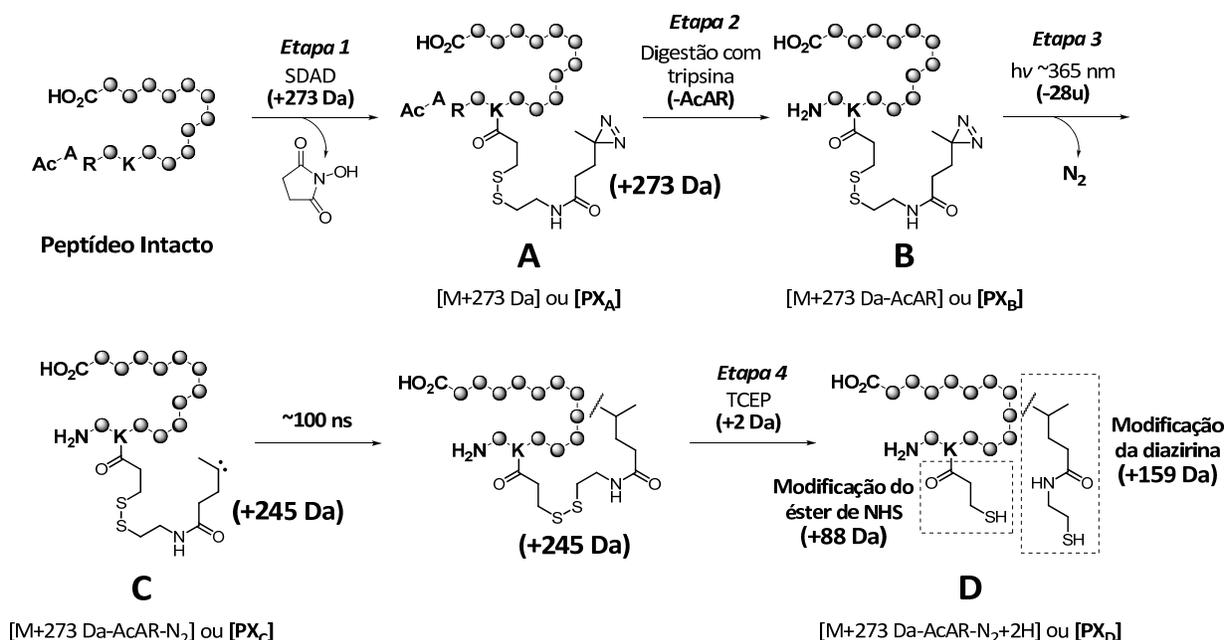


Figura 10. Representação esquemática das etapas reacionais para se obter peptídeos com ligação cruzada intramolecular pelo SDAD, com respectivos deslocamentos de massa. **1)** Reação no grupo éster de NHS; **2)** Digestão com tripsina; **3)** Ativação dos grupos diazirina, eliminação de N_2 e reação do carbeno; **4)** Redução da ligação dissulfeto. Ao longo do texto, os produtos A, B, C e D para os peptídeos P1, P2 e P3 foram apresentados como [PX_A], [PX_B], [PX_C] e [PX_D], em que X = 1, 2 ou 3.

A fonte de radiação UV (Figura 11) foi construída com base em uma lâmpada de vapor de mercúrio de 250 W (Philips HPL-N, com bulbo externo removido), acoplada a um filtro de vidro (WG320, Schott AG) para remover radiações com comprimento de onda $< 300 \text{ nm}$, e um obturador eletrônico (22-8411 Ealing Electronic Shutter, Ilex Optical) para controlar os tempos de exposição à radiação, todos dispostos em uma caixa de madeira com dois compartimentos.

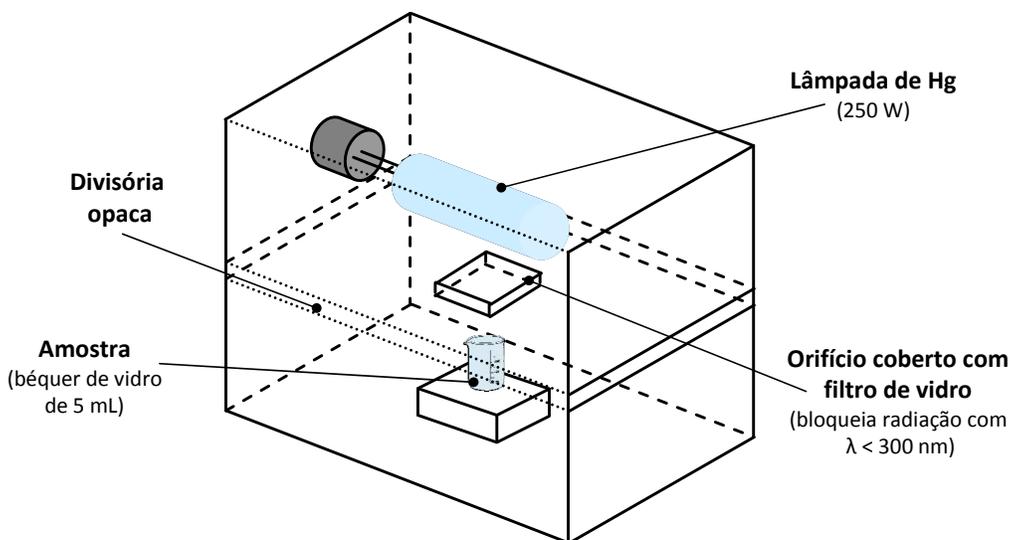


Figura 11. Representação esquemática da fonte de luz UV empregada para fotoativação dos grupos diazirina.

A escolha de comprimento de onda foi baseada na linha L do mercúrio em 365 nm, sendo o comprimento de onda ótimo para ativação de grupos diazirina entre 350 e 360 nm.^{52,65} Após 3 minutos de pré-aquecimento da lâmpada, as amostras foram transferidas para béqueres de 5 mL e irradiadas a temperatura ambiente por 15 min. Uma alíquota de 300 μ L foi separada para a redução das ligações dissulfeto (Etapa 4), enquanto os 100 μ L restantes foram reservados para análise por MS.

As soluções ativadas na fonte de radiação UV foram transferidas de volta para microtubos e tratadas com tampão fosfato 50 mM pH 8,0 e DTT 25 mM por 2 h a 37°C, ou então TCEP 25 mM pH 7,0 por 2 h a temperatura ambiente. Após redução, as soluções resultantes foram dessalinizadas em cartuchos Oasis HLB usando o mesmo procedimento descrito no item 2.3.2., e as soluções aquosas resultantes (100 μ L) foram submetidas a análise por MS.

Quando necessária a alquilação dos grupos tiol para os peptídeos P4 e P5 (ver item 2.4.1. em *Resultados e Discussão*), após redução e dessalinização, as amostras foram diluídas para 500 μ L com tampão fosfato 50 mM pH 8.0 e a cada uma foi adicionada solução de iodoacetamida 250 mM no mesmo tampão até uma concentração final de 60 mM. As reações foram mantidas na ausência de luz à temperatura ambiente por 2 h, período após o qual a mistura reacional foi

submetida a uma etapa final de dessalinização em cartuchos Oasis HLB da mesma maneira que as anteriores (item 2.3.2.). As amostras em soluções aquosas concentradas (100 μL) foram então submetidas à análise por MS.

2.3.3. Reação do SDAD com mioglobina

O procedimento para reação foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante para ligação cruzada *in vitro* (Thermo Fisher).⁶⁶ A 200 μL de uma solução 50 μM de mioglobina em tampão fosfato 50 mM pH 7,0, foi adicionada uma solução recém-preparada de SDAD em DMF anidra (10 mg mL^{-1}) a uma concentração final de 500 μM (excesso molar de 10x em relação à proteína). A reação foi mantida sob agitação leve a temperatura ambiente por 30 min, seguido de adição de tampão Tris.HCl 1M pH 7,0 para uma concentração final de 50 mM e 15 min de agitação a temperatura ambiente, para finalizar a reação da porção éster de NHS do ALC. Uma alíquota de 20 μL da mistura reacional foi separada nesse ponto para análise por LC-MS.

A mistura foi então transferida para filtros de centrifuga Microcon YM-10 (Millipore), com peso molecular de corte (MWCO) de 10 kDa, para eliminar o excesso de ALC não reagido. Os filtros foram inicialmente lavados com duas centrifugações de 500 μL de H_2O , seguido de carregamento da amostra e três filtragens sucessivas por centrifugação a 12,000 x g, sempre diluindo-se o sobrenadante restante a 500 μL com tampão fosfato 50 mM pH 7,0 antes de cada centrifugação. Após filtração, o sobrenadante resultante (~50 μL) foi diluído a 200 μL com tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e transferido para um béquer de vidro de 5 mL, sendo a solução irradiada na fonte de luz UV por 10 min. Uma alíquota de 20 μL foi separada após essa etapa para redução das ligações dissulfeto e análise por LC-MS da proteína não-digerida, enquanto que os 180 μL restantes foram submetidos a digestão em solução com tripsina, que foi adicionada em proporção 1:50 enzima/substrato. Após essa etapa, uma alíquota (20 μL) foi separada para análise por LC-MS/MS, e o volume restante foi submetido a redução das ligações dissulfeto, mediante adição de TCEP 0.5 M pH 7,0 para uma concentração final de 25 mM e agitação leve a 37°C por 30 min. As soluções resultantes foram então

reservadas para análise por LC-MS/MS.

2.3.4. Análise por MS

Espectros de MALDI(+) e ESI(+)-QTOF-MS e MS/MS dos peptídeos foram adquiridos em um instrumento Waters MALDI Q-Tof Premier no modo-*V reflectron*, operando com um laser de estado sólido de 200 Hz (Nd:YAG). Um microlitro de amostra aquosa foi diluído a 10 μL com MeCN (0,1% de TFA), e a solução resultante misturada 1:1 com solução 10 mg mL^{-1} de matriz α -CHCA em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 1:1 com 0,1% TFA. As misturas (1,6 μL) foram então aplicadas diretamente em placas de aço para MALDI e secadas ao ar. Condições de operação típicas para o instrumento foram energia do *laser* 250 a.u. e voltagem de placa 10 V. A calibração foi feita com adutos de sódio de PEG 600/1000/2000 entre *m/z* 300 e 3000. Para todos os experimentos de MS/MS de peptídeos, os espectros foram adquiridos manualmente aumentando-se a energia de colisão até que o íon precursor selecionado fosse suficientemente fragmentado. Argônio foi utilizado como gás de colisão.

Experimentos de LC-ESI(+)-QTOF-MS das proteínas não-digeridas e LC-ESI(+)-QTOF-MS/MS com aquisição dependente de dados (DDA) dos digestos protéicos foram feitos em um cromatógrafo Waters nanoAcquity UPLC acoplado a um espectrômetro Waters Synapt HDMS, equipado com fonte de *nanoESI*. Tipicamente, 2 a 5 μL de amostra aquosa foram injetados pelo auto-injetor do sistema UPLC e direcionados a uma pré-coluna Waters Symmetry C_{18} (20 mm \times 180 μm i.d.; partículas de 5 μm), onde foram dessalinizadas por 3 min com fluxo de 5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ de 97:3 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ com 0,1% ácido fórmico, sendo então transferidas para a coluna analítica Waters BEH130 C_{18} (100 mm \times 100 μm i.d.; partículas de 1,7 μm) e eluídas com com fluxo de 1,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ de gradiente linear de 97:3 a 30:70 de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ com 0,1% de ácido fórmico por 60 minutos. Argônio foi utilizado como gás de colisão nas celas *Trap* e *Transfer*.

2.3.5. Identificação de produtos de ligação cruzada em experimentos de LC-MS/MS

As corridas de LC-MS/MS foram processadas com o ProteinLynx Global Server v.2.2. (Waters) e analisadas por busca em banco de dados pelo MASCOT v.2.2. (Matrix Science Ltd).⁶⁷ Modificações correspondentes ao ALC SDAD após reação no éster de NHS e ativação das diazirinas ($C_{10}H_{15}NO_2S_2$, 245 Da), porção ligada pelo éster de NHS após redução (C_3H_4OS , 88 Da) e porção ligada pela diazirina após redução ($C_7H_{13}NOS$, 159 Da) foram criadas e selecionadas como modificações variáveis. As buscas foram feitas no banco de dados SwissProt, considerando-se até três sítios de clivagem ignorados pela enzima (tripsina) e tolerância de erro de massa de 0,1 Da para espectros de MS e MS/MS. A comparação entre peptídeos modificados antes e após redução das ligações dissulfeto do ALC permitiu identificar as espécies com ligação cruzada intramolecular, que apresentariam modificação de +245 Da antes da redução, e duas modificações distintas de +88 e +159 Da após a redução (Figura 10).

A identificação de peptídeos contendo ligação cruzada intermolecular foi auxiliada pela ferramenta de busca de ligações cruzadas do GPMW v.7.10., disponível livremente.⁶⁸ Um ALC correspondendo ao SDAD ativado ($C_{10}H_{15}NO_2S_2$, 245 Da) foi criado, e configurado como heterobifuncional, com ambas as especificidades de reação amina – ácido carboxílico e amina – amina. Essa escolha foi feita devido a limitações do *software*, que permite apenas especificidades de ligação entre aminas e outras aminas, ácidos carboxílicos, amidas, álcoois ou tióis. Considerando-se que na proteína estudada há uma quantidade maior de resíduos com cadeias laterais do tipo amina e ácido carboxílico que os demais resíduos (amidas, álcoois e tióis), a escolha de especificidade feita representa a maioria das possibilidades de ligação cruzada

intermolecular do SDAD nesse sistema. Duas listas teóricas de peptídeos com ligação cruzada intermolecular foram geradas (uma para amina – amina e outra para amina – ácido carboxílico), e buscas foram feitas a partir de listas de íons multicarregados das corridas de LC-MS/MS, sendo criada uma lista de m/z de íons candidatos a peptídeos com ligação cruzada intermolecular. Os espectros de MS/MS desses íons candidatos foram então extraídos das corridas de LC-MS/MS e interpretados manualmente para avaliar a presença ou não de ligação cruzada intermolecular através dos íons fragmentos observados.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1. Monitoramento das etapas de reação de ligação cruzada por MALDI(+)-QTOF-MS

Como um estudo inicial, foram feitas reações entre o ALC SDAD e os peptídeos sintéticos P1 (Ac-ARVALKAV), P2 (Ac-ARAYVALKA) e P3 (Ac-ARAHVALKA), para identificar os tipos de produtos reacionais formados após cada etapa reacional (Figura 10), em uma metodologia desenvolvida para formar ligações cruzadas intramoleculares.

Na primeira etapa, a reação na porção éster de NHS do ALC com os peptídeos ocorreu quase quantitativamente (sinal de peptídeo não modificado com intensidade inferior a 10% da do modificado, Figuras 12A e 13A), resultando na ligação da molécula do ALC nas cadeias laterais de resíduos de lisina como esperado (produtos PX_A , Figura 10). As Figuras 12A e 13A exibem espectros representativos para os peptídeos P1 e P3 após a Etapa 1. Uma vez que o laser empregado na fonte de MALDI utiliza radiação UV em 355 nm, a fotoativação dos grupos diazirina foi observada durante a ionização de todos os produtos não-ativados, de forma que íons do tipo $[PX_A-N_2]$ são predominantes nos espectros de MALDI(+).

A eliminação de N_2 não foi observada como resultado do processo de ionização em espectros de ESI(+) dos peptídeos (exemplo representativo para P5 na Figura 14), sendo observada apenas em pequena proporção quando foi empregada a energia de colisão padrão do instrumento (10,0) na aquisição do espectro. Mediante redução da energia de colisão para 0,10, a perda de N_2 não foi mais observada, demonstrando a ausência de ativação das diazirinas e eliminação de N_2 durante a reação de acoplamento da porção éster de NHS na Etapa 1.

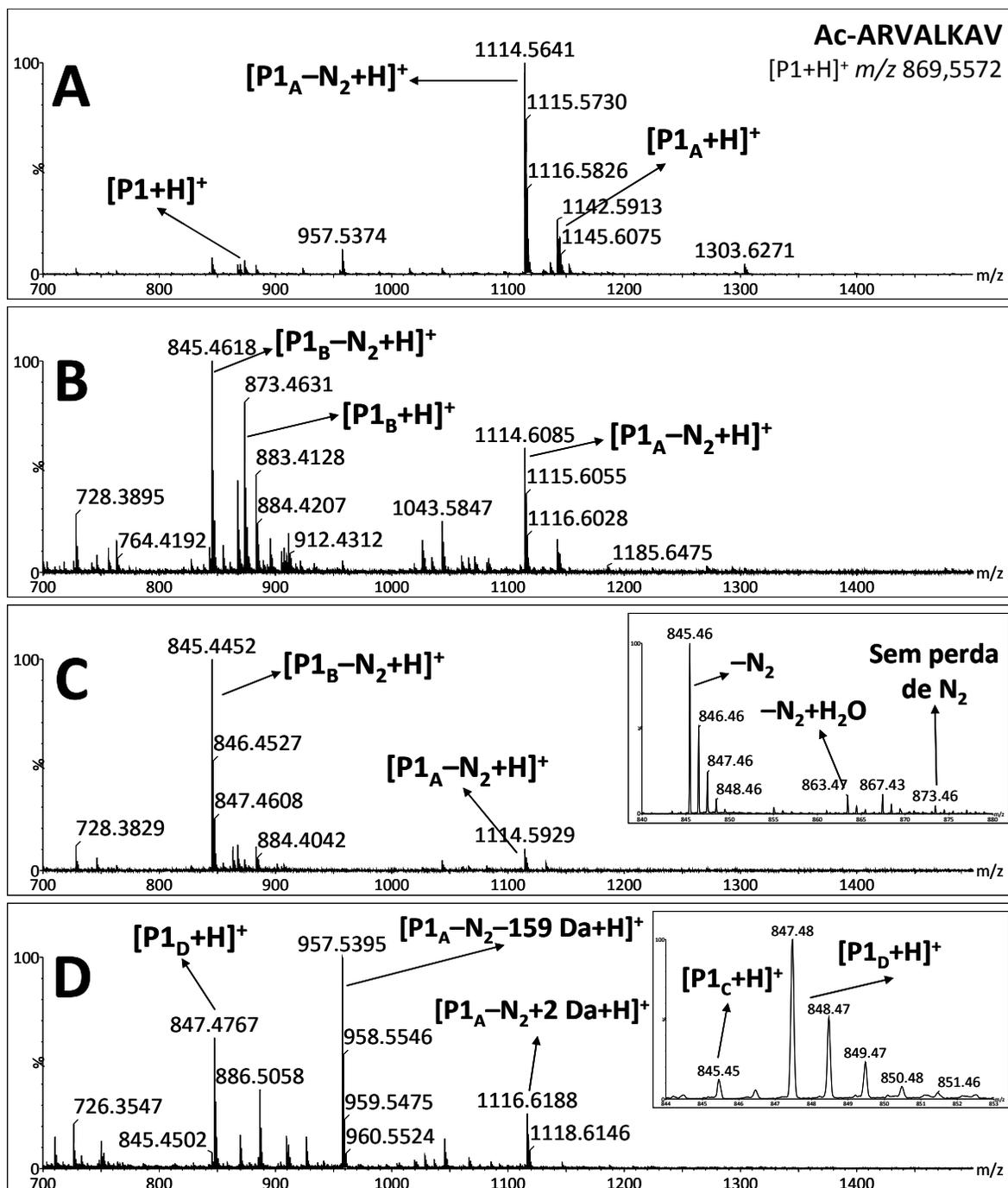


Figura 12. Espectros de MALDI(+)-QTOF representativos para P1 (Ac-ARVALKAV) após A) Etapa 1; B) Etapa 2; C) Etapa 3 e D) Etapa 4 (ver Figura 10).

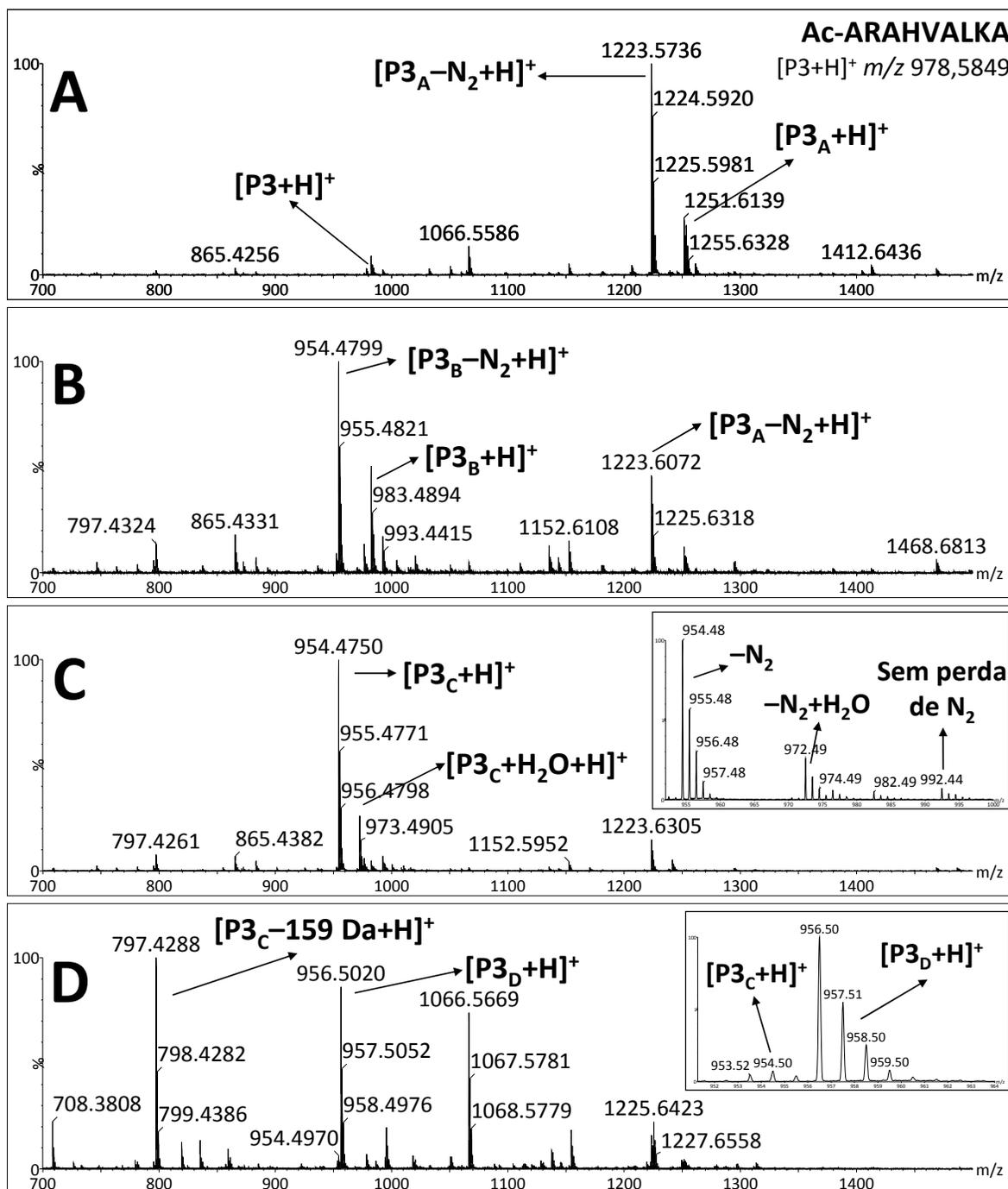


Figura 13. Espectros de MALDI(+)-QTOF representativos para P3 (Ac-ARAHVALKA) após **A)** Etapa 1; **B)** Etapa 2; **C)** Etapa 3 e **D)** Etapa 4 (ver Figura 10).

