



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica



Tese de Doutorado

Luiz Fernando Arruda Santos

**Uso de Espectrometria de Massas e
Mobilidade Iônica na Caracterização de
Peptídeos Provenientes de Experimentos de
Ligação Cruzada**

Orientador: Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo

Campinas - SP

2011

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

Sa59u	<p>Santos, Luiz Fernando Arruda. Uso da espectrometria de massas e mobilidade iônica na caracterização de peptídeos provenientes de experimentos de ligação cruzada / Luiz Fernando Arruda Santos. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo.</p> <p style="text-align: center;">Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. Espectrometria de massas. 2. Mobilidade iônica. 3. Ligação cruzada. I. Gozzo, Fábio Cesar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: Mass spectrometry and ion mobility in the characterization and of peptides from protein cross-linking experiments

Palavras-chaves em inglês: Mass spectrometry, Ion mobility, Cross-linking

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo (orientador), Prof. Dr. Emanuel Carrilho (USP-IQSC), Prof. Dr. Jose Manuel Riveros Nigra (USP-IQ), Prof. Dr. Munir Salomão Skaf (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 10/03/2011

*“When I wake up, well I know I'm gonna be,
I'm gonna be the man who wakes up next to you
When I go out, yeah I know I'm gonna be
I'm gonna be the man who goes along with you
If I get drunk, well I know I'm gonna be
I'm gonna be the man who gets drunk next to you
And if I haver, hey I know I'm gonna be
I'm gonna be the man who's havering to you*

*But I would walk 500 miles
And I would walk 500 more
Just to be the man who walks a thousand miles
To fall down at your door*

*When I'm working, yes I know I'm gonna be
I'm gonna be the man who's working hard for you
And when the money, comes in for the work I do
I'll pass almost every penny on to you
When I come home, well I know I'm gonna be
I'm gonna be the man who comes back home to you
And if I grow, well I know I'm gonna be
I'm gonna be the man who's growing old with you”*

(The Proclaimers - I'm Gonna Be (500 Miles))

Dedico este trabalho aos meus pais, Marilda e José Carlos.

Não sei o que faria sem o apoio deles...

Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Fábio Cesar Gozzo, pela orientação e paciência durante esses quatro anos.

Ao meu pai, José Carlos, minha mãe, Marilda e minha irmã, Carol, por todo o carinho, incentivo e dedicação. É muito mais fácil conquistar qualquer coisa quando temos pessoas assim nos apoiando.

A toda minha família, em especial ao meu avô, Álvaro, meus tios e primos.

À minha namorada, Tallita, por estar ao meu lado por todo esse tempo. Por me apoiar nas decisões difíceis e tornar tudo muito mais alegre e prazeroso. Te amo minha fofinha!

Aos amigos do grupo, Pilau, Alex, Alana e Mariana, pelo companheirismo e paciência durante esse período e ajudarem a realizar esse trabalho. Tenho certeza que nossa amizade não acaba agora. Em especial, agradeço ao Amadeu, por toda a força e ensinamento. É muito bom saber que posso contar sua amizade.

Aos Profs. Juri Rappsilber e Perdita Barran, da Universidade de Edimburgo, pelo aceite e orientação durante os seis meses que passei na cidade mais bela do mundo. Aos amigos “internacionais” que fiz por lá, Martin, Salman, Lutz, Flávia, Angel, Fernando, Gardênia, Noah e todos os outros que não coloquei o nome aqui.

Aos amigos de república, Pablo e Indaia; e do futebol, Almir.

Aos meus amigos de Itu, em especial ao Galo, Gus, Mané, Brubru, Peteco, Ikaros e muitos outros, que mesmo não tendo a mínima idéia do que se tratou meu projeto de doutorado sempre perguntavam “como as coisas estão indo?”.

Ao Prof. Marcos Eberlin, por ceder tempo e espaço de laboratório para os experimentos realizados no FT-ICR.

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

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

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome Luiz Fernando Arruda Santos

Filiação José Carlos dos Santos e Marilda Laghi Arruda Santos

Nascimento 15/03/83 – Itu, SP, Brasil

Tel. Celular: (11) 7417-7782

Endereço eletrônico lfitu@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

03/2007 – 03/2011, Doutorado em Química Orgânica

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil

Título da Tese: Estudos de Fragmentação e Mobilidade Iônica de Peptídeos Contendo Agentes de Ligação Cruzada e Aplicação em Sistemas Protéicos

Previsão defesa: Março 2011

Orientador: Fabio César Gozzo

03/2005 – 12/2006, Mestrado em Química Orgânica

Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil

Título da Dissertação: Estudo do Metabolismo Secundário de Xylaria sp, um Fungo Endofítico Isolado de Sapindus saponaria

Orientador: Edson Rodrigues Filho

03/2005 – 12/2006, Licenciatura em Química

Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil

03/2001 – 12/2004, Bacharelado em Química

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil

Formação Complementar

03/2010 – 08/2010 Doutorado Sandwich (SWE)

Escola de Química, Universidade de Edimburgo, Edimburgo, Escócia, UK

Título do Projeto: Estudos de Mobilidade Iônica acoplada a Espectrometria de Massas de peptídeos contendo agentes de ligação cruzada.

Co-orientação: Dr. Juri Rappsilber e Dra. Perdita Barran

Artigos Publicados

1. SANTOS, L. F. A.; Iglesias, A. H.; Gozzo, F. C. Fragmentation features of intermolecular cross-linked peptides using N-Hydroxy-succinimide esters by MALDI- and ESI-MS/MS for use in structural proteomics. *Journal of Mass Spectrometry*, aceito para publicação, 2011.
2. SANTOS, L. F. A.; Eberlin, M. N.; Gozzo, F. C. IRMPD and ECD fragmentation of intermolecular cross-linked peptides. *Journal of Mass Spectrometry*, aceito para publicação, 2011.
3. 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*, v. 21, p. 2062-2069, 2010.
4. Iglesias, A. H.; SANTOS, L. F. A.; Gozzo, F. C. Identification of cross-linked peptides by high-resolution precursor ion scan. *Analytical Chemistry (Washington)*, v. 82, p. 909-916, 2010.
5. Ferreira, C.R.; Saraiva, S.A.; Catharino, R.R.; Garcia, J.S.; Gozzo, F.C.; Sanvido, G.B.; SANTOS, L.F.A.; Lo Turco, E.G.; Pontes, J.H.F.; Basso, A. C. ; Bertolla, R.P.; Sartori, R.; Guardieiro, M.M.; Perecin, F.; Meirelles, F.V.; Sangalli, J.R.; Eberlin, M.N. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, v. 51, p. 1218-1227, 2010.
6. Medinas, Danilo B.; Gozzo, Fabio C.; SANTOS, Luiz F.A.; Iglesias, Amadeu H.; Augusto, Ohara. A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity. *Free Radical Biology & Medicine*, p. 1, 2010.
7. Iglesias, A. H.; SANTOS, L. F. A.; Gozzo, F. C. Collision-Induced Dissociation of Lys-Lys Intramolecular Crosslinked Peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 20, p. 557-566, 2009.
8. Tsuzuki, Joyce K.; Svidzinski, T.I.E.; Shinobu, C.S.; SANTOS, L.F.A. Rodrigues Fo. E.; Cortez, D.A.G.; Ferreira, I.C.P. Antifungal Activity of the Extracts and Saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 79, p. 538-577, 2007.
9. Murgu, M.; SANTOS, L.F.A.; Souza, G.D.; Daolio C.; Schneide, D.; Ferreira, A.G.; Rodrigues Fo. E. Hydroxylation of a hederagenin derived saponin by a Xylareaceous fungus found in fruits of *Sapindus saponaria*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, p. 831-835, 2007.