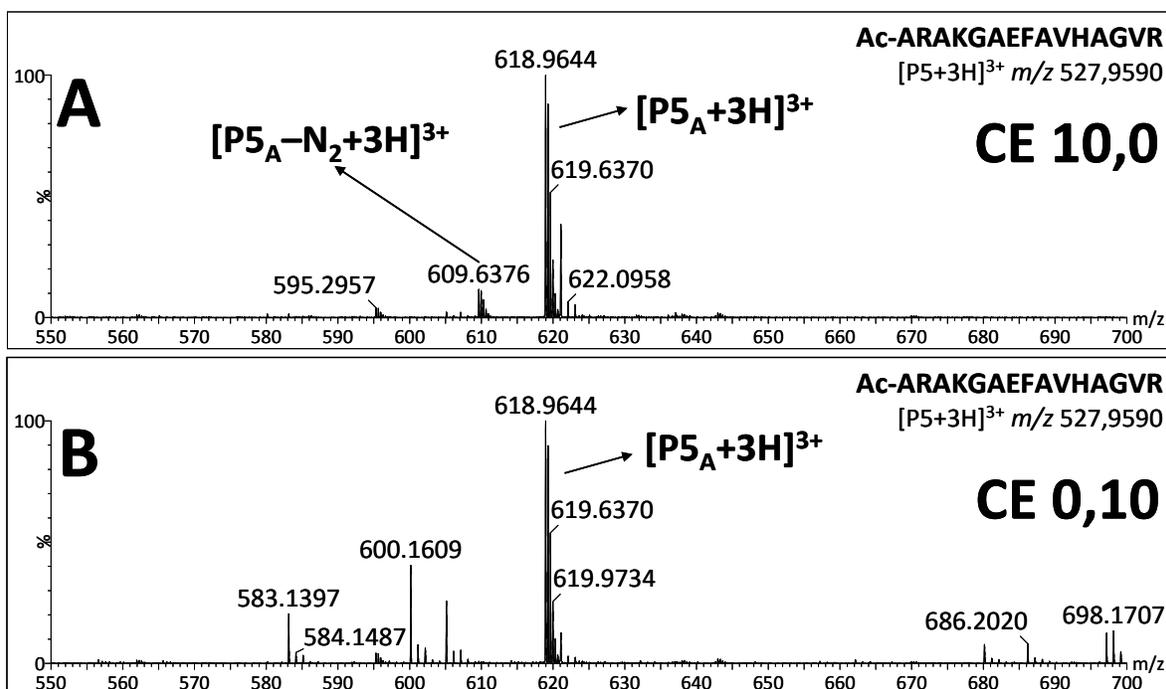


Figura 14. Espectros de ESI(+)-QTOF representativos com energia de colisão ajustada para **A)** 10,0 e **B)** 0,10. Note o íon $[P5_A-N_2+3H]^{3+}$ em m/z 609 representando a perda de N_2 no espectro superior (~10% em intensidade em relação a m/z 618) e a ausência do mesmo no espectro inferior, demonstrando que a perda é unicamente resultado da energia de colisão aplicada na cela durante a análise.

Na segunda etapa, a digestão com tripsina produziu peptídeos clivados após o resíduo de arginina, com perda de Ac-AR (produtos PX_B da Figura 10, espectros representativos nas Figuras 12B e 13B), embora observando-se a presença residual de peptídeos não digeridos. A presença de íons para os quais não ocorreu eliminação de N_2 como nos espectros das Figuras 12A e 13A corresponde possivelmente a espécies em que o grupo diazirina sofreu isomerização para uma forma diazo mediante incidência de radiação UV (Figura 8),^{48,52} não sendo mais capazes de eliminar N_2 .

Na terceira etapa, a fotoativação dos grupos diazirina (Figuras 12C e 13C) resultou em dois produtos principais relativos à eliminação de N_2 a partir de produtos PX_B , seguidos de inserção do carbeno resultante em: (1) um resíduo de aminoácido ou a própria cadeia do ALC (sem deslocamento de massa, produtos PX_C) e (2) em uma molécula de H_2O (deslocamento de massa +18 Da, produtos $[PX_C+H_2O]$). Embora produtos de inserção dos carbenos em moléculas de água do

solvente foram observados como esperado^{46,52} (como $[P1_C+H_2O]$ e $[P3_C+H_2O]$, Figuras 12C e 13C), os picos observados correspondentes a produtos de inserção do carbeno sem deslocamentos adicionais de massa (produtos PX_C) possuem intensidade bastante superior. Esses picos representam produtos isóbaros, correspondendo a inserções do carbeno na cadeia do peptídeo (resultando em uma ligação cruzada intramolecular, rota A da Figura 15) ou inserção na própria cadeia do ALC, o que inclui rearranjos intramoleculares para gerar diferentes produtos, como isômeros cíclicos e alcenos (rota C da Figura 15).

A quarta etapa, envolvendo a redução das ligações dissulfeto em dois grupos tiol, foi realizada com ditioneitol (DTT) ou tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), sendo este último mais eficiente. Dentre os produtos observados após redução das ligações dissulfeto (Figuras 12D e 13D) estão a ligação cruzada intramolecular reduzida (produtos PX_D , com duas modificações distintas em dois resíduos de aminoácido) e a perda parcial da cadeia do ALC (uma perda de 159 Da, resultando em peptídeos com deslocamento de massa de apenas + 88 Da. Tais íons com perda de 159 Da após redução das ligações dissulfeto podem ser originados de duas espécies diferentes: (1) aquelas em que o carbeno reagiu por inserção em sua própria cadeia, em uma ligação localizada necessariamente entre a ligação S-S e o carbeno (rota C da Figura 15), de forma que a redução da ligação S-S eliminaria parte da cadeia do ALC como um tiol livre; e (2) aqueles em que o carbeno se inseriu em uma ligação O-H de uma molécula de H_2O (rota B da Figura 15) que, após redução da ligação S-S formariam a mesma espécie do primeiro caso, com uma modificação com grupo tiol livre de 88 Da nos resíduos de lisina. Essas duas origens distintas para um mesmo íon contribuem para sua maior intensidade quando comparado com os produtos PX_C , como na Figura 12D.

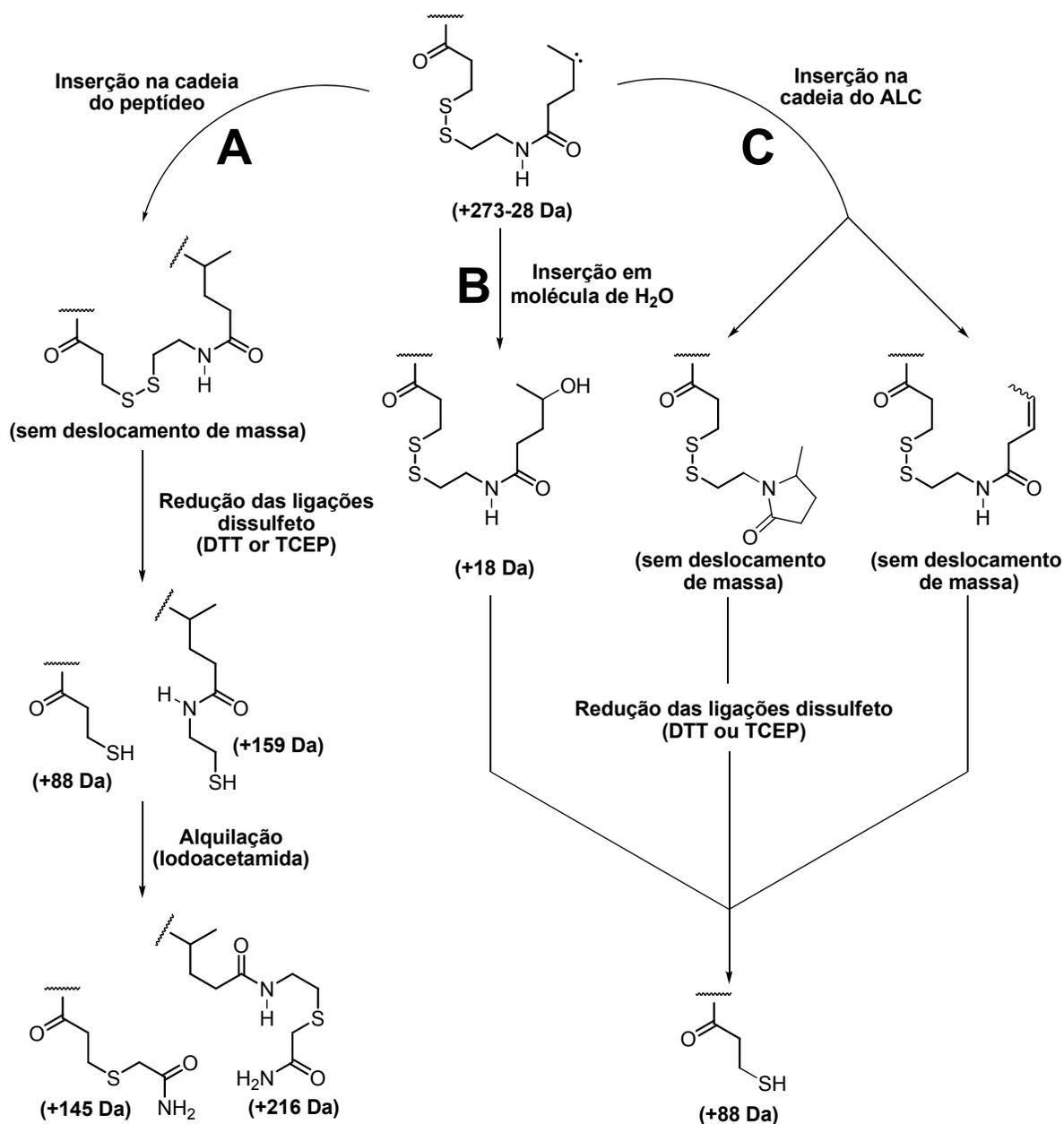


Figura 15. Representação esquemática de possíveis rotas reacionais para o carbeno gerado mediante eliminação de N_2 de grupos diazirina em solução aquosa, mostrando também os produtos subsequentes após reações de redução das ligações dissulfeto (P1, P2 e P3) ou após redução e alquilação dos tióis (P4 e P5). A) Inserção em uma ligação da cadeia do peptídeo, gerando duas modificações distintas após redução das ligações dissulfeto (P1, P2 e P3), e redução seguida por alquilação dos tióis (P4 e P5). B) Inserção em uma molécula de água, gerando um composto com deslocamento de massa de $+18$ Da que leva a perda parcial da cadeia do ALC após redução das ligações dissulfeto, formando um produto com uma modificação de $+88$ Da. C) Inserção em uma ligação da cadeia do ALC entre o grupo dissulfeto e o carbeno, resultando em diferentes possíveis isômeros, todos levando à perda parcial da cadeia do ALC após redução das ligações dissulfeto, formando um produto com uma modificação de $+88$ Da.

Após estabelecer os principais produtos reacionais resultantes da aplicação do ALC SDAD a peptídeos, experimentos foram feitos com os peptídeos mais longos P4 (Ac-ARAKGAEFAVYAGVR) e P5 (Ac-ARAKGAEFAVHAGVR), contendo uma maior diversidade de tipos de resíduo de aminoácido. Uma vez que o objetivo foi de avaliar o comportamento do ALC frente a uma variedade mais ampla de resíduos de aminoácido, esses dois peptídeos não foram digeridos com tripsina (Etapa 2) após reação com o ALC na porção éster de NHS (Etapa 1). As etapas reacionais para P4 e P5 foram idênticas àquelas para P1, P2 e P3, exceto pelo fato que a redução das ligações dissulfeto na Etapa 3 não pôde ser obtida quantitativamente, mesmo com concentrações maiores de DTT ou TCEP e tempos reacionais mais longos. Para superar esse problema, os produtos parcialmente reduzidos dos peptídeos P4 e P5 após a Etapa 4 foram submetidos a reações de alquilação com iodoacetamida, de forma a produzir deslocamentos de massa de +57 Da (uma alquilação) ou +114 Da (duas alquilações) em seus íons.

Esses deslocamentos de massa foram planejados de forma a facilitar o isolamento de íons com ligações dissulfeto reduzidas daqueles com ligações oxidadas pelo quadrupolo operando no modo filtro de m/z do instrumento, para obtenção de espectros de íons produtos após fragmentação, visto que a diferença de m/z entre íons oxidados e reduzidos é de apenas 2. Os produtos principais observados após alquilação (Figura 16) foram as versões mono- e dialquiladas dos produtos PX_D ($[PX_D+57 Da]$ e $[PX_D+114 Da]$), bem como uma versão alquilada do produto $PX_C - 159 Da$, sendo este último produto presente em quantidade bastante superior em relação aos produtos mono- e dialquilados, como demonstram os espectros das Figuras 16A e 16B.

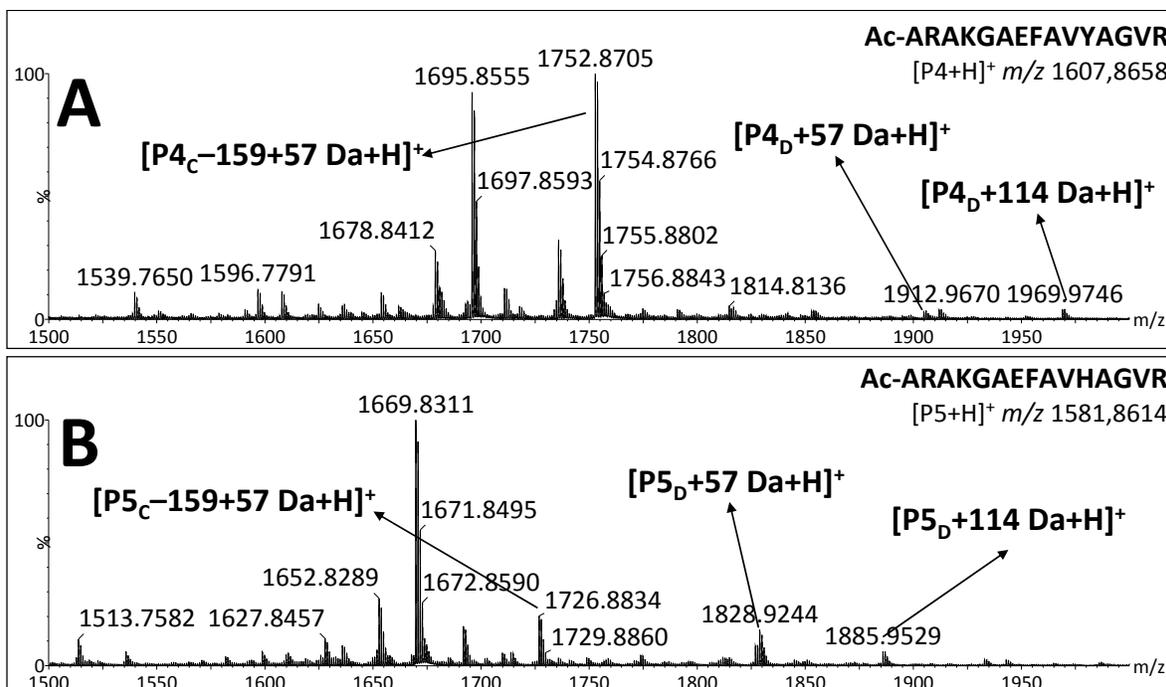


Figura 16. Espectros de MALDI(+)-QTOF representativos para **A)** P4 (Ac-ARAKGAEFVYAGVR) e **B)** P5 (Ac-ARAKGAEFVHAGVR) após alquilação dos grupos tiol com iodoacetamida (ver Figura 15).

Ainda que com a metodologia empregada não tenha sido possível alquilar quantitativamente os grupos tiol (sendo a presença de DTT ou TCEP residuais um possível motivo⁶⁹), os produtos mono- e dialquilados foram gerados em quantidade suficiente para permitir experimentos de MS/MS visando obter espectros de íons produtos dos mesmos.

No intuito de investigar a reatividade do ALC SDAD em peptídeos contendo resíduos de cisteína, o peptídeo P6 (Ac-AGRVNIFYFLGCAR) foi utilizado. A análise por MALDI-QTOF-MS após a reação na porção éster de NHS (Etapa 1) revelou a formação de uma mistura complexa de produtos, além do produto esperado P6_A, na forma de um íon [P6_A-N₂+H]⁺. A razão para essa diversidade de produtos são reações laterais de troca entre dissulfetos,¹⁵ ocorrendo entre o grupo tiol do resíduo de cisteína do peptídeo e a ligação dissulfeto do ALC. Alguns íons identificados como produtos de troca exibem deslocamentos de massa de + 184 Da e +184 Da -N₂ (troca com o átomo de enxofre mais próximo da diazirina), bem como +104 Da (troca com átomo de enxofre mais próximo ao éster e NHS, seguido de hidrólise do éster). Para evitar tais reações laterais levando à formação

de vários produtos indesejados, a redução e alquilação de resíduos de cisteína torna-se necessária quando da aplicação do SDAD a proteínas contendo tais resíduos.

2.4.2. Identificação de resíduos modificados pelo SDAD por MS/MS

Espectros de íons produtos foram adquiridos selecionando-se íons monocarregados $[PX_D+H]^+$ dos peptídeos P1 (Figura 17A), P2 (Figura 17B) e P3, e íons dialquilados $[PX_D+114 Da+H]^+$ dos peptídeos P4 (Figura 18A) e P5 (Figura 18B), de forma a localizar as modificações resultantes de reação nas porções éster de NHS e diazirina do ALC (Figura 10), verificando assim a ocorrência de ligações cruzadas intramoleculares na forma de modificações distintas em dois resíduos de aminoácido após redução da ligação dissulfeto.

Os espectros assim obtidos para íons $[PX_D+H]^+$ demonstram séries de íons $a_n+88 Da$, $b_n+88 Da$ e $y_n+88 Da$, contendo a modificação da porção éster de NHS (Figura 10). Íons da série b são consistentes com os resíduos de lisina sendo os sítios de reação com os ésteres de NHS. Como exemplo, para P1, há íons $b_4+88 Da$ e $b_5+88 Da$, bem como íons y_2 não modificados (Figura 17A). Para P2, há íons b_2 , b_3 , b_4 e b_5 não modificados, enquanto que íons $b_6+88 Da$ e $y_2+88 Da$ demonstram que a modificação se encontra no resíduo de lisina; nenhum íon sugerindo modificação no resíduo de tirosina foi observado. Também foram detectados nos espectros íons contendo a modificação da porção diazirina (Figura 10), como $b_2+159 Da$ e $y_4+247 Da$ para P1, além de $b_3+159 Da$, $b_4+159 Da$, $b_5+159 Da$ e $y_3+247 Da$ para P2. A presença desses íons confirma a formação de ligações cruzadas intramoleculares por meio do ALC SDAD.

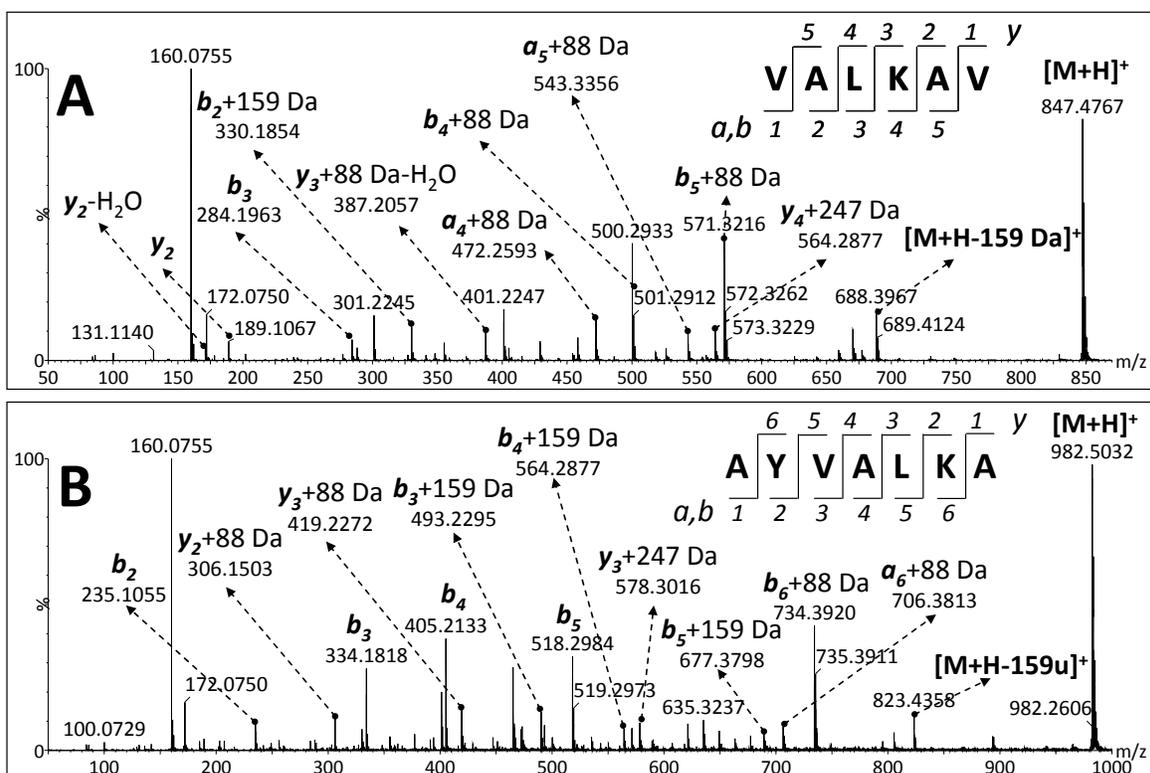


Figura 17. Espectros de íons produtos para **A)** $[P1_D+H]^+$ de m/z 847,48 e **B)** $[P2_D+H]^+$ de m/z 982,50. O esquema da Figura 10 ilustra os deslocamentos de massa de +88 Da (modificação da porção éster de NHS) e +159 Da (modificação da porção diazirina).

Algumas características interessantes dos espectros da Figura 17 são uma perda neutra de 159 Da do precursor e um íon intenso de m/z 160, sendo identificados como eliminação da modificação da porção diazirina do ALC, como perda neutra ou íon. A razão para essas características pode ser uma rota de fragmentação preferencial em que a modificação da porção diazirina é eliminada de início, como um íon ou perda neutra. Perdas de 159 Da do íon precursor e íons de m/z 160 foram observados para íons $[PX_D+H]^+$ de todos os peptídeos estudados. Tal comportamento durante a fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) é similar ao de ALC homobifuncionais do tipo éster de NHS (como DSS), para os quais há formação de íons marcadores envolvendo a cadeia do ALC, que podem ser usados para identificar peptídeos contendo ligação cruzada por experimentos do tipo varredura de íons precursores (PIS), ou pseudo-PIS em instrumentos QTOF.⁴¹ Para P2, a presença de íons b_3+159 Da, b_4+159 Da

e b_5+159 Da, somado a y_4+247 Da, indicam os resíduos de alanina, valina e leucina como possíveis sítios de reação para o intermediário carbeno.

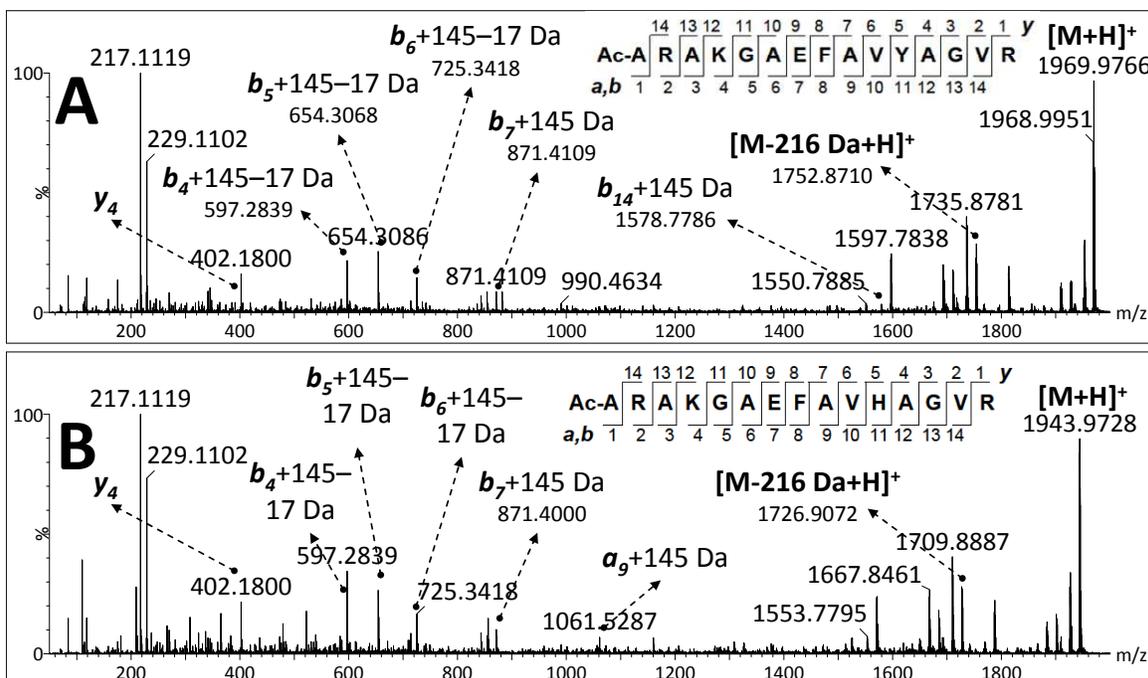


Figura 18. Espectros de íons produtos para **A)** $[P4_D+114 \text{ Da}+H]^+$ de m/z 1968,99 e **B)** $[P5_D+114 \text{ Da}+H]^+$ de m/z 1942,96. Modificações de +145 Da e +216 Da são versões alquiladas das modificações +88 Da e +159 Da (Figura 15).

Espectros de íons produtos para os íons dialquilados $[PX_D+114 \text{ Da}+H]^+$ dos peptídeos P4 e P5 demonstram íons consistentes com modificação da porção éster de NHS nos resíduos de lisina (+145 Da após alquilação), assim como para P1 e P2. Uma vez que tais espectros para P4 e P5 também contêm íons representando perda neutra da modificação da porção diazirina (-216 Da após alquilação) e íons de m/z 217, a ausência de íons b_n+216 Da e y_n+216 Da nesses espectros foi atribuída como devido à rota preferencial de fragmentação que leva à eliminação da modificação da porção diazirina ocorrer com uma extensão maior para esses peptídeos.

2.4.3. Análise por LC-MS e MS/MS de ligação cruzada com SDAD em mioglobina

Para validar o uso do ALC SDAD em sistemas protéicos reais, reações de ligação cruzada foram feitas tendo-se como alvo a mioglobina equina. Dentre as razões estão seu tamanho pequeno (~17 kDa), estabilidade, facilidade de manuseio e presença de um número apreciável de resíduos de lisina passíveis de modificação pela porção éster de NHS do ALC. Após reação na porção éster de NHS nas condições sugeridas pelo fabricante (Thermo Fisher),⁶⁶ o espectro deconvoluído de LC-MS (Figura 19A) mostra o acoplamento de até nove moléculas de ALC por molécula de proteína.

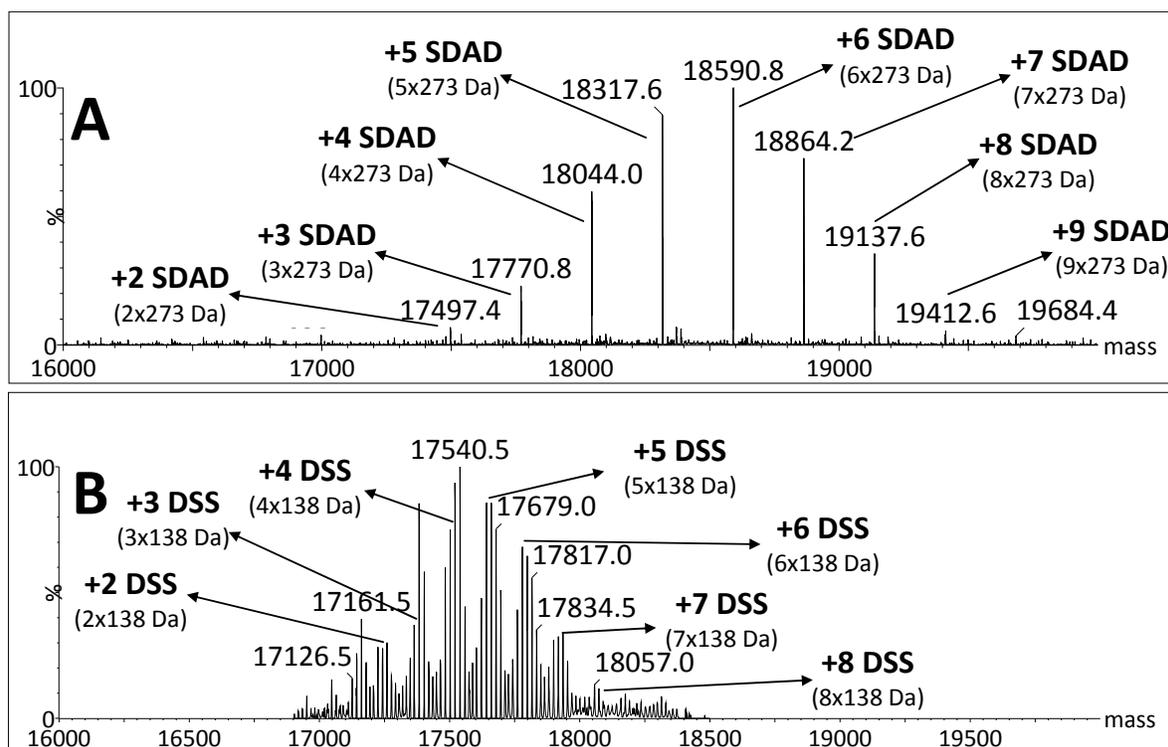


Figura 19. Espectros deconvoluídos de LC-MS após reação de mioglobina com **A)** SDAD (porção éster de NHS), excesso molar 10:1, sendo que no espectro foram anotados íons correspondendo a várias modificações na forma de reação apenas pela porção éster de NHS (+273 Da, Figuras 7 e 10); e **B)** DSS, excesso molar de 10:1; sendo que no espectro foram anotados íons correspondendo a várias modificações do tipo XL (+138 Da, Figura 3). As deconvoluções foram obtidas empregando-se o algoritmo MaxEnt1 (Waters).

Para fins de comparação, a reação com um ALC homobifuncional contendo ésteres de NHS nas mesmas condições resulta em moléculas de proteína

contendo até oito modificações. Entretanto, o número de moléculas do ALC ligadas por molécula de proteína não pode ser diretamente correlacionado com o número real de ligações cruzadas, visto que o DSS requer a presença de duas lisinas distando espacialmente em ~ 12 Å para formar uma ligação cruzada intermolecular. O SDAD, por sua vez, é teoricamente capaz de ligar um resíduo de lisina a qualquer outro resíduo em distância apropriada de ~ 13 Å,⁶⁶ devido à inespecificidade do intermediário carbênico formado após a ativação dos grupos diazirina.^{46,48} Um determinado número de moléculas de SDAD ligadas por molécula proteína tem, portanto, potencial para formar maior quantidade de ligações cruzadas distintas do que o mesmo número de moléculas de DSS ligadas por molécula de proteína.

Após ativação dos grupos diazirina na fonte de luz UV, amostras de mioglobina foram digeridas com tripsina, e os peptídeos resultantes foram analisados diretamente por LC-MS/MS, ou então previamente tratados com TCEP para reduzir as ligações dissulfeto e então analisados para LC-MS/MS. A comparação entre ambos os conjuntos de dados obtidos dessa maneira foi planejada de forma a permitir a identificação de peptídeos contendo ligações cruzadas intra- e intermoleculares, bem como outras espécies modificadas pelo ALC SDAD. Os dados espectrais foram processados e analisados pelo mecanismo de busca em banco de dados MASCOT. Os resultados assim obtidos foram agrupados na Tabela 1.

Dentre os produtos identificados estão aqueles contendo ligações cruzadas intra- e intermoleculares (+245 Da) após ativação dos grupos diazirina, e peptídeos contendo as modificações da porção éster de NHS (+88 Da) e porção diazirina (+159 Da) após redução das ligações dissulfeto.

Tabela 1. Peptídeos modificados (mioglobina) após ativação dos grupos diazirina, ou após ativação dos grupos diazirina e redução das ligações dissulfeto do ALC, identificados por LC-MS/MS.

Tipo de ligação cruzada	Após ativação dos grupos diazirina	m/z Exp. (Erro em ppm)	Após ativação e redução das ligações dissulfeto	m/z Exp. (Erro em ppm)
	HLKTEAEMK + 245 u	666,3085 (+22,9) [M+2H] ²⁺	HLKTEA EMK + 88 u + 159 u	635,9549 (-13,3) [M+3H] ³⁺
	YKELGFQG + 245 u	593,7645 (-35,2) [M+2H] ²⁺	YKELGF QG + 88 u + 159 u	594,7720 (-5,0) [M+2H] ²⁺
	TEAEMKASEDLK + 245 u	798,8481 (+18,8) [M+2H] ²⁺	<u>TEAEMKASEDLK</u> + 88 u + 159 u	799,8538 (-6,7) [M+2H] ²⁺
	TEAEMKASEDLKK + 245 u	862,8972 (+19,2) [M+2H] ²⁺	<u>TEAEMKASEDLKK</u> + 88 u + 159 u	576,2624 (-19,3) [M+3H] ³⁺
Intramolecular	LFTGHPETLEKFDK + 245 u	636,2997 (+6,9) [M+3H] ³⁺	LFTGHPETLE K FDK + 88 u + 159 u	636,9613 (-28,3) [M+3H] ³⁺
	HKIPIKYLEFISDAIIHVLHSK + 245 u	570,1052 (-4,4) [M+5H] ⁵⁺	HKIPIK + 88 u	412,2264 (-36,8) [M+2H] ²⁺
			YLEFISDAI I HVLHSK + 159 u	682,0289 (+7,3) [M+3H] ³⁺
	ASEDLK K HGTVVLTALGGILK + 2 x 245 u	880,7888 (+9,5) [M+3H] ³⁺	ASE DLK K HGTVVLTALGGILK + 2 x 88 u + 159 u	829,1094 (-3,6) [M+3H] ³⁺
	KGHHEAEL K PLAQSHATK + 245 u	446,2164 (-9,7) [M+5H] ⁵⁺	KGHHEA E LKPLAQSHATK + 88 u + 159 u	446,6183 (-12,5) [M+5H] ⁵⁺
Intermolecular	GLSDGEWQQVLNVWGK + 245 u + ALELFR	936,8205 (+21,5) [M+3H] ³⁺	GLSDGEWQQVLNVWGK + 88 u	952,4361 (-18,8) [M+2H] ²⁺
			A E LELFR + 159 u	454,2504 (+14,8) [M+2H] ²⁺

Sítios de modificação (atribuídos pelo MASCOT) pelo éster de NHS (+88 Da) estão em negrito itálico, e sítios modificados pela porção do grupo diazirina (+159 Da) estão em negrito sublinhado.

Vale ressaltar aqui que o número de peptídeos modificados com ligações cruzadas intermoleculares exibidos na Tabela 1 limita-se apenas àqueles em que a ligação ocorreu entre peptídeos contendo resíduos de amina e ácidos glutâmico ou aspártico, de acordo com a especificidade de busca empregada pelas ferramentas de bioinformática utilizadas. Idealmente, para se mapear todas as ligações cruzadas formadas por um ALC como o SDAD, seria necessário buscar por ligações entre resíduos de amina e quaisquer outros resíduos, dada a inespecificidade do intermediário carbênico do ALC. Esse tipo de busca é, no entanto, muito difícil de realizar de forma eficiente com as ferramentas atualmente disponíveis, o que torna essa abordagem inviável. No entanto, os produtos detectados podem ser utilizados como prova de conceito da possibilidade de se empregar o SDAD como ALC para experimentos de ligação cruzada.

O espectro de íons produtos para o peptídeo LFTGHPETLEKFDK contendo ligação cruzada intramolecular (Figura 20A) demonstra todas as características encontradas em experimentos similares para peptídeos sintéticos, como a perda neutra de 159 Da a partir do íon precursor e a formação de um íon intenso de m/z 160. A presença de íons y_3 não-modificado e y_4+88 Da indica o resíduo de lisina do meio da cadeia como sítio de reação da porção éster de NHS, ao passo que a presença de um íon $[y_8+247 \text{ Da}]^{2+}$ indica o resíduo de ácido glutâmico adjacente à lisina como possível sítio de reação para a porção diazirina.

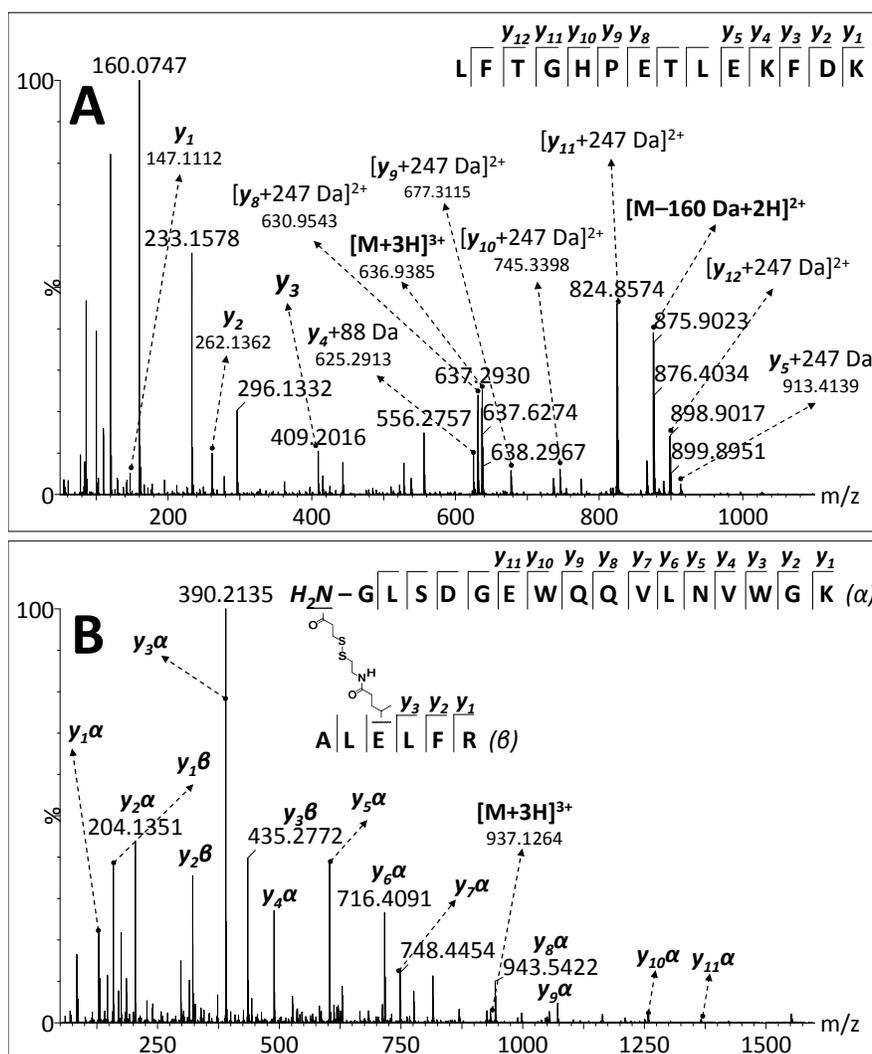


Figura 20. Espectros de íons produtos representativos para ligação cruzada intra- e intermolecular em mioglobina. **A)** Peptídeo LFTGHPETLEKFDK com ligação cruzada intramolecular na forma de duas modificações distintas (+88 Da e +159 Da) após redução da ligação dissulfeto, $[M+3H]^{3+}$ de m/z 636,95. **B)** Ligação cruzada intermolecular entre peptídeos GLSDGEWQQVNLNVWGK e ALELFR, $[M+3H]^{3+}$ de m/z 937,12.

Outro produto identificado foi o com ligação cruzada intermolecular entre os peptídeos GLSDGEWQQVLNVWGK e ALELFR (Figura 20B), em que a molécula do SDAD se ligou ao resíduo de glicina *N*-terminal da proteína (pela porção éster de NHS) e ao resíduo de ácido glutâmico 136 (pela porção diazirina).

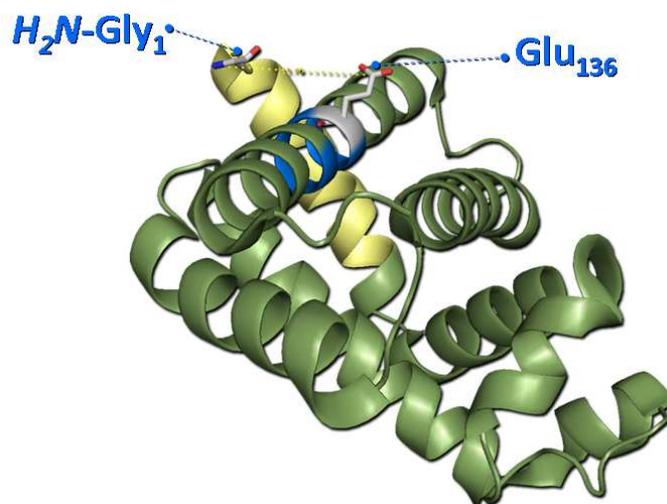


Figura 21. Estrutura tridimensional de mioglobina de coração de cavalo por difração de raios-X, registro 1WLA do PDB.^{70,71} Os resíduos de glicina e ácido glutâmico envolvidos na ligação cruzada intermolecular foram destacados de forma a exibir suas cadeias laterais. As regiões em amarelo e azul correspondem aos peptídeos GLSDGEWQQVLNVWGK e ALELFR, respectivamente.