RESUMO

Uso de Espectrometria de Massas e Mobilidade Iônica na Caracterização de Peptídeos Provenientes de Experimentos de Ligação Cruzada

Palavras Chave: Espectrometria de Massas, Ligação cruzada, Fragmentação, Mobilidade Iônica.

A função de uma proteína está diretamente relacionada com sua estrutura e conhecendo a estrutura de uma proteína é possível verificar onde estão localizados e como agem seus sítios ativos e de interação. Dentre os métodos empregados para análise estrutural de proteínas por espectrometria de massas (MS), experimentos de ligação cruzada vêm recebendo grande destaque. Nestes experimentos, após digestão enzimática três tipos de peptídeos contendo agentes de ligação cruzada (ALCs) podem ser formados: espécies intramoleculares, quando o ALC está ligado entre dois resíduos do mesmo peptídeo; espécies intermoleculares, quando o ALC une dois peptídeos distintos e *dead-end*, quando o ALC liga-se apenas a um resíduo, sendo que o outro lado de sua cadeia normalmente sofre hidrólise. A etapa crucial em experimento de ligação cruzada consiste na correta atribuição e identificação dos peptídeos modificados por ALC, etapa que pode ser facilitada conhecendo a fragmentação destes peptídeos. Desse modo, o foco principal deste trabalho foi realizar experimentos de fragmentação das diferentes espécies de peptídeos modificados por ALCs utilizando metodologias baseadas na técnica de espectrometria de massas, como dissociação induzida por colisão (CID), dissociação multifotônica por infravermelho (IRMPD) e dissociação por captura de elétrons (ECD). Os estudos realizados proporcionaram a visualização de um padrão de fragmentação de espécies inter e intramoleculares, bem como a presença de íons diagnósticos, capazes de auxiliar na identificação de peptídeos modificados por ACLs. Além disso, a técnica de mobilidade iônica, que consiste na separação de íons baseado em suas seções de choque, acoplada à espectrometria de massas (IMMS), foi empregada para realizar estudos para caracterização de peptídeos modificados por ALCs. Utilizando IMMS foi possível realizar a separação de espécies isoméricas do tipo *dead-end*, bem como verificar que peptídeos lineares e modificados por ALC, com m/z próximos possuem seções de choque semelhantes.

ABSTRACT

Use of Mass Spectrometry and Ion Mobility for the Characterization of Cross-linked Peptides from Protein Cross-linking Experiments

Keywords: Mass Spectrometry, Protein Cross-linking, Peptide Fragmentation, Ion Mobility.

There are several advantages associated with the use of mass spectrometry (MS) applied to structural studies of proteins, such as unlimited mass of target protein or protein complex, very low time and sample consumption, ease of manipulation and interpretation of the data obtained. In chemical cross-linking coupled to MS, bifunctional reagents (cross-linkers, XL) are used to generate covalent bonds between the side chains of specific residues (usually lysine) and the distance constraints obtained are then used to model the structure of the protein and reveal interacting regions in the case of protein complexes. After enzymatic digestion, three types of peptides modified by the XL can be generated: intramolecular cross-linked, in which the cross-linker is linked to two residues of the same peptide; intermolecular cross-linked, when the reagent connects two peptides; and “dead-end”, that occurs when the cross-linker is bound to only one residue and the other side is usually hydrolyzed. The critical step in a cross-linking experiment is the correct attribution and identification of the modified peptides, which is in turn based on the fragmentation of such species. So, the main focus of this work is to perform fragmentation studies of cross-linked peptides and rationalize fragmentation models to aid in the correct identification and attribution of modified peptides. In our studies we verified a fragmentation pattern of modified peptides, as well as diagnostic fragment ions, able to help in the identification of cross-linked peptides. Studies of ion mobility (IMS) coupled to mass spectrometry (IMMS) to analyze cross-linked peptides were also performed. It was possible to separate dead-end isomers and it was verified that linear and modified peptides, of similar m/z have similar collision cross-section.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Proteínas.....	1
1.2. Caracterização Estrutural de Proteínas por Técnicas Baseadas em Espectrometria de Massas	3
1.3. Ligação Cruzada e Espectrometria de Massas.....	6
1.4. Análise de Peptídeos por Dissociação Induzida por Colisão - CID.....	13
1.5. Dissociação Multifotônica por Infravermelho - IRMPD	17
1.6. Dissociação por Captura de Elétrons - ECD	18
1.7. Espectrometria de Mobilidade Iônica – IMS.....	22
2. OBJETIVOS	28
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
3.1. Material	29
3.2. Estudo de fragmentação de peptídeos contendo ALC por CID	29
3.2.1. Espécies Intramoleculares	29
3.2.2. Espécies Intermoleculares	29
3.2.3. Reação de Ligação Cruzada.....	30
3.2.4. Análise de Espécies Intra e Intermoleculares por MS.....	30
3.3. Estudo de Varredura de Íon Precursor (PIS) para Auxiliar na Detecção de Peptídeos Modificados por ALCs.....	31
3.3.1. Preparação de Amostras	31
3.3.2. Análise por LC-MS/MS	32
3.4. Estudo de Fragmentação de Espécies Intermoleculares por ECD e IRMPD	33
3.4.1. Peptídeos e ALCs utilizados	33
3.4.2. Formação de Espécies Intermoleculares.....	33
3.4.3. Preparação das Amostras e Análise por MS	33
3.5. Separação de Peptídeos Isoméricos Contendo ALC por IMMS	34
3.5.1. Peptídeos, ALCs e Reação de Ligação Cruzada.....	34
3.5.2. Análise por IMMS.....	34
3.6. Mobilidade Iônica de Peptídeos Modificados por ALC e Peptídeos Lineares.....	35
3.6.1. Preparação de Amostras – Universidade de Edimburgo, Escócia...	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Estudo de Fragmentação de Peptídeos Modificados por CID	39
4.1.1. Desenho de Peptídeos Modelo.....	39
4.1.2. Fragmentação de Espécies Intramoleculares por CID.....	47
4.1.3. Estudo de Espécies Intermoleculares.....	54
4.1.4. Fragmentação de Espécies Intermoleculares por ESI-MS/MS utilizando CID.....	58

4.1.5.	Fragmentação de Espécies Intermoleculares por MALDI-MS/MS utilizando CID.....	66
4.1.6.	Uso de Diferentes ALCs para Formação de Espécies Intermoleculares.....	70
4.2.	Varredura de Íon Precursor (PIS) para Identificação de Espécies Modificadas por ALCs.....	73
4.3.	Estudo de Fragmentação de Espécies Intermoleculares por IRMPD e ECD	84
4.3.1.	Formação de Espécies Intermoleculares para os Estudos de IRMPD e ECD	84
4.3.2.	Fragmentação de Espécies Intermoleculares por IRMPD	85
4.3.3.	Fragmentação de Espécies Intermoleculares por ECD	93
4.4.	Estudo de Mobilidade Iônica de Peptídeos Modificados por ALC.....	101
4.4.1.	Separação de Espécies Isoméricas do Tipo <i>Dead-end</i>	101
4.4.2.	Uso de Mobilidade Iônica para Separação Entre Peptídeos Modificados por ALCs e Peptídeos Lineares	108
5.	CONCLUSÕES	118
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ALC.....	Agente de Ligação Cruzada
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidróxi-cinâmico
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CRP	Cristalografia de Proteínas
Da	Dalton
DDA	Análise Dependente de Dados
DMF	Dimetilformamida
DSS	Dissuccinimidil Suberato
DTSSP.....	3,3-ditiobis [sulfosuccinimidilpropionato]
DTT	Ditiotreitól
ECD	Dissociação por Captura de Elétron
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
FT-ICR	Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier
HDX	Troca Hidrogênio-Deutério
IMS	Espectrometria de Mobilidade Iônica
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IRMPD	Dissociação Multifotônica por Infravermelho
LC (HPLC/UPLC)	Cromatografia Líquida (Alta/Ultra Performance)
MALDI	Ionização por Dessorção a Laser Auxiliada por Matriz
MS	Espectrometria de Massas
MS3D	Espectrometria de Massas Aplicada a Estrutura de Proteínas
NHS	<i>N</i> -hidróxisuccinimida
PTM	Modificações Pós-Traducionais
PDB.....	Protein Data Bank
Q-Tof	Quadrupolo-Tempo de Voo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAXS	Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecilsulfato de Sódio