Esses dois resíduos estão a uma distância de 11,7 Å (Figura 21), de acordo com a estrutura do PDB 1WLA (difração de raios-X de mioglobina de coração de cavalo selvagem e recombinante).^{70,71} Essa distância é compatível com a faixa de alcance proposta para esse ALC, que é de ~13 Å.⁶⁶

2.5. Conclusão

A formação de ligações cruzadas em peptídeos modelo sintéticos e uma proteína modelo por meio de um novo ALC heterobifuncional do tipo NHS-diazirina, fotoativável e clivável foi investigada. A ativação dos grupos diazirina foi alcançada mediante uso de uma fonte de luz UV simples e construída para esse fim, e as reações para obtenção de produtos com ligações cruzadas foram caracterizadas etapa por etapa. Bons rendimentos de ligação cruzadas foram observados para os peptídeos modelo e a proteína, demonstrando o potencial desse ALC do tipo NHS-diazirina para experimentos de MS3D.

Os espectros de íons produtos para todos os peptídeos com ligação cruzada intramolecular demonstram perdas características e portanto diagnósticas de 159 Da a partir do íon precursor, bem como a formação de um íon em m/z 160, sendo atribuídos a eliminação preferencial da porção diazirina do ALC ligada ao peptídeo através do intermediário carbênico. A maioria dos íons fragmentos de produtos de ligação cruzada pôde ser atribuída a íons fragmentos comuns para peptídeos (séries a, b e y), o que facilita a análise estrutural.

Uma vez que produtos resultantes de reações laterais de troca entre dissulfetos foram observadas quando o ALC foi aplicado a um peptídeo contendo um resíduo de cisteína com um tiol livre, a aplicação do SDAD a sistemas contendo resíduos de cisteína gera uma gama de produtos adicionais indesejados, e deve portanto ser evitada.

3. Capítulo II – Análise de mudanças conformacionais por mobilidade iônica acoplada a MS de proteínas contendo ligação cruzada

3.1. Introdução

A espectrometria de mobilidade iônica (IMS), inicialmente conhecida como cromatografia de plasma, foi introduzida na década de 60 e consiste em uma técnica de separação iônica em fase gasosa.⁷² As espécies são separadas com base em seus estados de carga e tamanhos/conformações, sendo este segundo fator melhor descrito por suas seções de choque de colisão (CCS). Tradicionalmente, íons são injetados em uma cela de deslocamento (DC) e colidem com um gás (tipicamente hélio), na presença de um fraco campo elétrico aplicado que os faz migrar através da cela, sendo detectados separadamente com base no tempo decorrido para percorrer a cela.⁷³

O primeiro acoplamento de mobilidade iônica com espectrometria de massas é creditado a E. W. McDaniel que, nas décadas de 50 e 60, desenvolveu celas de deslocamento com campos elétricos fracos e preenchidas com gás em pressões de 0,1 a 1,0 torr, acoplando-as a um espectrômetro de massas com analisador do tipo setor magnético, no intuito de estudar mobilidades iônicas e reações íon-molécula.⁷⁴ Espectrômetros de massa com analisadores do tipo Q^{75,76} e TOF⁷⁷⁻⁷⁹ rapidamente substituíram aqueles equipados com setores magnéticos e, nas décadas de 70 e 80, MS tornou-se a principal forma de análise de íons separados por celas de IM, com o primeiro instrumento do tipo IM-MS comercial sendo lançado em 1971.⁸⁰ Subseqüentes trabalhos de Jarrold *et al*,⁸¹ Kemper e Bowers⁸² contribuíram para a modernização dos instrumentos de IM-MS. Ainda que inicialmente focalizada no estudo de aglomerados (*clusters*) de íons e íons metálicos, a técnica de IM-MS tem encontrada vasta aplicação nos últimos anos na caracterização de uma variedade de compostos, como aglomerados (*clusters*) de carbono,^{83,84} aminoácidos,⁸⁵ peptídeos e proteínas,^{86,87} DNA⁸⁸ e polímeros sintéticos.⁸⁹

O valor de CCS e a carga dos íons são os principais fatores que regem a velocidade de deslocamento dos mesmos em celas de mobilidade. Moléculas com

menores valores de CCS atravessam a cela de gás em menor tempo de deslocamento (DT), ao passo que moléculas com maiores CCS colidem mais vezes com o gás, resultando em maior DT. Quanto maior a carga do íon, mais fortemente este sofre a ação da força atrativa devida ao campo elétrico aplicado na saída da cela, o que também diminui seu DT.

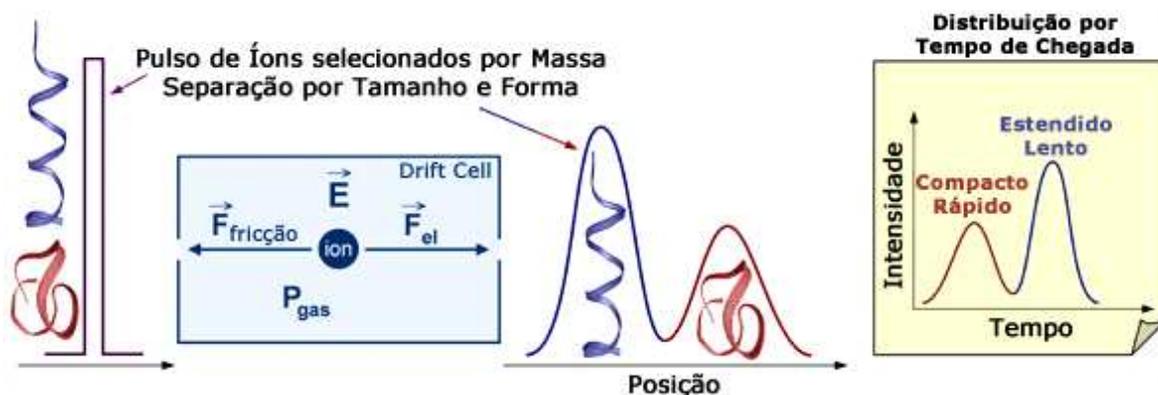


Figura 22. Esquema representando a separação de dois íons hipotéticos, um com conformação compacta e outro com conformação estendida, por mobilidade iônica.

A presença de uma cela de IM em um espectrômetro de massas fornece uma dimensão adicional para a caracterização de compostos, já que o deslocamento de íons em tais celas depende de outros parâmetros além da relação m/z , como a CCS, o tipo de gás utilizado e sua pressão na cela. Dessa maneira, compostos isoméricos podem ser separados devido à diferença de mobilidade,⁹⁰ como demonstrado na Figura 23, sendo a separação de isômeros um dos grandes atrativos da técnica. Potenciais aplicações desse fenômeno foram também extendidas em recente trabalho de Hill Jr. *et al*⁹¹ que, utilizando como gás de cela N_2 contendo 10% de (S)-(+)-butanol, foram capazes de resolver por mobilidade iônica enantiômeros de atenolol, com base nas diferentes mobilidades iônicas observadas para adutos dos enantiômeros do composto com o modificador quiral misturado ao gás, que formam diastereoisômeros passíveis de resolução, de maneira análoga a uma cromatografia quiral.

Em termos do poder de resolução de íons isoméricos em instrumentos do tipo IM-MS, estudos vem sendo feitos com arranjos instrumentais otimizados, visando incrementar essa capacidade. Nesse sentido, podemos destacar recentes trabalhos de Clemmer *et al*⁹² e Bowers *et al*,⁹³ em que foram alcançadas

resoluções de mobilidade entre 100 e 350 para análises de peptídeos e glicosídeos típicos, permitindo a separação de isômeros que diferiam em apenas ~1% em termos de CCS. No entanto, esse ganho em poder de resolução é associado a uma queda de sensibilidade, sendo essa uma questão que ainda deve ser abordada.

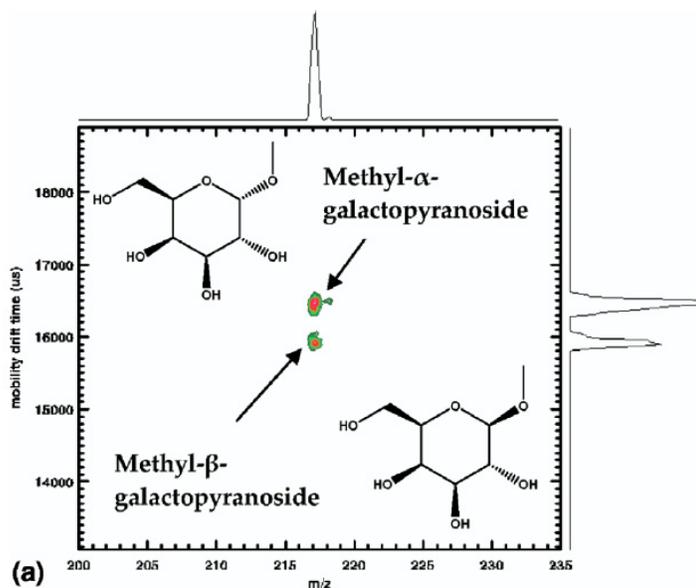


Figura 23. Espectro bidimensional de IM-MS de uma mistura de metil- α e metil- β -D-galactopiranosídeos, mostrando a separação (gás da cela: N_2) de íons dos compostos na forma $[M+Na]^+$ em m/z 217.⁹⁰ Apesar dos dois íons apresentarem a mesma relação m/z (eixo x) eles apresentam diferentes tempos de deslocamento (eixo y), permitindo assim a sua diferenciação.

Outra importante informação que pode ser obtida a partir de experimentos de IM-MS são valores experimentais para a CCS de íons a partir de seu valores de DT. Em instrumentos do tipo DC, o valor de DT de um íon pode ser correlacionado matematicamente com seu valor de CCS (Ω) pela relação:⁹⁴

$$\Omega = \frac{(18\pi)^{1/2}}{16} \times \frac{ze}{(k_B T)^{1/2}} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{m_b} \right)^{1/2} \times \frac{t_D E}{L} \times \frac{760}{P} \times \frac{T}{273.2} \times \frac{1}{N}$$

em que ze é a carga do íon, k_B é a constante de Boltzmann, m a massa do íon, m_B a massa do gás, t_D o tempo de deslocamento, E o campo elétrico aplicado, L o comprimento da cela, P a pressão do gás, T a temperatura do gás e N é a

densidade numérica do gás. Em geral, estes parâmetros podem ser obtidos experimentalmente com erro inferior a 1%.⁹⁴ De posse dos valores experimentais, é possível compará-los com valores correspondentes obtidos teoricamente através de modelagem molecular, calculados para as respectivas estruturas espaciais de baixa energia,⁸⁸ de forma a se associar as medidas experimentais de CCS com diferentes tipos de conformações para os íons em fase gasosa. O programa mais utilizado para o cálculo teórico de CCS a partir de uma ou mais estruturas é o MOBCAL,^{95,96} desenvolvido por Jarrold e Shvartsburg, e disponível livremente.⁹⁷ Essencialmente, MOBCAL calcula valores de CCS por meio três métodos diferentes, em grau crescente de complexidade e demanda computacional: o método da aproximação (PA), o método de espalhamento de esferas rígidas (EHSS) e o método da trajetória (TM). Como exemplos de comparações entre valores de CCS teóricos e experimentais há estudos com *clusters* de carbono,^{83,98} ácidos nucleicos,^{88,99} peptídeos,^{86,100} proteínas¹⁰¹ e complexos de coordenação.¹⁰²

Recentemente, uma nova abordagem para a separação de íons por mobilidade foi desenvolvida, sendo baseada em uma onda móvel de voltagem DC (*Travelling Wave*) incorporada a um guia de íons RF composto por eletrodos anelares empilhados (SRIG)¹⁰³ em posição perpendicular ao caminho dos íons. A eletrodos adjacentes do SRIG são aplicadas voltagens RF defasadas de 90°, formando uma barreira radial de potencial, como descrito na Figura 24.

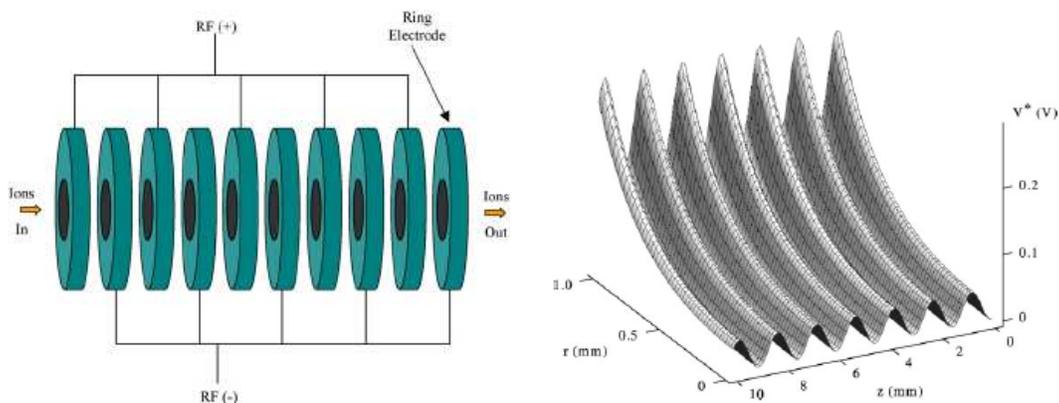


Figura 24. Esquema do guia de íons composto por eletrodos anelares empilhados (SRIG), com gráfico do potencial eletrostático efetivo típico produzido nos eletrodos de um SRIG¹⁰³.

Quando os íons adentram a cela de mobilidade nessas condições, seu movimento axial na cela preenchida pelo gás é retardado ou até cessado pela presença das armadilhas axiais. Então, um pulso transiente de voltagem DC é sobreposto ao potencial RF de um eletrodo, e transferido para os eletrodos seguintes, sequencialmente e em tempos regulares, formando ondas de potencial que carregam os íons através da cela.¹⁰⁴ Tal característica permite a separação por mobilidade iônica, de forma análoga à observada para instrumentos do tipo DC. Esse método, nomeado *Travelling Wave Ion Mobility* (TWIM), foi incorporado ao instrumento SynaptTM HDMSTM, fabricado pela Waters (Manchester, UK), cuja geometria é representada esquematicamente na Figura 25.

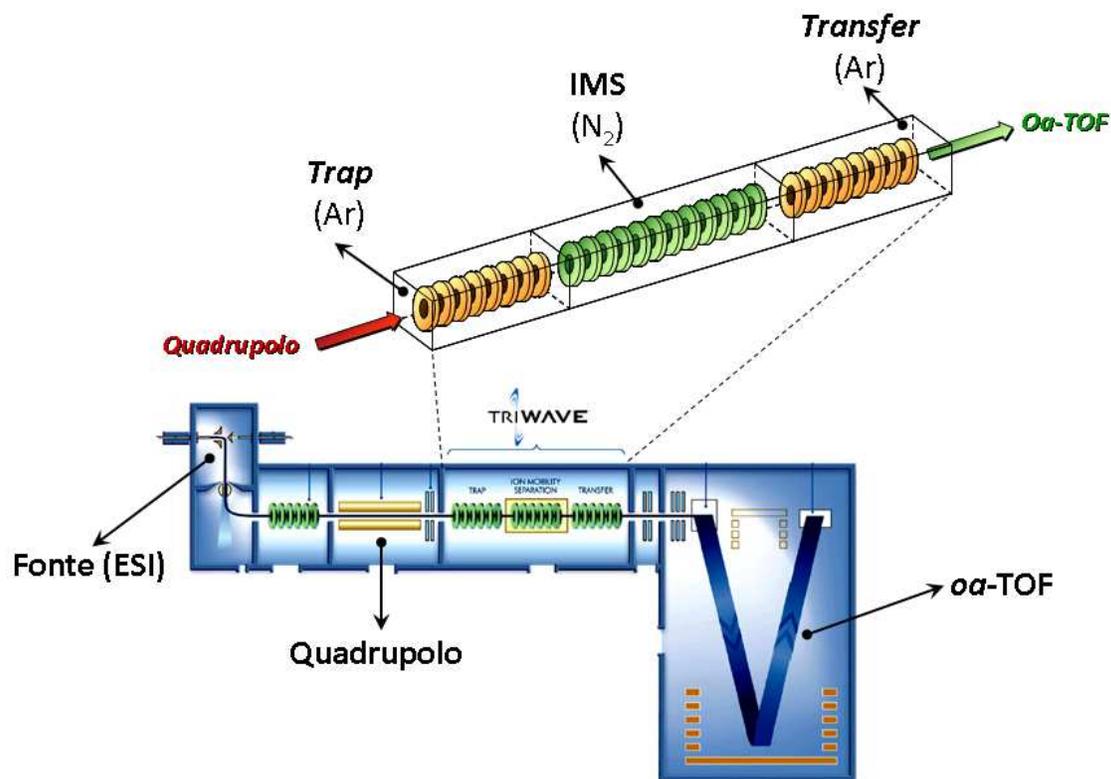


Figura 25. Representação esquemática do instrumento Synapt™ HDMS™ da Waters.¹⁰⁵

O instrumento possui geometria Q-TOF, porém com uma seção de mobilidade iônica adicional entre ambos os analisadores. Esta seção compreende três celas consecutivas (guias de íons do tipo SRIG), sendo que a primeira (*Trap*) tem a função de aprisionar os íons oriundos do quadrupolo e, em intervalos de tempo regulares, injetá-los na segunda cela (*IMS*), cuja finalidade é de separar propriamente os íons por suas mobilidades iônicas. A terceira cela (*Transfer*) é utilizada para guiar apropriadamente os íons até o analisador *Oa-TOF*, mantendo a separação por mobilidade. A configuração adotada para esse instrumento permite a realização de uma variedade de experimentos. Uma vez que as celas *Trap* e *Transfer* operam a pressões de gás praticamente idênticas às de celas de colisão típicas, é possível utilizar ambas para experimentos de fragmentação de íons por CID. É possível realizar separação por mobilidade de íons produzidos pela fragmentação na cela *Trap*, fragmentação na cela *Transfer* de íons precursores separados por mobilidade ou ainda fragmentar íons na cela *Trap*,

separação por mobilidade dos fragmentos, e fragmentar novamente na cela *Transfer*.¹⁰⁴

Pelo fato da cela de mobilidade do tipo TWIM operar de maneira totalmente diferente dos instrumentos com celas DC, a relação entre a CCS e a DT de um íon não é a mesma que a observada em celas DC, e uma relação matemática direta ainda não foi determinada. Dessa maneira, medidas de CCS em instrumentos com celas TWIM são atualmente feitas mediante calibração com íons de CCS conhecida, um método que fornece valores experimentais de CCS em ótima concordância com valores teóricos, sendo também bastante reproduzíveis.¹⁰⁶

Um recente estudo de Giles *et al*,¹⁰⁴ empregando um instrumento Synapt™ HDMS™, demonstra alguns aspectos da capacidade de separação de íons pela técnica de TWIM-MS. Neste trabalho foi possível, por exemplo, distinguir entre os peptídeos isoméricos SDGRG e GRGDS, e estimar experimentalmente a diferença de CCS entre ambos como sendo 5%. Em trabalho de Ruotolo *et al*,¹⁰⁷ a estrutura do complexo protéico formado por oligômeros de *TRAP (trp RNA binding attenuation protein*, de 8 kDa) de 11 subunidades, foi detectada de forma intacta pelo espectrômetro de massas, com confirmação baseada em sua CCS, determinada por parâmetros de mobilidade iônica. Outro estudo de Robinson *et al*¹⁰⁸ permitiu visualizar por mobilidade iônica processos de desenovelamento em fase gasosa de subunidades de um complexo protéico, à medida que íons do mesmo eram submetidos a energias de colisão gradativamente maiores na cela de colisão do instrumento, sendo fragmentado mediante dissociação induzida por colisão (CID) (Figura 26).

Desde então, o número de aplicações da técnica de TWIM-MS vem crescendo muito rapidamente, com vasta gama de aplicações como na análise de isômeros,¹⁰⁹ complexos de metais de transição,¹¹⁰ proteínas¹¹¹⁻¹¹³ e complexos protéicos.¹¹⁴⁻¹¹⁷

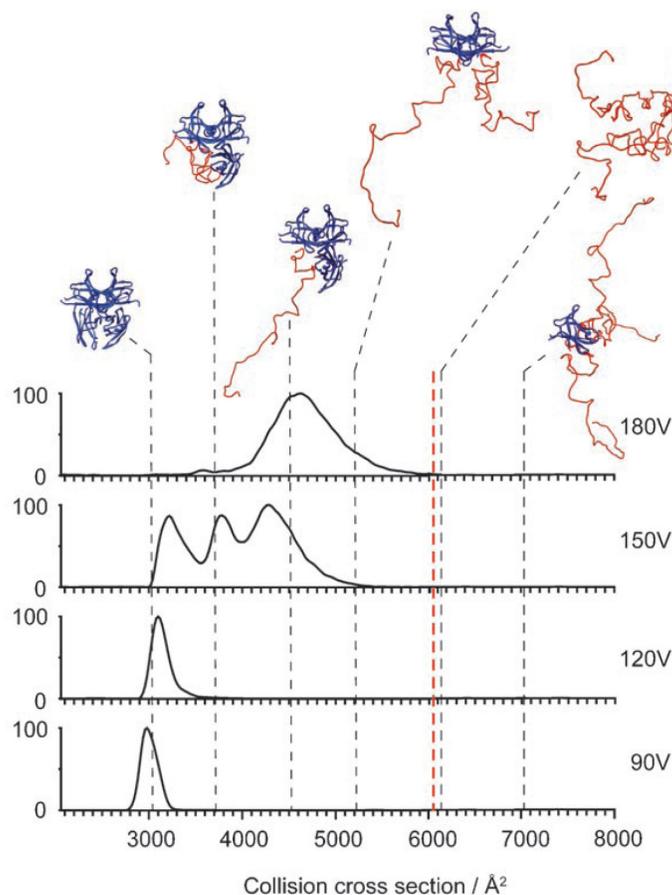


Figura 26. Desmontagem de complexos protéicos em fase gasosa por CID, monitorada por IM-MS.¹⁰⁸ Durante o processo de CID, estima-se que subunidades individuais de um complexo protéico sofram desenovelamento antes de serem ejetadas. De fato, a análise de IM-MS de íons da transtiretina ativada por CID demonstra um aumento na CCS associado com aumento da energia de colisão da cela. Com 90 V de energia, a CCS dos íons corresponde bem com a CCS calculada para a estrutura nativa do complexo. À medida que a energia de colisão aumenta, os valores de CCS passam a corresponder com estruturas hipotéticas de maior grau de desenovelamento e maiores valores de CCS, modeladas teoricamente.

Assim, a técnica de mobilidade iônica do tipo TWIM oferece um novo horizonte no estudo de estrutura e conformação de peptídeos e proteínas por MS. Esse potencial, no entanto, é ainda bastante inexplorado devido à disponibilidade apenas recente de instrumentos comerciais com capacidade de realizar experimentos de TWIM-MS. Essa nova capacidade, aliada aos métodos recentes de estudo estrutural de proteínas, como ligação cruzada, apresentam um enorme potencial para o estudo de estruturas e conformações de biomoléculas.

3.2. Objetivos

A metodologia de ligação cruzada acoplada à MS para obtenção de dados estruturais de proteínas possui diversos exemplos de aplicação na literatura. No entanto, poucos estudos foram feitos visando avaliar o efeito de produtos de ligação cruzada na estrutura da proteína.⁴⁵ Nesse sentido, o objetivo desse capítulo foi utilizar a capacidade para experimentos de mobilidade iônica do tipo TWIM do instrumento Synapt HDMS (Waters) para realizar estudos visando avaliar as mudanças conformacionais, em termos de CCS, de íons de algumas proteínas após reação de ligação cruzada com ALC homobifuncionais do tipo éster de NHS (DSS e DSSeb). Dessa forma, são objetivos específicos desse capítulo:

A) Investigar mudanças conformacionais em termos de variações de valores de CCS de íons de proteínas antes e após modificações de ligação cruzada, tanto em condições nativa quanto desnaturante. Para estimativas quantitativas da variação de CCS, a cela do instrumento foi calibrada com os íons das próprias proteínas não-modificadas, de forma a se permitir medidas de valores de CCS de íons para os quais essa propriedade é desconhecida.

B) Comparar os valores de CCS experimental obtidos com valores teóricos calculados por métodos computacionais para estruturas das mesmas proteínas, determinadas por XRD ou NMR e obtidas do PDB, de forma a avaliar a correspondência entre as conformações observadas em fase gasosa para os íons e as estruturas obtidas em fase sólida ou condensada

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Materiais

Mioglobina equina, citocromo C equino, ubiquitina bovina, DSS e DSSeb foram obtidos da Sigma-Aldrich. A água utilizada foi obtida de um purificador Milli-Q (Millipore). Todos os outros reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich, Merck ou Tedia, sendo usados sem purificação prévia.

3.3.2. Reações de ligação cruzada com DSS e DSSeb

As proteínas foram solubilizadas em 500 μ L de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 para uma concentração de 50 μ M, e foi adicionada solução 10 mg mL⁻¹ de DSS ou DSSeb em DMF, em proporção molar ALC/proteína variável entre 5:1 a 10:1, mantendo-se sempre o volume final de DMF <5%. A proporção ALC/proteína foi ajustada para cada experimento de forma a se obter a quantidade desejada de moléculas de ALC ligadas por molécula de proteína, sendo essa quantidade diretamente proporcional ao excesso de ALC em relação à proteína e o tempo de reação. A mistura foi agitada levemente à temperatura ambiente por 30 min, e então a reação nos grupos éster de NHS foi interrompida por adição de tampão Tris.HCl 1 M pH 7,6 para uma concentração final de 50 mM, seguido de nova agitação a temperatura ambiente por 30 min. A seguir procedeu-se à purificação de acordo com a condição desejada de análise.

Para condição nativa, as amostras foram filtradas por centrifugação em filtros Microcon YM-10 (Millipore), com peso molecular de corte (MWCO) de 10 kDa, trocando-se o tampão para NH₄OAc 100 mM pH 7,0. Para tal, os filtros foram inicialmente lavados com duas centrifugações de 500 μ L de H₂O, seguido de carregamento da amostra e três filtrações sucessivas por centrifugação a 12,000 x g, sempre diluindo-se o sobrenadante restante a 500 μ L com tampão NH₄OAc 100 mM pH 7,0 antes de cada centrifugação. Após a última filtração, o sobrenadante (~50 μ L) foi diluído a 250 μ L (~80 a 100 μ M de proteína) com tampão NH₄OAc 100 mM pH 7,0, recolhido e submetido à análise por ESI(+)-TWIM-MS.

Para condição desnaturante, as amostras foram submetidas a

dessalinização/filtração em cartuchos de SPE Oasis HLB (Waters). As amostras em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 (500 μ L) foram carregadas nos cartuchos, dessalinizadas com 1 mL de H₂O (0,1% de ácido fórmico) e eluídas em 1 mL de MeCN (0,1% ácido fórmico), sendo então diluídas a 2 mL com H₂O (0,1% ácido fórmico), para uma concentração aproximada de ~20 a 25 μ M de proteína. As soluções resultantes foram submetidas diretamente à análise por ESI(+)-TWIM-MS.

A condição desnaturante empregada (H₂O/MeCN 1:1, 0,1% ácido fórmico) representa uma condição ótima para ionização por ESI. No entanto, observa-se ionização apreciável da proteína injetando-se uma solução da mesma em tampão volátil, com valores de pH próximos ao neutro, como por exemplo tampão NH₄OAc em pH 7,0. Dessa maneira, é possível manter interações intramoleculares (e intermoleculares, no caso de complexos protéicos) na transferência do íon da proteína em solução para a fase gasosa, de forma que a estrutura correspondente ao estado nativo em solução é mantida, ao menos parcialmente, na fase gasosa. A preservação do estado nativo nesse processo permite, por exemplo, determinar o estado multimérico de complexos protéicos, como demonstrado em vários estudos de Heck *et al.*^{114,118,119,120}

3.3.3. Análise por TWIM-MS

As análises de proteínas por ESI(+)-TWIM-MS foram feitas por infusão direta na fonte de ESI de um instrumento Waters Synapt HDMS. Dentre os parâmetros instrumentais fixos empregados estão: fluxo do capilar 10 μ L min⁻¹, fluxo de gás de dessolvatação 900 L H⁻¹, fluxo de gás do cone 30 L h⁻¹, temperatura da fonte 100°C, temperatura de dessolvatação 200°C, fluxo do gás de colisão (argônio) 1,5 mL min⁻¹ (pressão das celas Trap e Transfer 0,05 mbar) e fluxo do gás da cela de IMS (N₂) 32 mL min⁻¹ (pressão das cela IMS 0,70 mbar). É conhecido que maiores valores de pressão do gás de mobilidade resultam em maior resolução para separação dos íons por IM, porém nesse caso o aumento da pressão de gás teve um efeito negativo na sensibilidade, sem ganho apreciável em resolução, tendo-se

optado por manter então a pressão de gás de IMS em 0,70 mbar como um compromisso entre sensibilidade e resolução. Em análises de soluções em tampão NH₄OAc, para se garantir ausência de ácidos ou outros compostos residuais que pudessem interferir na estrutura das proteínas em meio tamponado, a seringa de vidro, a linha de PEEK e a sonda da fonte de ESI foram lavadas extensivamente com água Milli-Q pura, seguida do próprio tampão NH₄OAc 100 mM PH 7,0 antes de cada análise.

O instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico entre *m/z* 100 e 2000, obtendo-se o espectro a partir de infusão direta de uma solução de H₃PO₄ 0,05% em H₂O/MeCN 1:1. Os parâmetros de separação por mobilidade iônica do tipo TWIM (pressão de gás, altura e velocidade da onda móvel de potencial) foram mantidos constantes entre experimentos a serem comparados, sendo otimizados para cada análise (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros instrumentais otimizados para análise de proteínas não-modificadas em condições nativa e desnaturante por ESI-TWIM-MS.

Proteína	Capilar (kV)	Cone (V)	Trap (V)	Voltagens		WV ^b (m s ⁻¹)
				Transfer (V)	WH ^a (V)	
Mioglobina (Nativa)	2	20	10	10	9 – 12 (Rampa)	350
Mioglobina (Desnaturante)	3	10	6	4	9 – 12 (Rampa)	300
Citocromo C (Nativo)	2	20	10	10	9 – 12 (Rampa)	350
Citocromo C (Desnaturante)	3	10	6	4	9 – 12 (Rampa)	300
Ubiquitina (Nativa)	3	10	6	4	9 – 12 (Rampa)	300
Ubiquitina (Desnaturante)	3	10	6	4	9 – 12 (Rampa)	300

^aWave Height (Altura da onda). ^bWave Velocity (Velocidade da onda)

Para cada condição (proteína não-modificada ou após reação com ALC, condição nativa ou desnaturante) foram adquiridos cromatogramas do tipo ATD, permitindo a visualização dos valores de DT dos íons respectivos a cada estado de carga das proteínas. Antes da extração dos valores de DT para cada pico, os cromatogramas ATD foram levemente suavizados (Smooth), tomando-se o valor referente ao centro de cada pico. Os dados espectrais de proteínas não-

modificadas ou após reação com ALC foram processados utilizando-se o algoritmo de deconvolução MaxEnt1, fornecido pelo software do instrumento (MassLynx v4.1). Os dados de mobilidade iônica foram visualizados pelo próprio MassLynx.

3.3.4. Cálculos de valores de CCS teóricos

Valores de CCS teórica foram estimados computacionalmente pelo uso de dois programas, sendo o um deles (CCSCalc) disponível juntamente com a ferramenta de visualização de dados de mobilidade iônica *DriftScope* v.2.1. do software MassLynx v.4.1., e o outro (MOBCAL)^{95,96} disponível livremente⁹⁷ na forma de código em Fortran. Como descrito no item 3.1., MOBCAL estima valores de CCS empregando três métodos diferentes, com graus de complexidade crescentes: o método da projeção (PA), o método do espalhamento de esferas rígidas (EHSS) e o método da trajetória (TM). O CCSCalc faz uso de uma versão modificada do método PA, aprimorada com base em ajustes empíricos de forma a produzir valores de CCS mais próximos daqueles observados experimentalmente. Todos os cálculos foram feitos em um Intel Core2Quad Q9550 (2833 MHz) com 4096 MB SDRAM DDR2, operando com Windows XP 64-bit SP2 (CCSCalc) ou Ubuntu v.9.04. 64-bit (MOBCAL). Para o CCSCalc foram usados como arquivos de entrada estruturas obtidas diretamente do PDB,⁴⁴ utilizando-se o parâmetro “CCS Tolerance” em 0,1%. Os cálculos assim feitos levaram entre 1 e 5 minutos cada.

O código disponível para o MOBCAL foi ajustado de forma a considerar como gás da cela de mobilidade o nitrogênio (N₂) ao invés do padrão hélio (He), substituindo-se os valores de massa e polarizabilidade do gás por valores apropriados para N₂, e compilado dessa maneira. Os arquivos de entrada para o MOBCAL consistem nos tipos de átomos e suas coordenadas no sistema, bem como a distribuição de cargas para ser utilizada pelo método TM (que leva em conta interações eletrostáticas entre a molécula/ion em questão e o gás de mobilidade). Para a obtenção das distribuições de cargas, foi utilizada a ferramenta *psfgen* do VMD – Visual Molecular Dynamics,¹²¹ também disponível livremente.¹²² Os cálculos assim feitos levaram entre 240 e 300 minutos cada.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Calibração da cela de TWIM para cálculos de CCS

O procedimento utilizado para calibrar o instrumento Synapt HDMS de forma a permitir medidas de CCS foi fornecido em comunicações pessoais com especialistas de aplicações da empresa (Waters), e consiste na seguinte sequência de etapas:

1) Adquirir um espectro de ESI-TWIM-MS para uma proteína em condição desnaturante (como H₂O/MeCN 1:1 com 0,1% ácido fórmico), em uma determinada condição de mobilidade.

2) Traçar cromatogramas ATD extraídos para os principais sinais (estados de carga) observados para a proteína e registrar os respectivos valores de DT em milissegundos.

3) Tratar matematicamente os valores de DT obtidos e utilizar valores de CCS disponíveis na literatura (Ω)¹²³ para obter uma curva de CCS aparente do instrumento (Ω') por tempo de deslocamento corrigido (DT').

4) Medir o valor de DT de um íon de CCS desconhecida nas mesmas condições de mobilidade utilizadas na calibração, e a partir da curva de calibração, obter um valor de Ω para o íon em questão.

Os valores de DT observados no espectro de calibração foram corrigidos de forma a considerar o intervalo de tempo necessário para que os íons percorram o trajeto entre a saída da cela IMS e o detector MCP após o analisador Oa-TOF. Essa correção é dada por:

$$DT' = [DT - 1,57 (m/z)^{1/2}] / 1000$$

em que DT é o tempo de deslocamento observado no ATD e 1,57 é uma constante instrumental. A seguir, foram utilizados valores de CCS medidos em instrumento do tipo DC para as proteínas em questão, disponíveis na página do grupo de pesquisas do Prof. David E. Clemmer,¹²³ para se calcular valores normalizados de seção de colisão (Ω'), corrigida para a massa reduzida e o estado

de carga de cada íon. Tal normalização foi feita pela relação:

$$\Omega' = \Omega (M_{\text{RED}} / z)$$

em que Ω é o valor de CCS da literatura, z é o estado de carga absoluto do íon e M_{RED} é a massa reduzida do par íon-gás de mobilidade, dada por:

$$M_{\text{RED}} = [(m_{\text{íon}} \times m_{\text{gás}}) / (m_{\text{íon}} + m_{\text{gás}})]^{1/2}$$

Uma vez obtidos os valores de DT' e Ω' , traça-se um gráfico e é feito um ajuste exponencial, que fornece a equação da curva de calibração. Por fim, o valor de DT medido para o íon de CCS desconhecida é transformado em DT' e substituído na equação da curva para se obter um valor de Ω' que, por sua vez, é convertido de volta em Ω (CCS).

Foram feitas curvas de calibração para mioglobina e citocromo C, em condições variáveis de acordo com as condições ótimas de mobilidade empregadas nas análises em que se desejava obter a CCS de íons desconhecidos, como para mioglobina e citocromo C após reações com DSS e DSSeb. Tais curvas de calibração permitem estimar a CCS de íons de interesse a partir de seus tempos de chegada corrigidos, contanto que tais tempos de chegada estejam dentro da faixa de tempos de chegada dos íons utilizados para a calibração, independentemente da faixa de valores de CCS a que correspondem esses íons.¹¹² Para mioglobina, foram usados na curva os valores de CCS referentes aos estados de carga +9 a +22. Para os íons em estados de carga +9 e +10, mais de um valor de CCS é descrito em cada estado de carga, possivelmente devido a diferentes conformações desses íons em fase gasosa; nesses casos, foram utilizados os valores que melhor se encaixavam no ajuste exponencial obtido. O mesmo foi feito para citocromo C, para o qual foram escolhidos os íons respectivos aos estados de carga +5 a +20, dos quais +5 até +10 exibem mais de um valor de CCS. Uma curva de calibração Ω' versus DT' típica foi disposta na

Figura 27 a seguir.

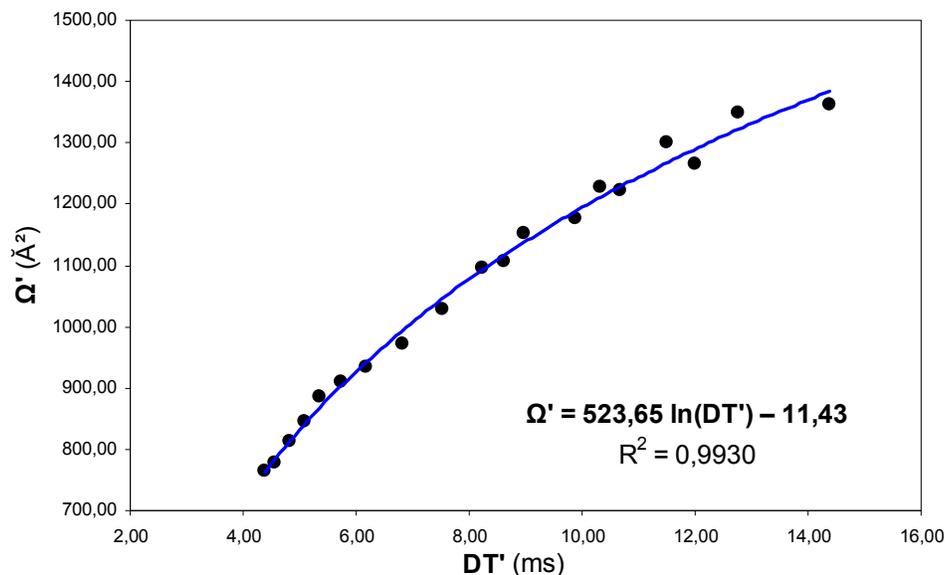


Figura 27. Curva de calibração Ω' versus DT' para citocromo C. Condições de TWIM-MS: rampa de altura da onda 9 – 12 V, velocidade da onda 350 m s⁻¹.

Para verificar a validade das curvas de calibração obtidas, foram adquiridos espectros de mioglobina nas condições de mobilidade empregadas para calibração com citocromo C e vice-versa. Os tempos de chegada medidos para alguns estados de carga de uma proteína foram então corrigidos e substituídos nas curvas de calibração feitas com íons de outra proteína, e calculou-se a respectiva CCS obtida pela curva, comparando-a com o valor teórico disponível na literatura.¹²³ Uma vez que há valores de CCS na literatura para ubiquitina bovina, o experimento foi feito também com essa proteína (nas mesmas condições das respectivas curvas de calibração), sendo os dados substituídos nas curvas de mioglobina e citocromo C, de forma a complementar a validação. Os resultados assim obtidos foram agrupados na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Valores de CCS obtidos experimentalmente para alguns íons de proteínas não-modificadas em condição desnaturante, usando-se curvas de calibração feitas com mioglobina e citocromo C.

Proteína	Curva de Calibração	Estado de Carga	CCS Calc. (Å ²)	CCS Lit. ¹²³ (Å ²)	Diferença (%)	Média (%)
Mioglobina	Citocromo C (WH ^a 9-12 V) (WV ^b 350 m s ⁻¹)	22	3826	3815	+0,28	0,9
		20	3678	3682	-0,12	
		18	3473	3489	-0,46	
		16	3290	3313	-0,69	
		14	3119	3143	-0,76	
Citocromo C	Mioglobina (WH ^a 9-12 V) (WV ^b 350 m s ⁻¹)	12	2948	3044	-3,16	2,1
		20	2758	2889	-2,96	
		18	2753	2766	-0,48	
		16	2690	2679	-1,72	
		14	2536	2473	+1,67	
Ubiquitina	Mioglobina (WH ^a 9-12 V) (WV ^b 350 m s ⁻¹)	12	2414	2335	+2,70	2,2
		10	2297	2226	+3,19	
		11	1714	1802	-3,04	
		10	1654	1732	-2,91	
		9	1624	1649	-0,18	
Ubiquitina	Citocromo C (WH ^a 9-12 V) (WV ^b 350 m s ⁻¹)	8	1572	1622	-2,17	1,1
		7	1530	1580	-2,36	
		6	1241	1220	+2,62	
		11	1771	1802	-1,74	
		10	1694	1732	-2,22	
		9	1644	1649	-0,33	
		8	1572	1622	-3,09	
		7	1514	1580	-4,16	
		6	1235	1220	+1,20	

^aWave Height (Altura da onda). ^bWave Velocity (Velocidade da onda)

Como pode ser observado pela tabela, as curvas de calibração obtidas forneceram valores de CCS calculados em ótima concordância com os valores da literatura, com diferenças percentuais médias inferiores a 5%. De posse das curvas de calibração, foi possível estimar diferenças percentuais entre CCS para íons de todas as proteínas antes e após reação de ligação cruzada, sempre comparando-se entre mesmos estados de carga. Utilizando essas estimativas de diferenças, foram feitos dois tipos de comparações: proteínas antes e após reação com ALC em condição desnaturante ou nativa.

3.4.2. Comparações de CCS para condição desnaturante

Para comparações em condição desnaturante ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 1:1 com 0,1% ácido fórmico), o intuito foi avaliar se a adição de uma ou mais moléculas do ALC na forma de ligação cruzada intramolecular (XL, Figura 28) ocasionaria uma maior rigidez da estrutura da proteína em uma conformação mais compacta, de forma que os valores de CCS observados para íons das proteínas após reação com os ALC fossem menores que aqueles observados para as proteínas não-modificadas, com estrutura majoritariamente desenovelada. Nesse caso, os tipos de produtos de ligação cruzada de interesse foram aqueles com ligações cruzadas intramoleculares (XL, Figura 28), em que ambos os grupos funcionais do ALC se ligaram à cadeia da proteína.