TFA Ácido Trifluoracético
TW.....*Travelling Wave*
UV.....Ultra Violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de fragmentação observadas para as espécies intermoleculares utilizando MALDI e ESI como fontes de ionização.....	73
Tabela 2. Seção de choque para as espécies modificadas por BS3 do peptídeo TR20.	111
Tabela 3. Seção de choque para as espécies modificadas por BS3 do peptídeo LR16.....	111

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura de proteínas: (A) estrutura primária, (B) secundária, (C) terciária e (D) quaternária. 2
- Figura 2.** Estrutura de ALCs derivados de ésteres de N-hidróxisuccinimida (NHS) com diferentes tamanhos da cadeia espaçadora. Os mais comuns são os com $n = 3, 6$ ou 8 , que recebem as seguintes abreviaturas: DSG, DSS e DSSeb. 8
- Figura 3.** Representação esquemática de um experimento típico de ligação cruzada com análise por distância. 1) Reação da(s) proteína(s) alvo com o ALC desejado; 2) Formação de peptídeos modificados e convencionais por digestão enzimática; 3) Análise da mistura de peptídeos por LC-MS/MS. 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. 9
- Figura 4.** Formação de peptídeos modificados após a reação com ALC. No caso, um ALC derivado de éster de NHS foi utilizado, levando a formação das espécies *dead-end*, intramolecular ou intermolecular. 10
- Figura 5.** Ilustração do processo de dissociação induzida por colisão (CID). A energia cinética do íon precursor, após colisão com gás inerte, é convertida em energia interna e ocorre a fragmentação. 14
- Figura 6.** (A) Série de íons fragmentos baseada na cadeia peptídica: a/x , b/y e c/z ; (B) Mecanismo de fragmentação de um peptídeo duplamente protonado por CID, seguindo o modelo do próton móvel. Na primeira etapa ocorre a transferência do próton, seguido pela formação de um anel oxazolona e posterior clivagem da ligação peptídica (amida), levando a formação de íons b (carga no N-terminal) e y (carga no C-terminal) (modificado da ref. 84). 15
- Figura 7.** (A) Esquema de um espectrômetro de massas do tipo FT-ICR capaz de realizar experimentos de IRMPD. O precursor (peptídeo protonado) de interesse é aprisionado na cela de ICR e um laser infravermelho é introduzido na cela. O precursor adquire energia vibracional e há dissociação das ligações mais lábeis, fornecendo íons fragmentos b e y (mostrados em vermelho, B). 17
- Figura 8.** Proposta do mecanismo de fragmentação de proteínas e peptídeos por ECD^{101,102,104}. Após a captura do elétron, uma clivagem homolítica deve ocorrer. Embora não seja completamente compreendido, a dissociação em ECD, diferentes de CID, não ocorre na ligação peptídica (amida). 19
- Figura 9.** Espectro de CID (A) e ECD (B) do fator de crescimento humano (GHRF), a sequência do peptídeo, bem como a cobertura obtida por CID e ECD são ilustrados. A perda neutra de 64 Da refere-se ao hidrosulfonilmetano (CH_3SHO), proveniente de metionina oxidada e foi verificada apenas por CID. O espectro de ECD fornece uma cobertura sequencial do peptídeo muito superior ao CID¹¹⁰. 21

- Figura 10.** Esquema de uma cela de IMS convencional. Na entrada da cela de difusão (*drift tube*), os íons são submetidos a um campo elétrico baixo, que acelera os íons até o detector (ou um espectrômetro de massas). O gás presente na região de difusão esta sob pressão constante, que varia de 1 torr a pressão ambiente. Um íon que passa através do gás sofre considerável número de colisões. Íons maiores possuem maior seção de choque que íons menores, de modo que demoram mais para atravessar o *drift tube*, tornando possível a separação de íons com diferentes formas, tamanhos e carga..... 24
- Figura 11.** Esquema da cela de TWIMS no Synapt HDMS, (B) movimento dos íons após o pulso elétrico¹²⁰. Um campo elétrico elevado é aplicado em um segmento e arrastado sequencialmente pela cela, o que permite que os íons sejam empurrados e, devido ao choque com gás, temos a separação dos mesmos de acordo com sua mobilidade. Desse modo os íons se movem em pulsos, conforme a onda do campo elétrico elevado passa por estes..... 26
- Figura 12.** Guia de íons (*stacked ring ion guides* – SRIG) responsável pelo funcionamento da técnica de mobilidade iônica conhecida como *traveling wave* (TWIMS)..... 27
- Figura 13.** Esquema geral da reação dos peptídeos com ALC para a formação de espécies intra e intermoleculares. Partindo de um peptídeo linear, com sequência comum AC-xxRxxxKxxxRxxxKxxxR (A), onde x representa um número variável de qualquer aminoácido, exceto lisina (K) e arginina (R); após a reação com o ALC temos a formação de espécie intramolecular com N-terminal acetilado (B); seguida por digestão parcial com tripsina temos a formação de espécie intramolecular com N-terminal livre (C) e, finalmente, após digestão total com tripsina a formação de espécie intermolecular (D)..... 40
- Figura 14.** Espectros de MALDI-MS do peptídeo P3 intacto (A), após a reação com DSS (B) e digestão com tripsina por 1 hora (C) e 3 horas (D). Os íons assinalados com uma seta correspondem às espécies de interesse. Abaixo temos o esquema de reação com DSS e digestão enzimática para o peptídeo P3, e suas respectivas *m/z*. 42
- Figura 15.** Espectros de MALDI-MS do peptídeo P4 intacto (A), após a reação com DSS (B) e digestão com tripsina por 1 hora (C) e 3 horas (D). Os íons assinalados com uma seta correspondem às espécies de interesse. Abaixo temos o esquema de reação com DSS e digestão enzimática para o peptídeo P4, e suas respectivas *m/z*. 43
- Figura 16.** Espectros de MALDI-MS do peptídeo P5 intacto (A), após a reação com DSS (B) e digestão com tripsina por 1 hora (C) e 3 horas (D). Os íons assinalados com uma seta correspondem às espécies de interesse. Abaixo temos o esquema de reação com DSS e digestão enzimática para o peptídeo P5, e suas respectivas *m/z*. 44
- Figura 17.** Espectros de MALDI-MS do peptídeo PX intacto (A), após a reação com DSS (B) e digestão com tripsina por 1 hora (C) e 3 horas (D). Os íons assinalados com uma seta correspondem às espécies de interesse. Abaixo temos

o esquema de reação com DSS e digestão enzimática para o peptídeo PX, e suas respectivas <i>m/z</i>	45
Figura 18. Exemplo de possível coincidência de massas para o peptídeo P3 entre as espécies intermolecular e <i>dead-end</i>	46
Figura 19. Espectros de MALDI-MS/MS das espécies P3 (A), P4 (B) e P5 (C). As estruturas de cada uma dessas espécies e os íons atribuídos estão presentes em seus respectivos espectros. A formação dos íons fragmentos de <i>m/z</i> 222, 239 e 305 (circulados) está descrita no texto. Íons marcados com * são fragmentos internos.	49
Figura 20. Caminho de fragmentação presente em espécies intramoleculares onde a fragmentação ocorre entre a Lys e o ALC (no caso DSS). O peptídeo P3 foi utilizado como exemplo. Primeiro a fragmentação deve ocorrer na porção linear do peptídeo e, uma vez que atinge a porção cíclica, ocorre a clivagem entre a ligação DSS/Lys e fragmentação segue pela sequência do peptídeo, onde o DSS comporta-se como uma extensão da cadeia lateral da Lys.	50
Figura 21. Caminho de fragmentação presente em espécies intramoleculares onde a fragmentação ocorre entre a Lys e o resíduo adjacente (ao longo da cadeia peptídica). Nesse caso ambas Lys permanecem conectadas pelo DSS. O peptídeo P3 foi utilizado como exemplo. Temos a ciclização da Lys, levando ao anel tetrahidropiridina (representado por {K}). Esse caminho de fragmentação levou a identificação dos íons diagnósticos de espécies modificadas por DSS, de <i>m/z</i> 222,1; 239,2 e 305,2.	52
Figura 22. Espectro de MALDI-MS/MS da espécie intramolecular envolvendo uma Lys e o N-terminal do peptídeo PX.	53
Figura 23. Formação de espécies intermoleculares a partir dos peptídeos P1, P2, P3, P4, PX1 e PX2. As <i>m/z</i> ilustradas aqui são referentes ao uso do DSS como ALC.	55
Figura 24. Espectro de MALDI-MS dos peptídeos P1 (A), P2 (B), P3 (C), P4 (D) e PX(D). As setas indicam as <i>m/z</i> referente às espécies intermoleculares formadas a partir destes peptídeos.	56
Figura 25. Espectro de MALDI-MS do peptídeo PX, onde temos as espécies de <i>dead-end</i> formada pela hidrólise (<i>m/z</i> 1638,9) e após o ataque por Tris (<i>m/z</i> 1742,1).	57
Figura 26. Espectros anotados de ESI-MS/MS das espécies intermoleculares dos peptídeos P1 (<i>m/z</i> 539,9; [M+3H] ³⁺), P2 (<i>m/z</i> 592,6; [M+3H] ³⁺), P3 (<i>m/z</i> 787,9; [M+2H] ²⁺), P4 (<i>m/z</i> 928,9; [M+2H] ²⁺), PX1 (<i>m/z</i> 546,9; [M+3H] ³⁺) e PX2 (<i>m/z</i> 613,4; [M+2H] ²⁺).	61
Figura 27. Proposta de formação do anel tetrahidropiridina a partir do íon análogo ao imônio de Lys.	64
Figura 28. Formação de um íon fragmento cuja estrutura seria composta por dois anéis THPs separados pela cadeia espaçadora do ALC (as <i>m/z</i> referem-se ao uso	

de DSS) de m/z 305,2; a perda neutra de um anel THP (- 83 Da) leva a formação do íon de m/z 222,1..... 65

Figura 29. Espectros anotados de MALDI-MS/MS das espécies intermoleculares dos peptídeos P1 (m/z 1617,8; $[M+1H]^{1+}$), P2 (m/z 1775,9; $[M+1H]^{1+}$), P3 (m/z 1574,8; $[M+1H]^{1+}$), P4 (m/z 1857,0; $[M+1H]^{1+}$), PX1 (m/z 1638,9; $[M+1H]^{1+}$) e PX2 (m/z 1225,7; $[M+1H]^{1+}$)..... 69

Figura 30. Estrutura dos agentes de ligação cruzada (ALC): glutarato de disuccinimidila (DSG), suberado de disuccinimidila (DSS) e sebacato de disuccinimidila (DSSeb). 71

Figura 31. ESI-MS/MS da espécie intermolecular de P4, duplamente carregado, gerados a partir dos ALCs: DSSeb (m/z 942,9; A), DSS (m/z 928,9; B) e DSG (m/z 908,9; C). Íons marcados com “estrela” não contém o ALC em sua estrutura e possuem o mesma m/z nos três espectros. Íons marcados por triângulo apresentam m/z deslocado pois são oriundos dos diferentes (+28 para o DSSeb e -42 para o DSG, em relação ao DSS). 71

Figura 32. Região expandida dos espectros ilustrados da Figura 31 (P4 ESI-MS/MS). (A) íons diagnósticos formados quando utilizando DSSeb: m/z 250 (M1), 267 (M2) e 333 (M3); (B) íons diagnósticos quando utilizando DSS: m/z 222 (M1), 239 (M2) e 305 (M3); (C) íons diagnósticos quando utilizando DSG: m/z 180 (M1), 197 (M2) e 263 (M3). 72

Figura 33. Representação esquemática de experimentos de MS/MS..... 74

Figura 34. Estrutura dos íons diagnósticos gerados a partir do DSS (222,1494; 239,1759 e 305,2229). Os análogos, gerados a partir do DSG apresentam três grupos $-CH_2-$ a menos (m/z 180,1025; 197,1290 e 263,1760). Os análogos, gerados a partir do DSSeb apresentam dois grupos $-CH_2-$ a mais (m/z 250,1807; 267,2072 e 333,2542). 76

Figura 35. Cromatograma da amostra proveniente da reação entre o peptídeo PX e DSS (após digestão enzimática) com baixa energia de colisão (sem fragmentação). As espécies mais intensas estão indicadas. 77

Figura 36. Cromatograma de íons selecionados da amostra PX com alta energia de colisão, indicando a presença dos íons de m/z 222,1494 (A), 239,1759 (B) e 305,2229 (C) utilizando erro de 0,02 Da. 77

Figura 37. Cromatogramas adquiridos com baixa energia de colisão para a hemoglobina digerida com (linha verde) e sem PX (linha vermelha). 79

Figura 38. Cromatogramas de íons selecionados com alta energia de colisão para as amostras contendo hemoglobina + PX (traço superior) e somente hemoglobina (traço inferior), indicando a presença dos íons diagnósticos, de m/z 222,1 (A); 239,1 (B) e 305,2 (C). 79

Figura 39. Cromatogramas com alta energia de colisão para a lisozima controle (sem DSS, traço inferior) e experimento (com DSS, traço superior), dos íons diagnósticos de m/z 222,1 (A); 239,1 (B) e 305,2 (C). 80