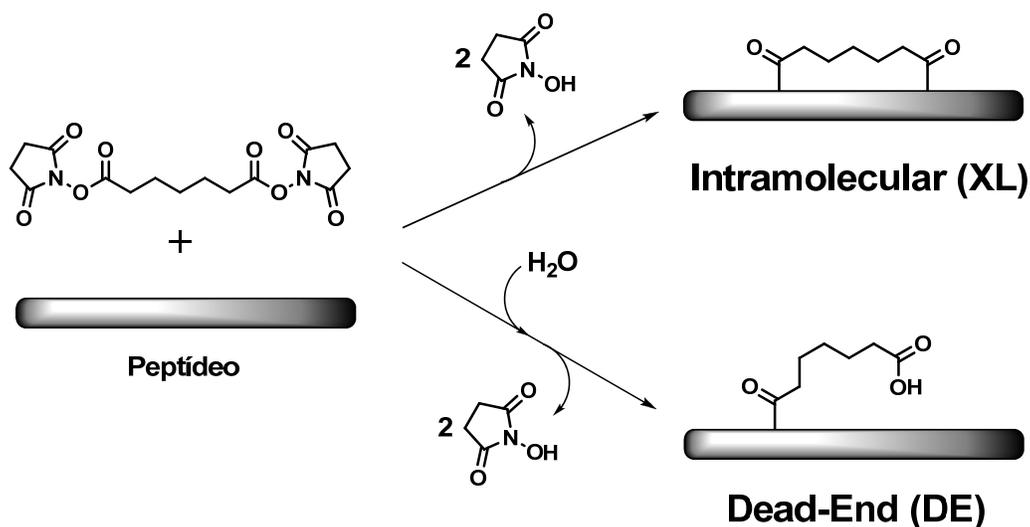


Figura 28. Esquema representando os possíveis produtos da reação de uma proteína ou peptídeo com um ALC homobifuncional, do tipo éster de NHS. O produto *dead-end* (DE) é formado quando um dos grupos éster de NHS é hidrolisado, antes ou após o outro se ligar a um resíduo de aminoácido. O produto intramolecular (XL) é formado quando ambos os grupos éster de NHS se ligam a resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica.

Os cromatogramas ATD das Figura 29, 30 e 31 a seguir exibem resultados representativos desse tipo de comparação para alguns estados de carga, respectivamente para mioglobina, citocromo C e ubiquitina.

Mioglobina

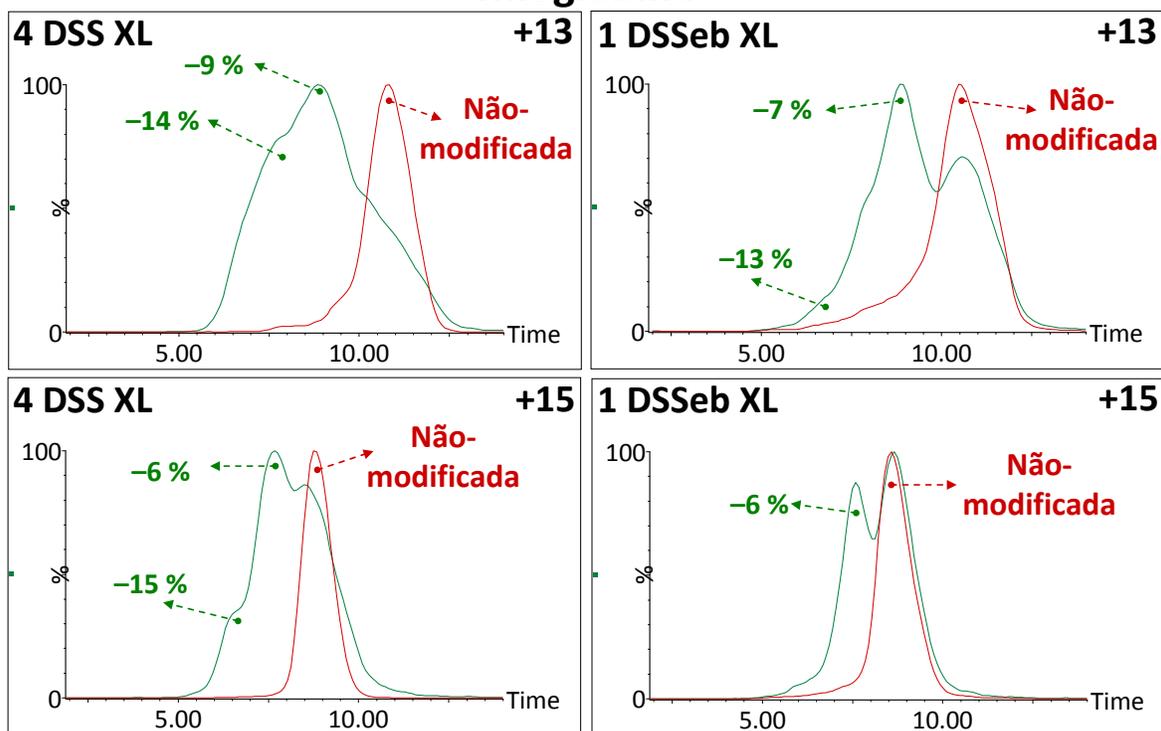


Figura 29. Cromatogramas ATD extraídos e sobrepostos para experimentos de TWIM-MS com mioglobina em condições desnaturantes. **Cima:** estado de carga +13, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. **Baixo:** estado de carga +15, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. Linhas tracejadas indicam as diminuições percentuais nos valores de CCS para os picos observados no ATD após a reação com ALC, em comparação com o valor de CCS do íon da proteína não-modificada.

É razoável supor que, para um íon de uma proteína que tenha sido transferido para a fase gasosa pelo processo de ESI, a quantidade de cargas e a posição das mesmas ao longo da sequência passem a ter um efeito muito maior na sua estrutura em fase gasosa do que tinham em solução, uma vez que as interações eletrostáticas são intensificadas na ausência de solvente. Considerando que íons de proteínas formados a partir de uma solução em condições desnaturantes possuem estados de carga mais altos (em virtude da estrutura desenovelada, com sítios de protonação mais expostos ao solvente), era esperado que a estrutura em fase gasosa exibisse tendência a uma conformação expandida para minimizar a repulsão entre as cargas positivas, e que as ligações cruzadas forçassem a estrutura para conformações mais compactas em virtude das ligações covalentes, mesmo que isso acarrete maior repulsão eletrostática

Citocromo C

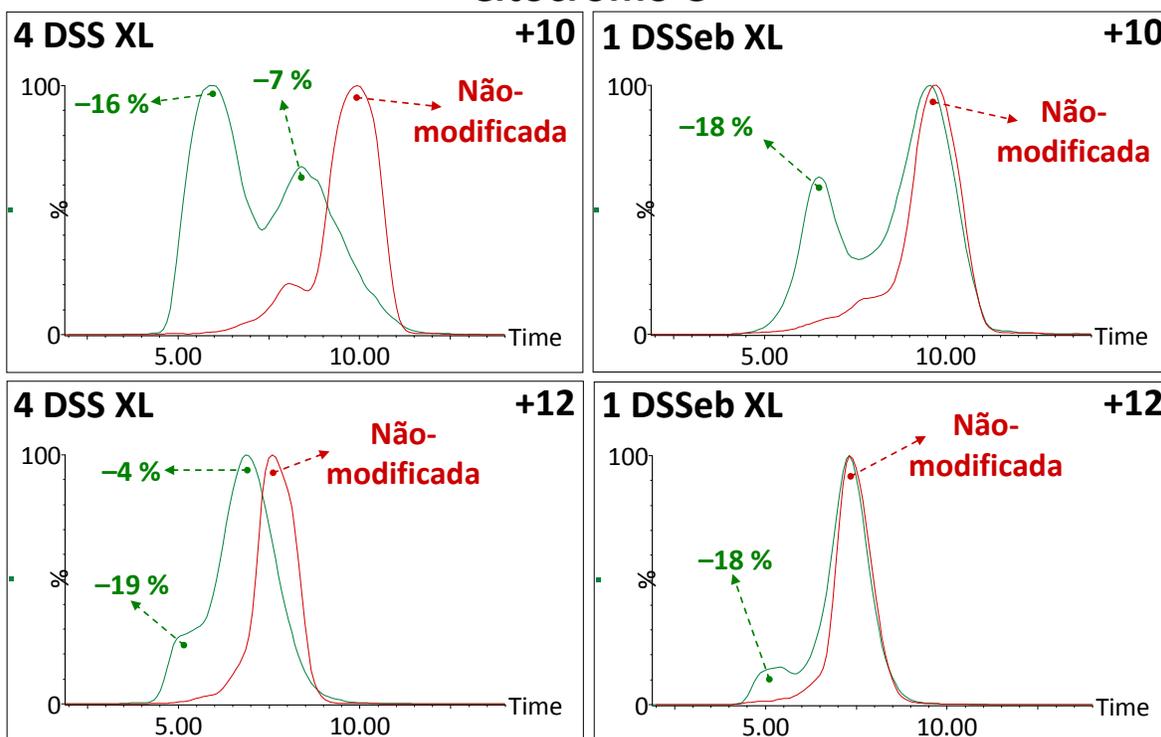


Figura 30. Cromatogramas ATD extraídos e sobrepostos para experimentos de TWIM-MS com citocromo C em condições desnaturantes. **Cima:** estado de carga +10, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. **Baixo:** estado de carga +12, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. Linhas tracejadas indicam as diminuições percentuais nos valores de CCS para os picos observados no ATD após a reação com ALC, em comparação com o valor de CCS do íon da proteína não-modificada.

pela então proximidade de determinadas partes da estrutura. Também é interessante notar que a ligação de uma molécula de ALC por ambos os grupos reativos na forma de XL elimina dois sítios básicos e passíveis de protonação na estrutura da proteína, ao converter grupos amina dos resíduos de lisina para grupos amida com a cadeia do ALC.

A análise dos dados confirma a hipótese acima descrita, de forma que após a reação de ligação cruzada são observadas conformações mais compactas em comparação com a proteína não-modificada e desnaturada. Uma vez que em vários casos é possível observar mais de uma conformação após a reação com ALC (Figuras 29, 30 e 31), é possível estimar que a reação de DSS ou DSSeb com as proteínas resultando em produtos do tipo XL ocorra em dois tipos de sítios:

Ubiquitina

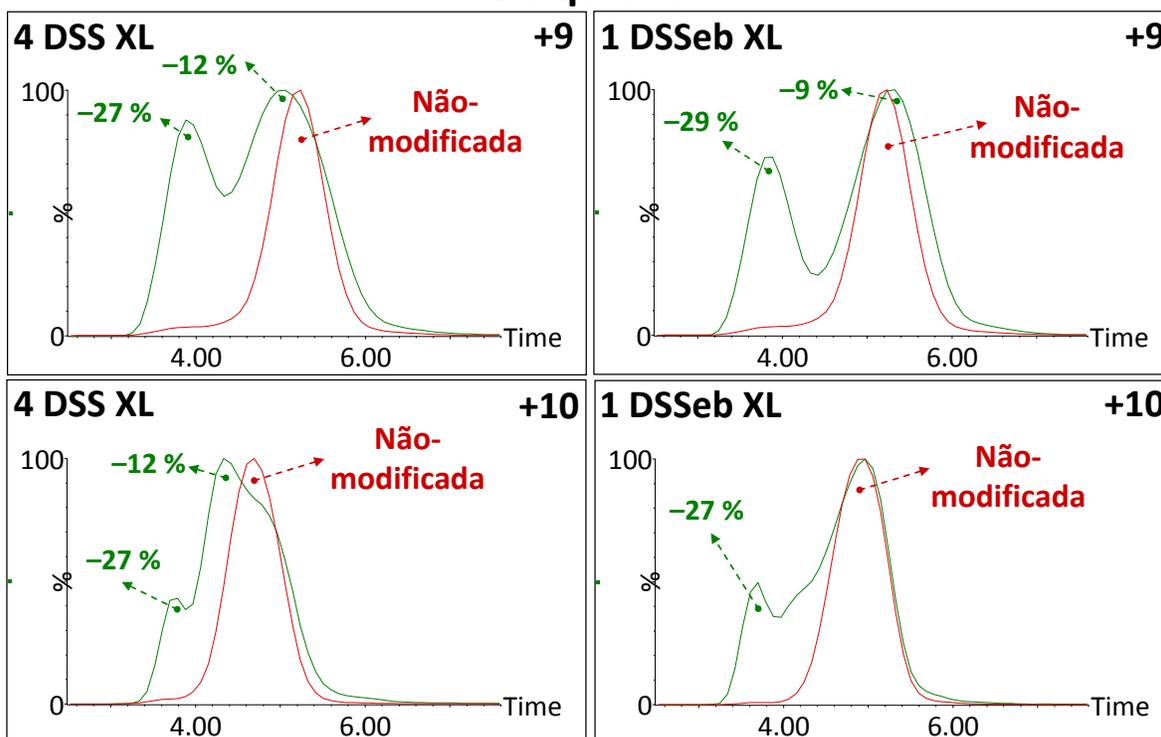


Figura 31. Cromatogramas ATD extraídos e sobrepostos para experimentos de TWIM-MS com ubiquitina em condições desnaturantes. **Cima:** estado de carga +9, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. **Baixo:** estado de carga +10, não-modificada ou após ligação de 4 moléculas de DSS (esquerda) ou 1 molécula de DSSeb (direita) na forma de XL. Linhas tracejadas indicam as diminuições percentuais nos valores de CCS para os picos observados no ATD após a reação com ALC, em comparação com o valor de CCS do íon da proteína não-modificada.

a) aqueles que provoquem pouca rigidez estrutural, como por exemplo ao ligar resíduos de aminoácido adjacentes em termos de sequência primária; e b) aqueles que provoquem considerável rigidez estrutural, como ao ligar resíduos de aminoácido afastados em termos de sequência primária, porém próximos espacialmente o suficiente para que o ALC consiga se ligar à ambos, criando uma nova restrição covalente entre cadeias da proteína. Em mioglobina e citocromo C, o primeiro tipo de produto pode ocorrer, por exemplo, entre pares e trios de lisinas imediatamente adjacentes em termos de sequência primária, destacadas nas seqüências das proteínas a seguir (ou ainda em lisinas próximas na seqüência primária, porém não necessariamente adjacentes, como também é o caso da ubiquitina):

Mioglobina

GLSDGEWQQVLNVWGKVEADIAGHGQEVLRIRLFTGHPETLEKFDKFKHLK
TEAEMKASEDLKKHGTVVLTALGGILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPI
KYLEFISDAIIHVLHSHKHPGDFGADAQGAMTKALELFRNDIAAKYKELGFQG

Citocromo C

GDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTGQAPGFTYT
DANKNKGITWKEETLMEYLENPKKYIPGTMIFAGIKKKTEREDLIAYLKKA
TNE

Ubiquitina

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDG
RTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGG

Sabendo que todos os produtos de XL formados estão presentes na mistura reacional simultaneamente, é possível afirmar que o perfil observado nos cromatogramas ATD após reação com ALC corresponde a uma soma das conformações respectivas a todos os produtos de XL presentes. Assim, é razoável supor que os picos observados nos cromatogramas ATD que mais se diferem percentualmente daqueles da proteína não-modificada devam corresponder aos produtos em que houve maior compactação estrutural (resultando em menores valores de CCS e DT), de forma que para esses produtos a condição desnaturante empregada não provocou um aumento considerável nos valores de CCS em função do suposto desenovelamento da proteína. De forma complementar, os picos para os quais houve pouca diferença percentual possivelmente correspondem àqueles em que os produtos de XL provocaram pouca compactação estrutural, por exemplo ao unir resíduos de aminoácidos próximos em sequência primária. De maneira geral, foram observados sinais de ATD indicando conformações mais compactas para vários estados de carga de mioglobina, citocromo C e ubiquitina, após reação com DSS ou DSSeb, em condições desnaturantes.

3.4.3. Comparações de CCS para condição nativa

O segundo tipo de comparação foi feito entre proteínas em condição nativa antes e após reação com ALC. Nesse caso, o intuito foi de avaliar se ocorre alteração das conformações de íons das proteínas em condição nativa, em termos de variação de CCS antes e após ligação de uma ou mais moléculas de DSS ou DSSeb. Os cromatogramas ATD da Figura 32 a seguir exibem um resultado representativo desse tipo de comparação para íons do estado de carga +8 de citocromo C.

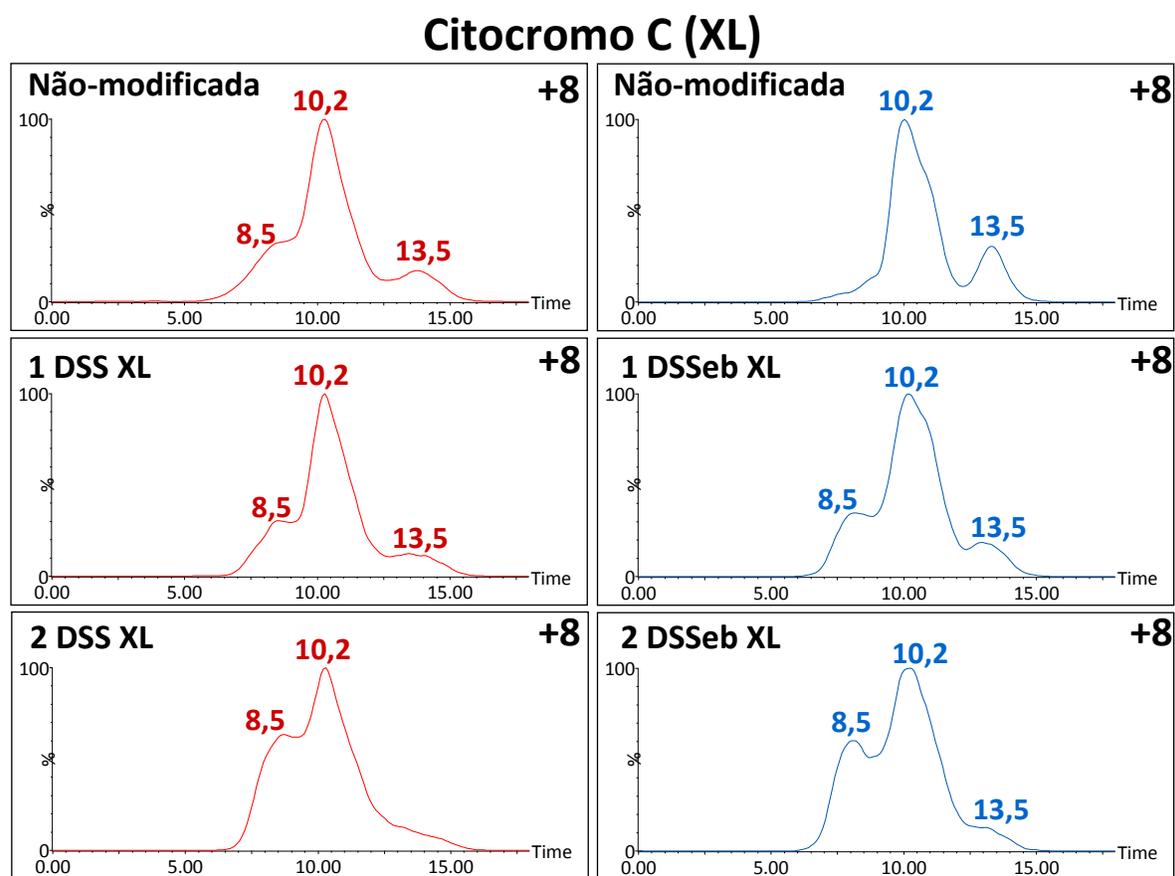


Figura 32. Cromatogramas ATD extraídos para experimentos de TWIM-MS com citocromo C em condição nativa. Íons do estado de carga +8, com a proteína não-modificada (topo) ou após ligação de 1 (meio) ou 2 (inferior) moléculas de DSS (coluna da esquerda) ou DSSeb (coluna da direita) na forma de XL (intramolecular).

Os cromatogramas ATD (Figura 32) para a proteína não-modificada indicam a predominância de duas conformações representadas pelos picos com

tempos de chegada de 10 e 13 ms. A presença de um pico pouco intenso em torno de 8 ms representa uma conformação mais compacta e de maior mobilidade, que é pouco amostrada pelos íons da proteína, embora presente em fase gasosa. A ligação de uma ou mais moléculas de ALC na forma de XL favorece a população dessa conformação mais compacta (8 ms), aumentando sua intensidade no cromatograma com simultânea diminuição de população da conformação em torno de 13 ms. Uma explicação para essa observação pode ser racionalizada considerando-se o efeito de restrição de sítios de carga já discutida, em que a ligação de uma molécula de ALC a dois resíduos de lisina elimina dois possíveis sítios de carga (aminas primárias) pela formação de dois grupos amida. No caso de proteínas em condição nativa, o estado de carga dos íons é consideravelmente menor quando comparado com a condição desnaturante. Além disso, tanto a distribuição quanto a população relativa de estados de carga observada não varia entre íons da proteína não-modificada e da proteína após reação com ALC. Tendo em vista essas informações, é possível estimar que a eliminação de dois sítios de carga espacialmente próximos mediante a ligação de uma molécula de ALC na forma de XL diminua a repulsão eletrostática que os mesmos sítios teriam na ausência do ALC caso ambos estivessem protonados, de tal maneira a possibilitar que o íon da proteína em fase gasosa se organize em conformações mais compactas, como aquela em 8 ms na Figura 32. Essa hipótese é corroborada quando se compara cromatogramas do tipo ATD obtidos para um produto de ligação do ALC por apenas um dos grupos reativos (*dead-end* ou DE, Figura 28), como demonstrado na Figura 33 a seguir.