- Figura 40.** (A) Cromatogramas de alta energia de colisão de íons selecionados para as m/z 222,1494 e 239,1759 ($\pm 0,02$ Da), em vermelho e verde respectivamente. O retângulo destaca o pico cromatográfico referente ao espectro de MS (baixa energia de colisão) apresentado em (B). Em (C) temos o espectro de fragmentação anotado do íon de m/z 381,7, referente ao peptídeo N-terminal da lisozima modificado com DSS (*dead-end*). Em (D), ampliação do espectro (C), destacando a presença dos íons marcadores..... 81
- Figura 41.** Fluxograma de interpretação de dados obtidos de um experimento de PIS para detecção de peptídeos contendo ALC derivados de diésteres de NHS (os valores de m/z presentes referem-se ao DSS, mas caso outro ALC seja utilizado, é só usar o m/z do ALC empregado)..... 83
- Figura 42.** Formação de espécies intermoleculares a partir de dois peptídeos e ALC para estudos de IRMPD e ECD..... 84
- Figura 43.** Espectro de IRMPD do estado de carga $[M+5H]^{5+}$ das espécies formadas entre os peptídeos P6 e P7 utilizando os três ALCs: DSG (A, m/z 657,75), DSS (B, m/z 666,16) e DSSeb (C, m/z 671,77), da região de m/z 680 até 1150. 87
- Figura 44.** Cobertura obtida por IRMPD para o estado de carga $[M+5H]^{5+}$ da espécie P6-ALC-P7 utilizando DSG (linha tracejada), DSS (linha preta) e DSSeb (linha cinza). 87
- Figura 45.** Espectros de IRMPD da espécie P8-DSS-P10 com três cargas (m/z 883,16) em (A) de m/z 175 a 975 e (B) de m/z 880 a 1190; e com quatro cargas (m/z 662,63) em (C) de m/z 175 a 710 e (D) de m/z 720 a 1070. 90
- Figura 46.** Cobertura obtida para P8-DSS-P10 com três (traços cinza) e quatro cargas (traços pretos). 91
- Figura 47.** Espectro de IRMPD e coberturas obtidas para estado de carga $[M+4H]^{4+}$ das espécies com N-terminal livre das espécies P6-DSS-P7 (A), P6-DSS-P8 (B) e P7-DSS-P8 (C). 93
- Figura 48.** Espectros de ECD dos precursores com cinco cargas das espécies intermoleculares P6-DSG-P7 (A), P6-DSS-P7 (B) e P6-DSSeb-P7 (C). Em todos os casos, o íon mais intenso é o precursor, seguido pela espécie $[M+nH]^{(n-1)+}$ 94
- Figura 49.** Espectro atribuído de ECD para a espécie P6-DSS-P7: de m/z 150 a 660 (A), 670 a 790 (B) e 1000 a 1610 (C). 96
- Figura 50.** Cobertura obtida para o precursor com cinco cargas, da espécie formada entre P6 e P7, com os três ALC: DSG (linha tracejada), DSS (linha preta) e DSSeb (linha cinza). 96
- Figura 51.** Espectros atribuídos e as respectivas coberturas para as espécies P6-DSS-P7 (A), P6-DSS-P8 (B) e P7-DSS-P8 (C) com N-terminal livre. 98
- Figura 52.** Espectros anotados de ECD da espécie P8-DSSeb-P10 com três (A, m/z 892,5) e quatro (B, m/z 669,6) cargas. 99

Figura 53. Cobertura obtida para P8-DSSeb-P10 com três (traços cinza) e quarto cargas (traços pretos). 99

Figura 54. Esquema do instrumento Synaot HDMS utilizado nos experimentos de separação por mobilidade iônica de isômeros do tipo *dead-end*. Na ampliação é mostrada a cela de mobilidade (IMS), localizada entre o quadrupolo e o Tof. Logo após o quadrupolo temos a cela responsável pelo aprisionamento, seguida pela cela de IMS e posteriormente a cela de transferência. Tanto a cela de aprisionamento quanto a cela de transferência possibilitam a fragmentação de íons (ambas são preenchidas com Ar, enquanto que a cela de IMS é preenchida com N₂). 101

Figura 55. Distribuição por tempo de chegada (ATD) e espectros de íons produtos dos isômeros *dead-end* do peptídeo P11. (A) ATD total, em cinza temos as regiões acumuladas para fornecer os espectros de íons produtos presentes (C) e (D). Em (B) temos os ATDs extraídos dos íons fragmentos y_5 (não modificados, reação com DSS ocorreu na primeira lisina) e y_5^* (modificado, indicando que a reação ocorreu na segunda lisina). Em (C) temos o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na segunda lisina; e em (D) o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na primeira lisina. 104

Figura 56. Distribuição por tempo de chegada (ATD) e espectros de íons produtos dos isômeros *dead-end* do peptídeo P1. (A) ATD total, em cinza temos as regiões acumuladas para fornecer os espectros de íons produtos presentes (C) e (D). Em (B) temos os ATDs extraídos dos íons fragmentos y_6 (não modificados, reação com DSS ocorreu na primeira lisina) e y_6^* (modificado, indicando que a reação ocorreu na segunda lisina). Em (C) temos o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na segunda lisina; e em (D) o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na primeira lisina. 105

Figura 57. Distribuição por tempo de chegada (ATD) e espectros de íons produtos dos isômeros *dead-end* do peptídeo PX. (A) ATD total, em cinza temos as regiões acumuladas para fornecer os espectros de íons produtos presentes (C) e (D). Em (B) temos os ATDs extraídos dos íons fragmentos y_5 (não modificados, reação com DSS ocorreu no N-terminal ou na primeira lisina) e y_5^* (modificado, indicando que a reação ocorreu na segunda lisina). Em (C) temos o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na segunda lisina; e em (D) o espectro de íons produtos anotado dos isômeros onde a modificação ocorreu no N-terminal ou na primeira lisina, de modo que não foi possível observar separação entre esse dois isômeros..... 107

Figura 58. ATDs referentes às correntes iônicas dos íons y_6 , proveniente do isômero onde a modificação ocorreu na primeira lisina e y_6^* , onde a modificação ocorreu na segunda lisina, nas três condições (três diferentes pHs). Com base nos ATDs destes dois íons, quando mantemos fixa a intensidade do íon y_6 , verificamos que há uma diminuição, em relação a ela, do íon y_6^* conforme há um aumento do pH..... 108

- Figura 59.** Obtenção de espécies modificadas e lineares para os peptídeos LR16 e TR20. O ALC BS3 possui a mesma cadeia espaçadora do DSS. 110
- Figura 60.** Gráficos de seções de choque obtidas para cada um dos estados de carga das espécies provenientes dos peptídeos TR20 (A) e LR16 (B). As espécies estão atribuídas por diferentes cores em cada gráfico..... 112
- Figura 61.** Gráficos de mobilidade iônica VS. m/z das amostras XL, rica em espécies intermoleculares (A), Ecoli, digesto trípico de um extrato de *E. coli* (B) e a mistura Ecoli:XL (C). Para a amostra Ecoli foram adicionados manualmente linhas para ilustrar a presença de nuvens referentes a espécies monocarregadas (1+), dicarregadas (2+) e com três ou mais cargas (3+ ou mais)..... 115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteínas

Proteínas constituem um dos tipos de macromoléculas biológicas mais abundantes, versáteis e complexas. Sua complexidade se deve ao fato de serem constituídas por diferentes aminoácidos, que podem ou não estar modificados, além de apresentarem uma ampla faixa de tamanho, variando de poucos kDa a alguns MDa, bem como adquirir diferentes estruturas. Em decorrência dessa diversidade, são atribuídas a essas macromoléculas as mais diversas funções, tais como catálise, transporte, estrutura, defesa, dentre outras. De quase todas as proteínas a função está diretamente relacionada com sua estrutura, de modo que se uma proteína perder sua estrutura, muito provavelmente também perderá sua função.¹

A cadeia polipeptídica de uma proteína enovela-se de modo que, normalmente, resíduos hidrofóbicos localizam-se no interior, enquanto resíduos hidrofílicos situam-se na superfície da proteína. O modo com que as ligações de hidrogênio da cadeia polipeptídica interagem ditam como será o enovelamento de uma proteína, de modo que podem gerar hélices (α , π ou poliprolina), quando interação ocorre entre resíduos vizinhos; ou folhas β , quando a interação entre os resíduos da cadeia peptídica ocorrem à distância. Esses elementos conformacionais foram propostos por Pauling e Corey² e são tidos como os blocos de construção de proteínas sendo, em média, responsável por dois terços das estruturas de proteínas conhecidas. Nos anos 50, Linderstrøm-Lang e Schellman³ perceberam que estruturas de proteínas são compostas de forma hierárquica e propuseram quatro níveis de organização (complexidade): (i) estrutura primária, referente à sequência de aminoácidos; (ii) estrutura secundária, baseada nas ligações de hidrogênio da cadeia peptídica, que dão origem à hélices ou folhas, como já descrito; (iii) estrutura terciária, referente ao enovelamento da proteína, devido às interações entre as cadeias laterais após a formação da estrutura secundária; e (iv) em alguns casos temos ainda a

formação de estrutura quaternária, que corresponde a agregação de cadeias polipeptídicas distintas, de modo a formar uma estrutura supramolecular. Na Figura 1 temos uma ilustração representativa das estruturas primária (A), secundária (B), terciária (C) e quaternária (D) da hemoglobina humana.

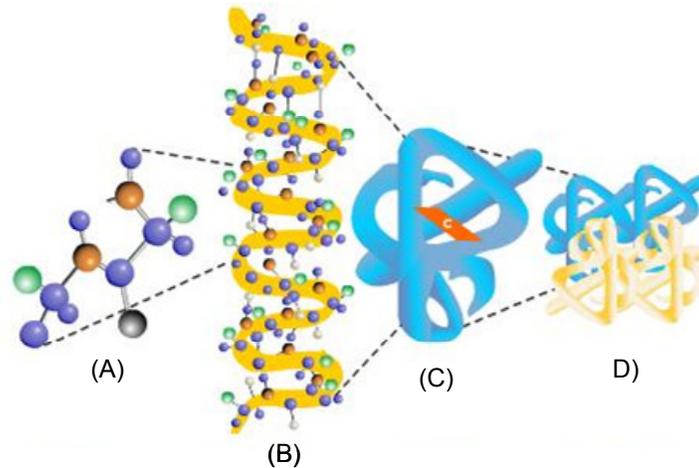


Figura 1. Ilustração representativa das estruturas primária (A), secundária (B), terciária (C) e quaternária (D) da hemoglobina humana (modificado de ref. 3).

As técnicas de caracterização estrutural de proteínas e complexos protéicos disponíveis atualmente podem ser divididas nos seguintes grupos: técnicas de estrutura primária e terciária, esta última classificada em alta resolução, média resolução, baixa resolução/sonda e computacionais⁴. Técnicas de caracterização de estrutura primária não fornecem nenhum tipo de informação espacial, limitando-se a identificação de proteínas. Nesta classe a espectrometria de massas (MS) a principal ferramenta para identificação de proteínas. As técnicas de baixa resolução/sonda englobam as espectroscopias, onde a resposta é determinada pela presença de certa característica estrutural da proteína. Essa classe engloba as técnicas de Dicroísmo Circular (CD), Fluorescência de Emissão, Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência (FRET) dentre outras. Embora essas técnicas sejam em geral sensíveis, rápidas, relativamente simples e de fácil acesso, a resposta obtida em geral é insuficiente para caracterização mais profunda do sistema. Como técnicas de média resolução, temos aquelas que fornecem informações gerais da proteína ou complexo protéico, tais como posição e orientação dos

componentes, destacando-se as microscopias e o espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Em geral tais técnicas são bem restritas a alguns usuários tanto pela necessidade de instrumentação muito específica e dispendiosa quanto pelo alto grau de dificuldade de interpretação de dados.⁵

Atualmente existem duas técnicas estabelecidas para determinação estrutural de proteínas com alta resolução (resolução atômica): Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cristalografia de Proteínas (CRP). Apesar do grande sucesso dessas técnicas, elas apresentam algumas limitações que impedem seu uso irrestrito para qualquer tipo de proteína, dentre as quais se destacam a necessidade de uma grande quantidade de amostra (vários miligramas) com alto grau de pureza. No caso de RMN, há ainda a necessidade de a amostra ser estável em algum dos tampões que não interfiram na análise por um longo intervalo de tempo (dias a semanas) a temperatura ambiente. Além disso, as técnicas disponíveis atualmente restringem o tamanho máximo da amostra a aproximadamente 50 kDa. Devido à necessidade de meios de cultura enriquecidos com diferentes isótopos, trata-se de uma metodologia cara e tanto o experimento quanto a análise dos dados são processos longos e pouco automatizados. A CRP por sua vez requer que a amostra esteja na forma de monocristal, o que constitui a principal limitação da técnica. Além disso, a estrutura obtida por CRP é uma estrutura estática e não necessariamente representativa do sistema em solução.^{6,7,8}

1.2. Caracterização Estrutural de Proteínas por Técnicas Baseadas em Espectrometria de Massas

No fim da década de 80, com o desenvolvimento das técnicas de ionização de ESI (*electrospray*)⁹ e MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionization*)¹⁰, a análise de peptídeos e proteínas por MS deu um grande salto. Tais técnicas permitem a ionização dessas macromoléculas com alta eficiência e sem a necessidade de derivatização.¹¹ Vale ressaltar que o desenvolvimento dessas técnicas contribuiu significativamente para a melhoria

dos analisadores de m/z , como dos tipos *ion trap*, Q-ToF (quadrupolo – tempo de voo), Tof-Tof, FT-ICR e Orbitrap.¹² Desse modo, esse período presenciou uma grande quantidade de artigos explorando os diferentes tipos de informação que poderiam ser obtidos pela análise de proteínas e peptídeos por MS. O uso de MS para análise estrutural de proteínas, principalmente devido às suas vantagens intrínsecas, como alta sensibilidade, rapidez de análise e especificidade.

Alguns anos após o desenvolvimento das técnicas de ionização de ESI e MALDI foi possível observar que essas técnicas eram suficientemente brandas para a manutenção, ao menos em parte, da estrutura de complexos protéicos em fase gasosa.^{13,14,15} Inicialmente, os primeiros trabalhos mostravam que em muitos casos, interações não covalentes proteína-ligante podiam ser mantidas em fase gasosa desde que o processo de ionização fosse realizado em condições controladas.¹⁶ Apesar dos primeiros resultados animadores, esse método sofria de grandes limitações instrumentais, uma vez que complexos maiores tendem a se dissociar facilmente devido às grandes diferenças de pressão às quais são submetidos na análise por MS; além disso, detectores convencionais apresentavam limitações na faixa de m/z que impediam a detecção dessas espécies. O desenvolvimento de instrumentação dedicada a essa aplicação contribuiu significativamente para o estudo de proteínas grandes e complexos mais lábeis.¹⁷ *Macromolecular MS*, denominação proposta para esses experimentos, tem sido atualmente utilizada para determinação da estequiometria de complexos¹⁸, determinação de força de ligação das espécies constituintes de complexos^{19,20}, análise de mudanças conformacionais promovidas pela interação com ligantes²¹, cinética de enovelamento e desenovelamento^{22,23} e determinação da topologia^{24,25}. A principal limitação desses experimentos é a necessidade de instrumentos adaptados, não comerciais, cujas características dificultam sua utilização para outros fins.