Citocromo C (DE)

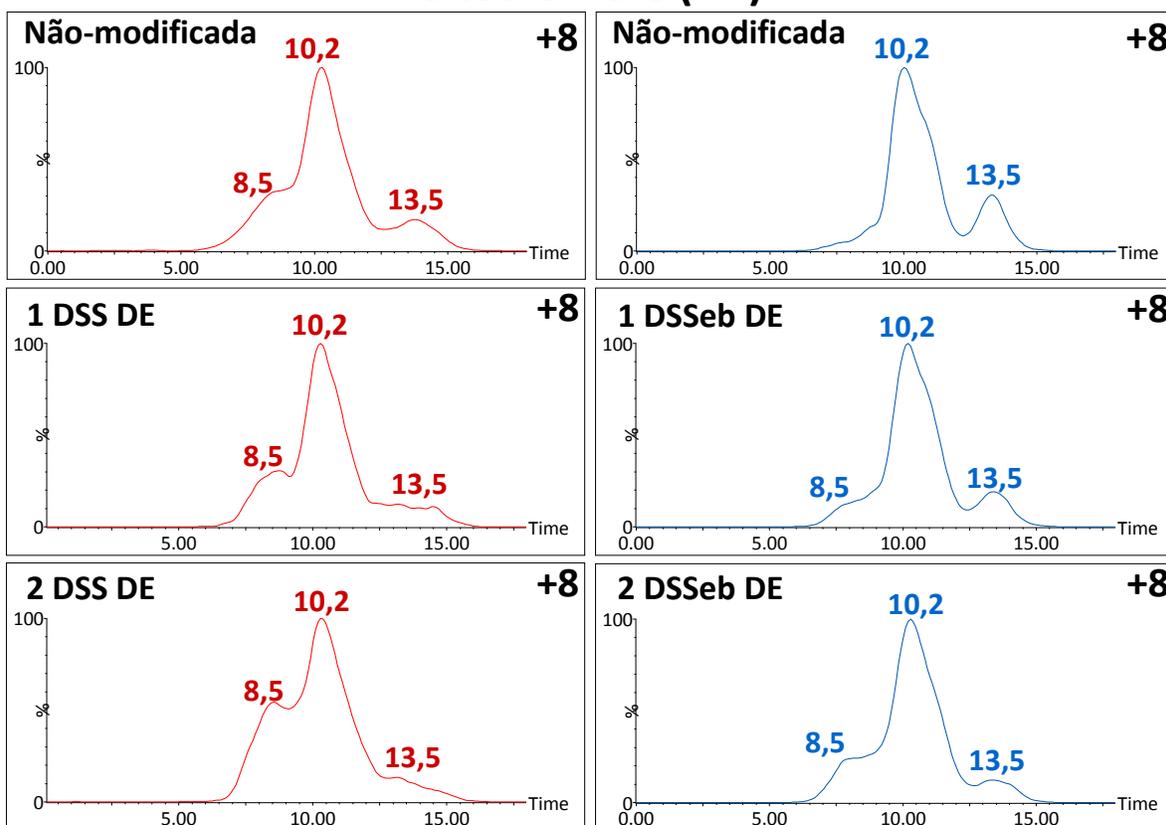


Figura 33. Cromatogramas ATD extraídos para experimentos de TWIM-MS com citocromo C em condição nativa. Íons do estado de carga +8, com a proteína não-modificada (topo) ou após ligação de 1 (meio) ou 2 (inferior) moléculas de DSS (coluna da esquerda) ou DSSeb (coluna da direita) na forma de DE (*dead-end*).

O que se observa no caso de produtos com ligação de um ou mais ALC na forma de DE é também a presença de conformações mais compactas, de forma similar à observada para produtos do tipo XL, porém de forma atenuada, com diminuição e aumento mais modestos das conformações ao redor de 13 e 8 ms, respectivamente. Isso é esperado, considerando-se que a ligação de um ALC na forma de DE elimina apenas um sítio de carga, enquanto que a ligação na forma de XL elimina dois sítios necessariamente próximos espacialmente, gerando relativamente menor repulsão eletrostática. Essas observações são muito interessantes, pois estes fatos poderiam, em princípio, ser racionalizados como sendo devido à ligação do ALC na forma de XL fixar a estrutura da proteína em conformações mais compactas pela restrição de sua dinâmica em fase gasosa em virtude das novas ligações covalentes formadas, de forma a direcionar

consideravelmente a conformação do íon em fase gasosa. Embora é razoável considerar que também esteja ocorrendo esse tipo de efeito de restrição, é fácil constatar que a quantidade e a posição das cargas dos íons possuem um efeito mais predominante na conformação adotada pelos íons de proteínas na fase gasosa, conforme demonstra a análise de íons das proteínas contendo moléculas de ALC na forma de DE.

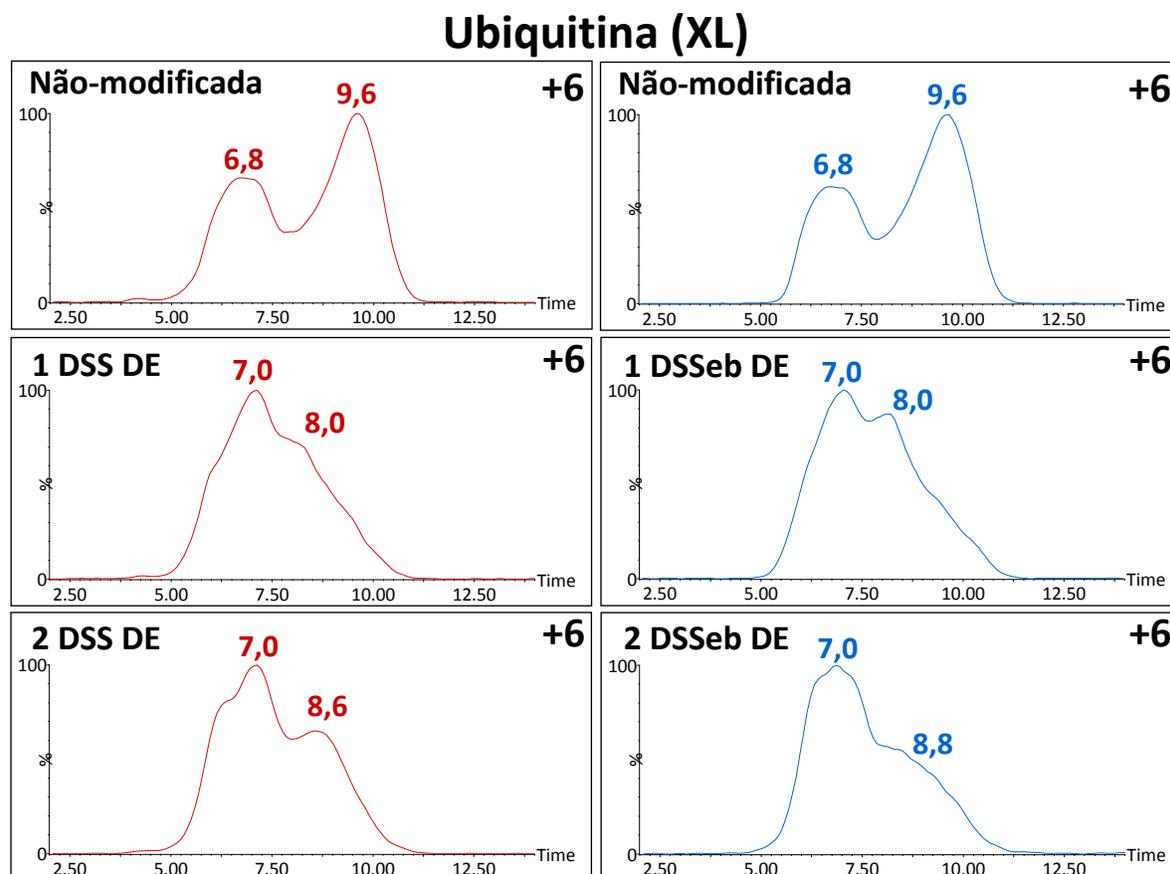


Figura 34. Cromatogramas ATD extraídos para experimentos de TWIM-MS com ubiquitina em condição nativa. Íons do estado de carga +6, com a proteína não-modificada (topo) ou após ligação de 1 (meio) ou 2 (inferior) moléculas de DSS (coluna da esquerda) ou DSSeb (coluna da direita) na forma de XL (intramolecular).

Para íons do estado de carga +6 de ubiquitina (Figuras 34 e 35), foram obtidos resultados bastante similares àqueles para citocromo C, sendo possível estender as observações anteriores para esse caso. Para a proteína não-modificada são observadas duas conformações em 6,8 e 9,6 ms, sendo a segunda de maior população. A ligação de moléculas de DSS ou DSSeb na forma de XL (Figura 34) diminui a população da conformação em 9,6 ms com

concomitante aumento da população da conformação em 6,8 ms. O mesmo resultado é observado para produtos do tipo DE (Figura 35) mas, novamente, de forma atenuada. Em alguns casos (Figura 34, após adição de 2 moléculas de DSS ou DSSeb na forma de DE) é possível observar que o pico em ~7,0 ms corresponde a duas conformações não-resolvidas, cuja população aumenta ao se passar de uma para duas molécula de ALC ligadas na forma de DE.

Ubiquitina (DE)

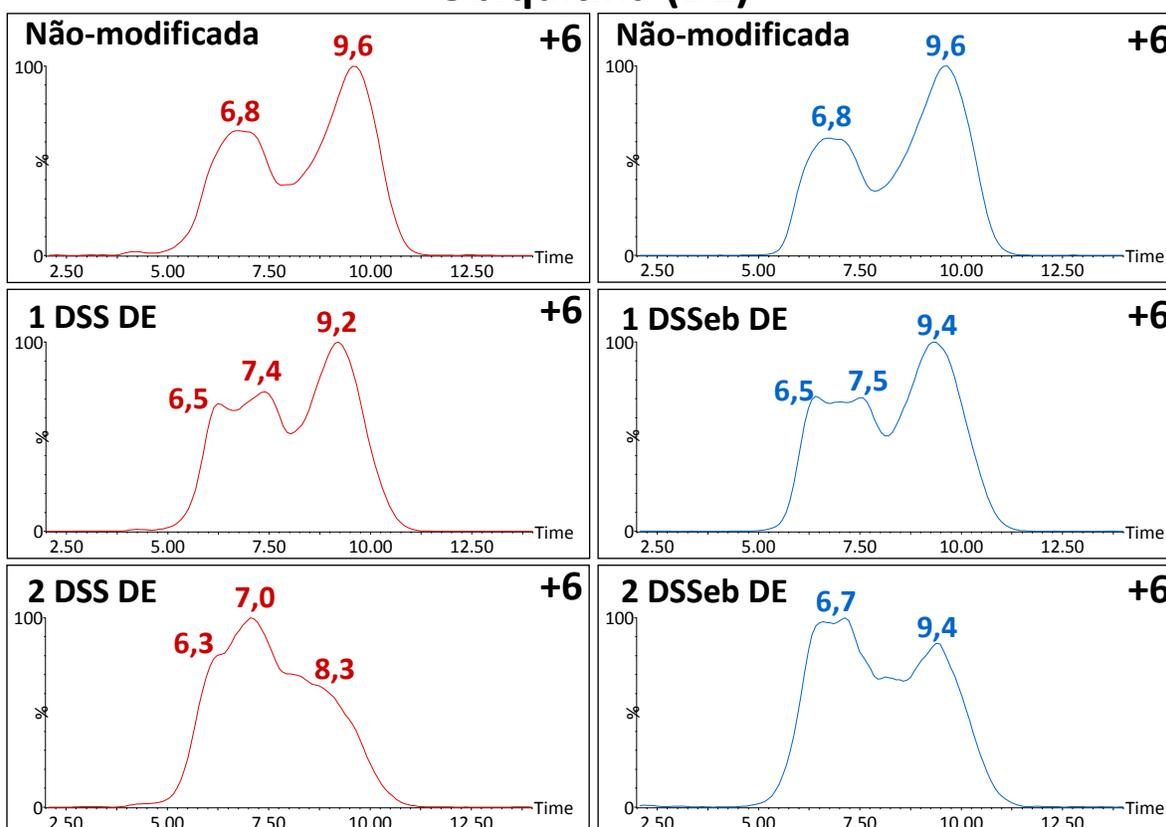


Figura 35. Cromatogramas ATD extraídos para experimentos de TWIM-MS com ubiquitina em condição nativa. Íons do estado de carga +6, com a proteína não-modificada (topo) ou após ligação de 1 (meio) ou 2 (inferior) moléculas de DSS (coluna da esquerda) ou DSSeb (coluna da direita) na forma de DE (*dead-end*).

Para as análises de TWIM-MS de mioglobina em condição nativa foram obtidos resultados similares às outras proteínas, porém com menor efeito de compactação das conformações em fase gasosa dos íons, de forma que os cromatogramas ATD obtidos após reação com ALC mostram-se apenas ligeiramente diferentes daqueles observados para a proteína não-modificada em condições nativas. Uma possível explicação para essa observação é que a

mioglobina possui praticamente o mesmo número de sítios básicos expostos, mas é 25% maior que o citocromo C, de forma que a eliminação de sítios de carga espacialmente próximos não deve induzir à organização em formas mais compactas em mesma magnitude que o observado para citocromo C e ubiquitina.

3.4.4. Comparações entre CCS experimentais e teóricas

A inspeção cuidadosa de estruturas tridimensionais de proteínas determinadas por XRD ou NMR fornece ótimas noções da natureza das respectivas estruturas nativas, permitindo visualizar o arranjo de estruturas secundárias, a disposição de cadeias umas em relação a outras, quais segmentos ou resíduos de aminoácido estão próximos o suficiente para interagir, quais regiões da proteína estão expostas ou não ao solvente, dentre outras informações. No presente estudo, o cálculo de valores de CCS teóricos para essas estruturas permite obter valores de referência para proteínas no estado nativo, que podem ser comparados com valores experimentais, de forma a avaliar se a conformação dos íons em fase gasosa observada experimentalmente aproxima-se ou não da conformação tida como referência para aquela do estado nativo. Nesse sentido, sabe-se que as conformações obtidas por NMR possivelmente tendem a uma maior similaridade com as estruturas nativas reais em solução em comparação com XRD, pelo fato desses experimentos serem realizados em solução, que pode ser ajustada de forma a garantir que as moléculas de proteína mantenham-se em suas conformações nativas, além de permitir movimentação mais livre das cadeias principal e laterais da proteína. Por essa razão, estruturas obtidas a partir de experimentos de NMR em solução tendem a ser mais expandidas que aquelas determinadas por XRD, de forma que também se espera maiores valores de CCS calculados para as estruturas de NMR em relação às estruturas de XRD.

Os valores de CCS teóricas foram calculados para algumas estruturas representativas das proteínas estudadas, sendo os resultados agrupados e comparados com aqueles obtidos experimentalmente na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de CCS experimentais, obtidas por TWIM-MS para os vários estados de carga observados em condição nativa, e teóricos, obtidos computacionalmente através dos programas CCSCalc e MOBCAL para estruturas de XRD ou NMR representativas, das proteínas mioglobina, citocromo C e ubiquitina.

Proteína	Estrutura PDB ¹	Tipo	CCSCalc (Å ²)	MOBCAL (Å ²)			CCS Exp. (Å ²)
				PA	EHSS	TM	
Mioglobina	1WLA (Equina)	XRD	1494	1399	1763	1947	2418 (+9)
	1YMB (Equina)	XRD	1498	1400	1767	1926	2216 (+8)
	1MYF (Cachalote)	NMR	1501	1401	1777	1959	1798 (+7)
Citocromo C	1HRC (Equino)	XRD	1168	1086	1355	1534	1520 (+6)
	1OCD (Equino)	NMR	1183	1092	1376	1516	1917 (+8)
	2GIW (Equino)	NMR	1223	1120	1405	1579	1664 (+7)
Ubiquitina	1UBQ (Humana)	XRD	996	907	1116	1272	1318 (+6)
	1D3Z (Humana)	NMR	1008	911	1129	1272	1063 (+5)
	2KLG (Humana)	NMR	1018	920	1135	1282	890 (+4)

Em geral, observa-se uma variação considerável entre valores de CCS estimados teoricamente pelos vários métodos, sendo que há maior correspondência entre o método PA do MOBCAL e os valores produzidos pelo CCSCalc, visto que ambos os algoritmos são similares.

Para mioglobina, verifica-se que as estruturas de XRD ou NMR possuem valores de CCS intermediários entre os obtidos experimentalmente para os estados de carga +6, +7 e +8 dos íons da proteína. Considerando-se apenas o método TM, que supostamente fornece as melhores aproximações, é possível estimar que as estruturas teóricas aproximam-se mais dos íons com estados de carga +7 e +8. Para citocromo C, há ótima correspondência entre os estados de carga +5 e +6 com os valores teóricos obtidos. Considerando-se o método TM, é possível verificar que os íons dos estados de carga +6 e +7 possuem valores de CCS mais próximos daqueles obtidos teoricamente, sendo o estado de carga +8 consideravelmente mais expandido (maior valor de CCS) que as estruturas

determinadas por XRD e NMR. Por fim, para ubiquitina há melhor correspondência com os estados de carga +4 e +5, sendo possivelmente a conformação respectiva ao estado de carga +7 mais expandida (maior valor de CCS) que as estruturas determinadas por XRD e NMR.

De maneira geral, observa-se boa correspondência entre os valores teóricos e os experimentais para as proteínas estudadas. Esse resultado demonstra a capacidade da técnica de ESI, tida como suave, em transferir íons de proteínas da solução para a fase gasosa sem ocasionar grandes mudanças nas conformações das proteínas, ao menos no que diz respeito à variação dos valores de CCS que, nesse caso, representam em termos simples uma maneira de avaliar a forma e o tamanho dos íons produzidos. Além disso, a metodologia de medida de valores de CCS por TWIM-MS e comparação com valores teóricos obtidos computacionalmente fica validada como uma ferramenta útil para se estudar estruturas e conformações de proteínas, podendo ser aplicada também para experimentos visando o estudo de processos de enovelamento e desenovelamento, que podem ser acompanhados pelas variações nos valores de CCS.

3.5. Conclusão

A técnica de mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massas (TWIM-MS) foi utilizada para avaliar mudanças conformacionais em proteínas após reações com ALC, em termos da variação da CCS de íons correspondendo a vários estados de carga das proteínas antes e após reações de ligação cruzada. Os dados demonstraram que as proteínas sofrem mudanças conformacionais devido à ligação do ALC, aumentando a população de conformações mais compactas com redução de população de conformações estendidas, mediante restrição da dinâmica dos íons de proteínas em fase gasosa. Comparações entre valores de CCS obtidos para análises em condições nativas e desnaturadas, com modificações de ligação cruzada do tipo intramolecular (XL) ou *dead-end* (DE) permitiram estabelecer que o aumento da população de conformações mais compactas é principalmente devido ao alívio de repulsões eletrostáticas de cargas especialmente próximas nas proteínas, permitindo o estabelecimento de uma maior quantidade de interações intramoleculares e consequente organização dos íons das proteínas em formas menos volumosas e de menor valor de CCS.

A comparação de valores teóricos de CCS obtidos para estruturas das proteínas estudadas determinadas por XRD ou NMR com os valores experimentais obtidos demonstrou boa correspondência, sendo possível atribuir íons representando alguns estados de carga observados como tendo conformações mais próximas com aquelas determinadas no estado sólido por XRD ou em solução por NMR, validando a metodologia de medidas de CCS por experimentos de TWIM-MS para o estudo de conformações de proteínas.

4. Referências bibliográficas

- [1] Davis, R.; Frearson, M. *Mass Spectrometry – Analytical Chemistry by Open Learning*, John Wiley & Sons, London **1987**.
- [2] Munson, M. S. B.; Field, F.H., *Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction* **1966**.
- [3] Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Whitehouse, C.M. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- [4] Karas, M.; Hillenkamp, F. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
- [5] Kinter, M.; Sherman, N. E. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, New York, John Wiley & Sons, **2000**.
- [6] Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R. G. *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 430–443.
- [7] Aebersold, R.; Goodlett, D. R. *Mass Spectrometry in Proteomics*. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 269–296.
- [8] Aebersold, R.; Mann, M. *Mass spectrometry-based proteomics*. *Nature*, **2003**, *422*, 198–207.
- [9] Patterson, S. D.; Aebersold, R. *Proteomics: the first decade and beyond*. *Nature Genet.* **2003**, *33*, 311–323.
- [10] Steen, H.; Mann, M. *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 699–711.
- [11] Yates III, J. R., *Mass spectral analysis in proteomics*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 297–316.
- [12] Domon, B.; Aebersold, R. *Mass Spectrometry and Protein Analysis*. *Science* **2006**, *312*, 212–218.
- [13] Cravatt, B. F.; Simon, G. M.; Yates III, J. R. *The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics*. *Nature* **2007**, *450*, 991–1000.
- [14] Lopes, N. P.; Crotti, E. M.; Vessechi, R.; Lopes, J. L. C. *Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular*. *Quím. Nova* **2006**, *29*, 287–292.
- [15] Wong, S. S. *Chemistry Of Protein Conjugation And Cross-Linking*. CRC Press, **1993**, Florida, United States.
- [16] Sinz, A. *Chemical Cross-Linking And Mass Spectrometry To Map Three-Dimensional Protein Structures And Protein–Protein Interactions*. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 663–682.
- [17] Sinz, A. *Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes*. *J. Mass. Spectrom.* **2003**, *38*, 1225–1237.
- [18] Dihazi, G. H.; Sinz, A. *Mapping low-resolution three-dimensional protein structures using chemical cross-linking and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry*. *Rapid. Comm. Mass. Spectrom.* **2003**, *17*, 2005–2014.
- [19] Silva, R. A. G. D.; Hilliard, G. M.; Fang, J.; Macha, S.; Davison, W. S. *A Three-Dimensional Molecular Model Of Lipid-Free Apolipoprotein A-I Determined By Cross-Linking/Mass Spectrometry And Sequence Threading*. *Biochemistry* **2005**, *44*, 2759–2769.
- [20] Lübben, M.; Portmann, R.; Kock, G.; Stoll, R.; Young, M. M.; Solioz, M. *Structural model of the CopA copper ATPase of Enterococcus hirae based on chemical cross-linking*. *Biometals* **2009**, *22*, 363–375.
- [21] Lacroix, M.; Rossi, V.; Gaboriaud, C.; Chevallier, S.; Jaquinod, M.; Thielens, N. M.; Gagnon, J.; Arlaud, G. J. *Structure and Assembly of the Catalytic Region of Human*

Complement Protease Cr: A Three-Dimensional Model Based on Chemical Cross-Linking and Homology Modeling. Biochemistry **1997**, *36*, 6270–6282.