Um método de caracterização estrutural de proteínas é a Troca Hidrogênio/Deutério (HDX)^{26,27,28}. HDX baseia-se no fato de que quando proteínas são solubilizadas em excesso de solvente deuterado, os hidrogênios

lábéis da proteína trocam com o deutério do solvente. Os hidrogênios das cadeias laterais dos aminoácidos que possuam grupos SH, OH e NH trocam muito rapidamente e, portanto, não permitem determinação de sua cinética de troca por MS. Os H das ligações peptídicas (amidas) da cadeia principal da proteína, por sua vez, apresentam uma faixa de 10^8 ordens de grandeza de diferença de velocidade de troca, dependendo do perfil de ligações de hidrogênio e, principalmente, do grau de exposição desses átomos ao solvente²⁷. Após o experimento de troca, que deve ser realizado por diferentes intervalos de tempo para permitir o cálculo da cinética, o pH do meio reacional é alterado para 2-3 e a temperatura para 0°C de modo a evitar a troca reversa. Análises por MS podem ser realizadas tanto para a proteína ou complexo protéico intacto, com intuito de determinar o nível de incorporação de deutério, bem como na análise dos peptídeos, após digestão enzimática, com o objetivo de determinar a cinética de troca em cada uma das regiões da proteína. HDX requer assim experimentos muito cuidadosos para evitar artefatos. Como descrito anteriormente, para diminuir a taxa de troca reversa, após a reação deve-se abaixar o pH e a temperatura. Essas condições são incompatíveis com a grande maioria das enzimas, sendo que atualmente a única utilizada em experimentos desse tipo é a pepsina. Essa enzima apresenta baixa especificidade e eficiência no pH utilizado, o que dificulta a identificação dos peptídeos obtidos por MS. Apesar das dificuldades apresentadas, HDX tem sido aplicada com relativo sucesso para o estudo de enovelamento e estabilidade de proteínas^{29,30}, mudanças conformacionais mediante interação com ligantes^{31,32} e no estudo de interações proteína-proteína³³ devido à atratividade de MS caracterização de proteínas.

Na última década duas outras técnicas de caracterização estrutural de proteínas e complexos protéicos baseadas em MS vêm recebendo grande destaque. Tratam-se das técnicas conhecidas como *Footprinting* e *Cross-linking* (ligação cruzada); essas técnicas baseiam-se em modificações químicas nas cadeias laterais dos resíduos de uma proteína, seja por radicais hidroxila, no caso de *footprinting* ou por agentes de ligação cruzada no caso de *cross-linking*.

O termo *footprinting* refere-se a ensaios que analisam mudanças estruturais em macromoléculas por meio da acessibilidade do solvente a cadeia principal ou cadeias laterais, por meio de agentes químicos clivagem enzimática, ou modificação de reações^{34,35}. Dentro desse grupo, cabe destacar a importância que radicais hidroxilas vêm recebendo nos últimos anos. Esses radicais apresentam reatividade frente à cadeia lateral dos aminoácidos de uma proteína, levando a modificação dessas cadeias por ligações covalentes³⁶. De modo simplificado, um experimento típico de *footprinting* consiste na exposição, tanto de uma proteína isolada quanto do complexo proteína-ligante, aos radicais hidroxilas por diferentes intervalos de tempo. As amostras são submetidas a digestão enzimática e analisadas por MS. Análises do tipo LC-MS/MS permitem identificar os sítios de oxidação, enquanto análises de LC-MS são utilizadas para quantificar a oxidação. Métodos computacionais podem ser subsequentemente utilizados para a construção de modelos tridimensionais do complexo³⁷. O método de *footprinting* com geração de radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) por meio de diferentes fontes de radiação tem permitido realizar estudos relacionados à estrutura de proteínas em solução³⁸ e o seu desenovelamento^{39,40}.

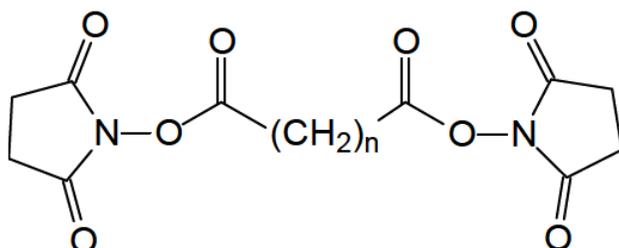
1.3. Ligação Cruzada e Espectrometria de Massas

O fenômeno de ligação cruzada (*cross-linking*) refere-se à união de duas espécies através da formação de uma ligação covalente, muitas vezes realizadas por intermédio de um agente de ligação cruzada (ALC). As espécies envolvidas em experimentos de ligação cruzada podem representar diferentes classes químicas, variando de proteínas e ácidos nucleicos a partículas sólidas, ou ainda diferentes regiões da mesma espécie como, por exemplo, ligação entre dois resíduos de uma mesma proteína⁴¹. Talvez o tipo de ligação cruzada mais comum presente em proteínas seja a formação de ligação de dissulfeto entre resíduos de cisteína. Entretanto, quando temos uma proteína ou complexo proteico como alvo, o mais interessante é a realização de experimentos de ligação cruzada mediados por ALCs. Além disso, as interações de complexos

não-covalentes são em geral muito fracas e, desse modo, são facilmente dissociadas, o que torna sua análise muito difícil. Assim, do ponto de vista analítico, é muito interessante a estabilização desses complexos mediante a formação de ligações covalentes, uma vez que isso facilita a posterior purificação e caracterização do mesmo em condições mais adequadas, mas que ainda retém as informações espaciais desejadas. As informações obtidas podem então ser utilizadas como base para interrogação de um grande número de informações importantes desses complexos⁴².

ALCs são compostos orgânicos multifuncionais, contendo em geral dois ou três grupos reativos, unidos por uma cadeia espaçadora de comprimento variável. No caso de proteínas, os ALC são capazes de ligar covalentemente a cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, de acordo com suas respectivas especificidades⁴³. Os grupos reativos podem ser idênticos (homobifuncionais) ou distintos (heterobifuncionais), permitindo maior versatilidade na especificidade de cada reagente. Os ALCs reagem com 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-hidroxisuccinimida (NHS) e imidoésteres; frente a ácidos carboxílicos, como carbodiimidias; frente a alcoóis, como isocianatos; e específicos para tióis, como maleimidias⁴¹. Dentre os ALCs disponíveis atualmente, os de maior destaque são aqueles reativos frente a aminas primárias. Isso se deve principalmente a alta ocorrência de grupos aminos em proteínas, sejam em resíduos de lisina ou no N-terminal da proteína. Os derivados de NHS são os ALCs mais utilizados atualmente devido aos rendimentos relativamente altos das reações e, principalmente, à facilidade de sua obtenção, bastando para isso reagir um ácido carboxílico com o NHS⁴⁴. Comercialmente existe uma série de ALCs homobifuncionais homólogos, diferenciando-se pelo tamanho da cadeia espaçadora, o que permite um estudo mais refinado da estrutura da proteína ou complexo protéico, uma vez que se conhecendo o comprimento da cadeia espaçadora pode-se inferir com mais precisão a real distância entre os dois

grupos reativos. Na Figura 2 temos a estrutura de alguns dos ALCs derivados de ésteres de NHS comumente utilizados em experimentos de ligação cruzada de proteínas, com as respectivas distâncias máximas que estes ALC podem proporcionar reações entre lisinas.



n	Nome	Distância (Å)
3	Glutarato de Dissuccinimidila (DSG)	7,7
5	Pimelato de Dissuccinimidila	-
6	Suberato de Dissuccinimidila (DSS)	11,4
8	Sebacato de Dissuccinimidila (DSSeb)	13,0

Figura 2. Estrutura de ALCs derivados de ésteres de N-hidróxissuccinimida (NHS) com diferentes tamanhos da cadeia alifática. Os mais comuns são os com $n = 3, 6$ ou 8 , que recebem as seguintes abreviaturas: DSG, DSS e DSSeb. As distâncias (Å) mencionadas são baseadas de acordo com o fornecedor de cada ALC.