[22] Alley, S. C.; Trakselis, M. A.; Mayer, M. U.; Ishmael, F. T.; Jones, A. D.; Benkovic, S. J. *Building a Replisome Solution Structure by Elucidation of Protein-Protein Interactions in the Bacteriophage T4 DNA Polymerase Holoenzyme, J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39340–39349.

[23] Chu, F.; Shan, S.; Moustakas, D. T.; Alber, F.; Egea, P. F.; Stroud, R. M.; Water, P.; Burlingame, A. L. *Unraveling The Interface Of Signal Recognition Particle And Its Receptor By Using Chemical Cross-Linking And Tandem Mass Spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, *101*, 16454–16459.

[24] Schulz, D. M.; Ihling, C.; Clore, G. M.; Sinz, A. *Mapping the Topology and Determination of a Low-Resolution Three-Dimensional Structure of the Calmodulin-Melittin Complex by Chemical Cross-Linking and High-Resolution FTICRMS: Direct Demonstration of Multiple Binding Modes. Biochemistry* **2004**, *43*, 4703–4715.

[25] Chen, Z. A.; Jawhari, A.; Fischer, L.; Buchen, C.; Tahir, S.; Kamenski, T.; Rasmussen, M.; Lariviere, L.; Bukowski-Wills, J.-C.; Nilges, M.; Cramer, P.; Rappsilber, J. *Architecture Of The RNA Polymerase II-TFIIF Complex Revealed By Cross-Linking And Mass Spectrometry, EMBO J.* **2010**, *29*, 717–726.

[26] Singh, P.; Panchaud, A.; Goodlett, D. R. *Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry As a Low-Resolution Protein Structure Determination Technique. Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2636–2642.

[27] Sinz, A. *Isotope-Labeled Photoaffinity Reagents and Mass Spectrometry To Identify Protein–Ligand Interactions. Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 660–662.

[28] Collins, C. J.; Schilling, B.; Young, M. M.; Dollinger, G.; Guy, R. K. *Isotopically labeled crosslinking reagents: Resolution of mass degeneracy in the identification of cross-linked peptides. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4023–4026.

[29] Schmidt, A.; Kalkhof, S.; Ihling, C.; Cooper, D. M. F.; Sinz, A. *Mapping protein interfaces by chemical cross-linking and FTICR mass spectrometry: Application to a calmodulin/adenylyl cyclase 8 peptide complex. Eur. J. Mass Spectrom.* **2005**, *11*, 525–534.

[30] Alley, S. C.; Ishmael, F. T.; Jones, A. D.; Benkovic, S. J. *Mapping proteinprotein interactions in the bacteriophage T4 DNA polymerase holoenzyme using a novel trifunctional photo-cross-linking and affinity reagent. J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6126–6127.

[31] Trester-Zedlitz, M.; Kamada, K.; Burley, S. K.; Fenyö, D.; Chait, B.T.; Muir, T. W. *A modular cross-linking approach for exploring protein interactions. J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2416–2425.

[32] Back, J. W.; Artal Sanz, M.; de Jong, L.; de Koning, L. J.; Nijtmans, L. G. J.; de Koster, C. G.; Grivell, L. A.; van der Spek, H.; Muijsers, A. O. *A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry. Prot. Sci.* **2002**, *11*, 2471–2478.

[33] Peterson, J. J.; Young, M. M.; Takemoto, L. J. *Probing α -crystallin structure using chemical cross-linkers and mass spectrometry. Molecul. Vision.* **2004**, *10*, 857–866.

[34] Tang, X.; Munske, G. R.; Siems, W. F.; Bruce, J. E. *Mass spectrometry identifiable cross-linking strategy for studying protein–protein interactions. Anal. Chem.* **2005**, *77*, 311–318.

[35] Chen, X.; Chen, Y. H.; Anderson, V. E.; *Protein cross-links: Universal isolation and characterization by isotopic derivatization and electrospray ionization mass spectrometry. Anal. Biochem.* **1999**, *273*, 192–203.

- [36] Taverner, T.; Hall, N. E.; O'Hair, R. A. J.; Simpson, R. J. *Characterization of an antagonist interleukin-6 dimer by stable isotope labeling, cross-linking, and mass spectrometry. J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 46487–46492.
- [37] Back, J. W.; Notenboom, V.; de Koning, L. J.; Muijsers, A. O.; Sixma, T. K.; de Koster, C. G.; de Jong, L. *Identification of cross-linked peptides for protein interaction studies using mass spectrometry and ¹⁸O labeling. Anal. Chem.* **2002**, 74, 4417–4422.
- [38] Schnölzer, M.; Jedrzejewski, P.; Lehmann, W. D. *Protease-catalyzed incorporation of O-18 into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Electrophoresis* **1996**, 17, 945–953.
- [39] Huang, B. X.; Kim, H. Y.; Dass, C. *Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 1237–1247.
- [40] Iglesias, A. H.; Santos, L. F. A.; Gozzo, F. C. *Collision-Induced Dissociation of Lys–Lys Intramolecular Crosslinked Peptides. J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, 20, 557–566.
- [41] Iglesias, A. H.; Santos, L. F. A.; Gozzo, F. C. *Identification of Cross-linked Peptides by High Resolution Precursor Ion Scan. Anal. Chem.* **2010**, 82, 909–916.
- [42] Y. Chen, F. Ding, N. V. Dokholyan. *Fidelity of the Protein Structure Reconstruction from Inter-Residue Proximity Constraints. J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 7432–7438.
- [43] M. M. Young, N. Tang, J. C. Hempel, C. M. Oshiro, E. W. Taylor, I. D. Kuntz, B. W. Gibson, G. Dollinger. *High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5802–5806.
- [44] <http://www.pdb.org>
- [45] Haniu, M.; Narhi, L. O.; Arakawa, T.; Elliott, S.; Rohde, M. F. *Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): Cross-linking with disuccinimidyl esters and identification of the interfacing domains in EPO. Protein Sci.* **1993**, 2, 1441–1451.
- [46] Blencowe, A.; Hayes, W. *Development and application of diazirines in biological and synthetic macromolecular systems. Soft Matter* **2005**, 1, 178–205.
- [47] Knowles, J. R. *Photogenerated Reagents for Biological Receptor-Site Labeling. Acc. Chem. Res.* **1972**, 5, 155–160.
- [48] Brunner, J. *New Photolabeling And Crosslinking Methods. Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 483–514.
- [49] McMahan, S. A.; Burgess, R. R. *Use of Aryl Azide Cross-Linkers To Investigate Protein-Protein Interactions: An Optimization of Important Conditions as Applied to Escherichia coli RNA Polymerase and Localization of a σ_{70} - α Cross-Link to the C-Terminal Region of α . Biochemistry* **1994**, 33, 12092–12099.
- [50] Dormán, G.; Prestwich, G. D. *Benzophenone Photophores in Biochemistry. Biochemistry* **1994**, 33, 5661–5673.
- [51] Wittelsberger, A.; Thomas, B. E.; Mierke, D. F.; Rosenblatt, M. *Methionine acts as a “magnet” in photoaffinity crosslinking experiments. FEBS Lett.* **2006**, 580, 1872–1876.
- [52] Tanaka, Y.; Bond, M. R.; Kohler, J. J. *Photocrosslinkers illuminate interactions in living cells. Mol. Biosyst.* **2008**, 4, 473–480.
- [53] Church, R. F. R.; Weiss, M. J. *Diazirines. II. Synthesis And Properties of Small Functionalized Diazirine Molecules. Some Observations on the Reaction of a Diaziridine with the Iodine-Iodide Ion System. J. Org. Chem.* **1970**, 35 (8), 2465–2471.
- [54] Moss, R. A. *Carbenic Reactivity Revisited. Acc. Chem. Res.* **1989**, 22, 15–21.
- [55] Smith, R. A. G.; Knowles, J. R. *Aryldiazirines. Potential reagents for photolabeling of biological receptor sites. J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 5072–5073.
- [56] Smith, R. A. G.; Knowles, J. R. *The preparation and photolysis of 3-aryl-3H-diazirines. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* **1975**, 7, 686–694.

- [57] Mossa, R. A. *Diazirines: Carbene Precursors Par Excellence*. *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 267–272.
- [58] Suchanek, M.; Radzikowska, A.; Thiele, C. *Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells*. *Nature Methods* **2005**, 2, 261–268.
- [59] Bongo, N. B.; Tomohiro, T.; Hatanaka, Y. *Synthesis and evaluation of novel photoreactive α -amino acid analog carrying acidic and cleavable functions*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 80–82.
- [60] Qiu, Z.; Lu, L.; Jian, X.; He, C. *A Diazirine-Based Nucleoside Analogue for Efficient DNA Interstrand Photocross-Linking*. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 130, 14398–14399.
- [61] Emeis, D.; Kuhn, H. J.; Hofmann, R.; Hofmann, K. P. *Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes leads to a shift of the photoproduct equilibrium*. *FEBS Lett.*, **1982**, 143, 29–34.
- [62] Bochkareva, E. S.; Solovieva, M. E.; Girshovich, A. S. *Targeting of GroEL to SecA on the cytoplasmic membrane of Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 478–483.
- [63] Bochkariov, D. E.; Kogon, A. A. *Application of 3-[3-(3-(trifluoromethyl)diazirin-3-yl)phenyl]-2,3-dihydroxypropionic acid, carbene-generating, cleavable cross-linking reagent for photoaffinity labeling*. *Anal. Biochem.* **1992**, 204, 90–95.
- [64] Tanaka, Y.; Kohler, J. J. *Photoactivatable Crosslinking Sugars for Capturing Glycoprotein Interactions*. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3278–3279.
- [65] M. W. Geiger, M. M. Elliot, V. D. Karacostas, T. J. Moricone, J. B. Salmon, V. L. Sideli, M. A. St. Onge. *Aryl azides as protein photolabels: absorption spectral properties and quantum yields of dissociation*. *Photochemistry and Photobiology*. **1984**, 40, 545–548.
- [66] “Instructions – Amine-Reactive Diazirine Crosslinkers” da Thermo Fisher Scientific Inc. (<http://www.piercenet.com/files/2067as4.pdf>, acessado em 10/06/2010).
- [67] <http://www.matrixscience.com>
- [68] S. Peri, H. Steen, A. Pandey. *GPMAW – a software tool for analyzing proteins and peptides*. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 687.
- [69] E. B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke, P. R. Selvin. *A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry*. *Anal. Biochem.* **1999**, 273, 73–80.
- [70] R. Maurus, C. M. Overall, R. Bogumil, Y. Luo, A. G. Mauk, M. Smith, G. D. Brayer. *A myoglobin variant with a polar substitution in a conserved hydrophobic cluster in the heme binding pocket*. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 31, 1–13.
- [71] <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1WLA>, acessado em junho de 2010.
- [72] Kanu, A. B.; Dwivedi, P.; Tam, M.; Matz, L.; Hill Jr., H. H. *Ion mobility-mass spectrometry*. *J. Mass. Spectrom.* **2008**, 43, 1–22.
- [73] Wong, R. L.; Williams, E. R.; Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. *Evaluation of ion mobility spectroscopy for determining charge-solvated versus salt-bridge structures of protonated trimers*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, 16, 1009–1019.
- [74] McDaniel, E. W.; Martin, D. W.; Barnes, W. S. *Drift-tube mass spectrometer for studies of low-energy ion-molecule reactions*. *Review of Scientific Instruments* **1962**, 33, 2–7.
- [75] Albritton, D. L.; Miller, T. M.; Martin, D. W.; McDaniel, E. W. *Mobilities of mass-identified ions in hydrogen*. *Phys. Rev.* **1968**, 171, 94–102.
- [76] McDaniel, E. W. *Possible sources of large error in determinations of ion-molecule reaction rates with drift tube-mass spectrometers*. *J. Chem. Phys.* **1970**, 52, 3931–3935.
- [77] McAfee Jr., K. B.; Sipler, D. P.; Edelson, D. *Mobilities and reactions of ions in argon*. *Phys. Rev.* **1967**, 160, 130–135.

- [78] Edelson, D.; Morrison, J. A.; McKnight, L. G.; Sipler, D. P. *Interpretation of Ion-Mobility Experiments in Reacting Systems*. *Phys. Rev.* **1967**, *164*, 71–75.
- [79] Young, C. E.; Edelson, D.; Falconer, W. E. *Water cluster ions: rates of formation and decomposition of hydrates of the hydronium ion*. *J. Chem. Phys.* **1970**, *53*, 4295–4302.
- [80] Karasek, F. W.; Cohen, M. J.; Carroll, D. I. *Trace studies of alcohols in the plasma chromatography-mass spectrometer*. *J. Chrom. Sci.* **1971**, *9*, 390–392.
- [81] Kuk, Y.; Jarrold, M. F.; Silverman, P. J.; Bower, J. E.; Brown, W. L. *Preparation and observation of Si_{10} clusters on a Au(001)-(5×20) surface*. *Phys. Rev. B.* **1989**, *39*, 11168–11170.
- [82] Kemper, P. R.; Bowers, M. T. *A hybrid double-focusing mass spectrometer—high-pressure drift reaction cell to study thermal energy reactions of mass-selected ions*. *J. Am. Soc. Mass Spec.* **1990**, *1*, 197–207.
- [83] Bowers, M. T.; Kemper, P. R.; von Helden, G.; Van Koppen, P. A. M. *Gas-Phase Ion Chromatography: Transition Metal State Selection and Carbon Cluster Formation*. *Science* **1993**, *260*, 1446–1451.
- [84] Gotts, N. G.; von Helden, G.; Bowers, M. T. *Carbon cluster anions: structure and growth from C_5^- to C_{62}^-* . *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1995**, *149*, 217–229.
- [85] Wyttenbach, T.; Witt, M.; Bowers, M. T. *On the Stability of Amino Acid Zwitterions in the Gas Phase: The Influence of Derivatization, Proton Affinity, and Alkali Ion Addition*. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3458–3464.
- [86] Srebalus, C. A.; Li, J.; Marshall, W. S.; Clemmer, D. E. *Gas-phase separations of electrosprayed peptide libraries*. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3918–3927.
- [87] Thalassinos, K.; Slade, S. E.; Jennings, K. R.; Scrivens, J. H.; Giles, K.; Wildgoose, J.; Hoyes, J.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T. *Ion mobility mass spectrometry of proteins in a modified commercial mass spectrometer*. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *236*, 55–63.
- [88] Gidden, J.; Baker, E. S.; Ferzoco, A.; Bowers, M. T. *Structural motifs of DNA complexes in the gas phase*. *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *240*, 183–193.
- [89] Gidden, J.; Wyttenbach, T.; Jackson, A. T.; Scrivens, J. H.; Bowers, M. T. *Gas-Phase Conformations of Synthetic Polymers: Poly(ethylene glycol), Poly(propylene glycol), and Poly(tetramethylene glycol)*. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4692–4699.
- [90] Dwivedi, P.; Bendiak, B.; Clowers, B. H.; Hill Jr., H. *Rapid Resolution of Carbohydrate Isomers by Electrospray Ionization Ambient Pressure Ion Mobility Spectrometry-Time-of-Flight Mass Spectrometry (ESI-APIMS-TOFMS)*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1163–1175.
- [91] Dwivedi, P.; Wu, C.; Matz, L. M.; Clowers, B. H.; Siems, W. F.; Hill Jr., H. H. *Gas-Phase Chiral Separations by Ion Mobility Spectrometry*. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8200–8206.
- [92] Merenbloom, S. I.; Glaskin, R. S.; Henson, Z. B.; Clemmer, D. E. *High-Resolution Ion Cyclotron Mobility Spectrometry*. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1482–1487.
- [93] Kemper, P. R.; Dupuis, N. F.; Bowers, M. T. *A new, higher resolution, ion mobility mass spectrometer*. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *287*, 46–57.
- [94] Clemmer, D. E.; Jarrold, M. F. *Ion Mobility Measurements and their Applications to Clusters and Biomolecules*. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 557–592.
- [95] Mesleh, M. F.; Hunter, J. M.; Shvartsburg, A. A.; Schatz, G. C.; Jarrold, M. F. *Structural Information from Ion Mobility Measurements: Effects of the Long Range Potential*. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16082–16086.
- [96] Shvartsburg, A. A.; Jarrold, M. F. *An Exact Hard Spheres Scattering Model for the Mobilities of Polyatomic Ions*. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *261*, 86–91.
- [97] <http://www.indiana.edu/~nano/> (acessado em 26/05/2010)

- [98] Von Helden, G.; Hsu, M-T.; Gotts, N.; Bowers, M. T. *Carbon Cluster Cations with up to 84 Atoms: Structures, Formation Mechanism, and Reactivity*. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8182–8192.
- [99] Moradian, A.; Scalf, M.; Westphall, M. S.; Smith, L. M.; Douglas, D. J. *Collision cross sections of gas phase DNA ions*. *Int. J. Mass. Spectrom.* **2002**, *219*, 161–170.
- [100] Valentine, S. J.; Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. *A Database of 660 Peptide Ion Cross Sections: Use of Intrinsic Size Parameters for Bona Fide Predictions of Cross Sections*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 1188–1211.
- [101] Clemmer, D. E.; Hudgins, R. R.; Jarrold, M. F. *Naked Protein Conformations: Cytochrome c in the Gas Phase*. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10414–10422.
- [102] Baker, E. S.; Bushnell, J. E.; Weckler, S. R.; Lim, M. D.; Manard, M. J.; Dupuis, N. F.; Ford, P. C.; Bowers, M. T. *Probing Shapes of Bichromophoric Metal-Organic Complexes Using Ion Mobility Mass Spectrometry*. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18222–18228.
- [103] Giles, K.; Pringle, S. D.; Worthington, K. R.; Little, D.; Wildgoose, J. L.; Bateman, R. H. *Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide*. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2401–2414.
- [104] Pringle, S. D.; Giles, K.; Wildgoose, J. L.; Williams, J. P.; Slade, S. E.; Thalassinos, K.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H. *An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument*. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *261*, 1–12.
- [105] <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=514457> (acessado em 26/05/2010)
- [106] Scarff, C. A.; Thalassinos, K.; Hilton, G. R.; Scrivens, J. H. *Travelling wave ion mobility mass spectrometry studies of protein structure: biological significance and comparison with X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements*. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 3297–3304.
- [107] Ruotolo, B. T.; Giles, K.; Campuzano, I.; Sandercock, A. M.; Bateman, R. H.; Robinson, C. V. *Evidence for Macromolecular Protein Rings in the Absence of Bulk Water*. *Science* **2005**, *310*, 1658–1661.
- [108] Ruotolo, B. T.; Hyung, S. J.; Robinson, P. M.; Giles, K.; Bateman, R. H.; Robinson, C. V. *Ion Mobility-Mass Spectrometry Reveals Long-Lived, Unfolded Intermediates in the Dissociation of Protein Complexes*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8001–8004.
- [109] Benassi, M.; Corilo, Y. E.; Uria, D.; Augusti, R.; Eberlin, M. N. *Recognition and Resolution of Isomeric Alkyl Anilines by Mass Spectrometry*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *20*, 269–277.
- [110] Williams, J. P.; Bugarcic, T.; Habtemariam, A.; Giles, K.; Campuzano, I.; Rodger, P. M.; Sadler, P. J. *Isomer Separation and Gas-Phase Configurations of Organoruthenium Anticancer Complexes: Ion Mobility Mass Spectrometry and Modeling*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *6*, 1119–1122.
- [111] Hilton, G. R.; Thalassinos, K.; Grabenauer, M.; Sanghera, N.; Slade, S. E.; Wyttenbach, T.; Robinson, P. J.; Pinheiro, T. J. T.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H. *Structural Analysis of Prion Proteins by Means of Drift Cell and Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 845–854.
- [112] Scarff, C.; Patel, V. J.; Thalassinos, K.; Scrivens, J. H. *Probing Hemoglobin Structure by Means of Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 625–631.
- [113] Smith, D. P.; Giles, K.; Bateman, R. H.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E. *Monitoring Copopulated Conformational States During Protein Folding Events Using Electrospray Ionization-Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 2180–2190.

Referências Bibliográficas

- [114] Van Duijn, E.; Barendregt, A.; Synowsky, S.; Versluis, C.; Heck, A. J. R. *Chaperonin Complexes Monitored by Ion Mobility Mass Spectrometry*. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1452–1459.
- [115] Pukala, T. L.; Ruotolo, B. T.; Zhou, M.; Politis, A.; Stefanescu, A.; Leary, J. A.; Robinson, C. V. *Subunit Architecture of Multiprotein Assemblies Determined Using Restraints from Gas-Phase Measurements*. *Structure* **2009**, *17*, 1235–1243.
- [116] Hyung, S-J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. *Gas-Phase Unfolding and Disassembly Reveals Stability Differences in Ligand-Bound Multiprotein Complexes*. *Chemistry & Biology*. **2009**, *16*, 382–390.
- [117] Ruotolo, B. T.; Benesch, J. L. P.; Sandercock, A. M.; Hyung, S-J.; Robinson, C.V; *Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes*. *Nature Protocols* **2008**, *3*, 1139–1152.
- [118] van den Heuvel, R. H. H.; Heck, A. J. R. *Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 519–526.
- [119] Versluis, C.; Heck, A. J. R. *Gas-phase dissociation of hemoglobin*. *Int. J. Mass. Spectrom.* **2001**, *210/211*, 637–649.
- [120] Heck, A. J. R.; van den Heuvel, R. H. H. *Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry*. *Mass. Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 368–389.
- [121] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics* **1996**, *14*, 33–38.
- [122] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> (acessado em junho de 2010).
- [123] <http://www.indiana.edu/~clemmer/>