Em 2000, Young e colaboradores propuseram pela primeira vez a utilização conjunta de ligação cruzada e MS para a obtenção de informações estruturais de proteínas. Tais informações seriam provenientes do tamanho da cadeia espaçadora do reagente utilizado, onde a distância máxima entre dois resíduos ligados pelo ALC corresponderia ao comprimento do reagente. Caso o número dessas restrições espaciais fosse igual a $N/10$ (onde N é o número de resíduos da proteína), seria possível determinar o tipo de enovelamento por meio de métodos computacionais. Desse modo, foi proposta pela primeira vez a utilização de um método rápido e sensível baseado em ligação cruzada e MS para a obtenção de informações estruturais de proteínas⁴⁵.

Em experimentos de ligação cruzada e espectrometria de massas envolvendo proteínas (Figura 3), estas são submetidas à reação com um determinado agente de ligação cruzada (ALC, representado em vermelho na etapa **1**), seguida por digestão enzimática (**2**) e os peptídeos gerados são então

analisados pela técnica de espectrometria de massas (3)⁴³. Os peptídeos resultantes são então analisados por MS, sendo que a partir dessa etapa as análises realizadas são dependentes do tipo de informação desejada: pode-se simplesmente identificar as proteínas presentes em um complexo ou até a identificação exata de quais peptídeos estão ligados entre si em uma proteína ou complexo protéico. Caso seja desejado, os peptídeos modificados pelo ALC são então identificados e um mapa de ligações cruzadas é obtido (4); com base nas restrições de distância (dado pelo ALC utilizado) é possível selecionar modelos estruturais compatíveis para a proteína alvo (5).

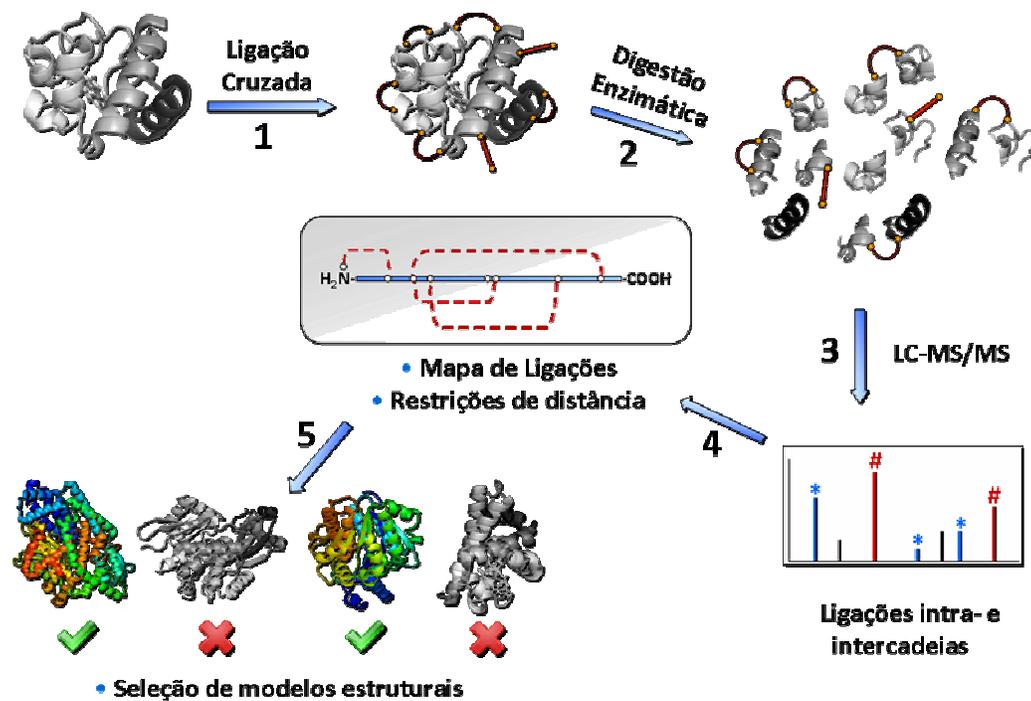


Figura 3. Representação esquemática de um experimento típico de ligação cruzada com análise por distância. 1) Reação da(s) proteína(s) alvo com o ALC desejado; 2) Formação de peptídeos modificados e convencionais por digestão enzimática; 3) Análise da mistura de peptídeos por LC-MS/MS. 4) Agrupamento 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 união das técnicas de ligação cruzada e MS têm sido extensivamente utilizada nos últimos anos visando à obtenção de dados estruturais como determinação do tipo de enovelamento de proteínas^{46,47,48,49}, identificação de parceiros de interação^{50,51,52}, monitoramento de mudanças conformacionais

mediante interação com ligante^{53,54,55}, determinação de superfície de interações em complexos protéicos^{56,57,58,59,60,61,62} e finalmente na determinação de acessibilidade ao solvente^{63,64,65,66}. Em todos esses estudos a detecção e identificação de peptídeos modificados pelo ALC é uma etapa crítica.

Após a reação com o ALC e digestão enzimática, diferentes tipos de peptídeos modificados pelo ALC podem ser formados: i) espécies hidrolisadas ou dead-end, onde somente um dos grupos reativos reagiu com a proteína, enquanto o outro sofreu hidrólise; ii) ligação cruzada intramolecular, onde os dois resíduos de aminoácidos ligados encontram-se na mesma peptídeo; e iii) ligação cruzada intermolecular, onde os resíduos ligados encontram-se em cadeias peptídicas distintas. A Figura 4 ilustra a formação de dessas espécies após a reação com ALC derivado de éster de NHS.

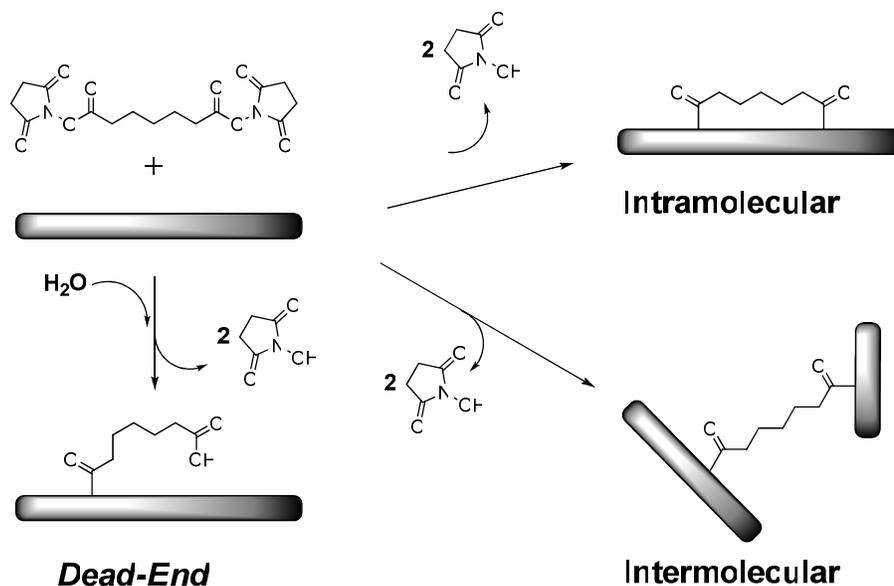


Figura 4. Formação de peptídeos modificados após a reação com ALC. No caso, um ALC derivado de éster de NHS foi utilizado, levando a formação das espécies *dead-end*, intramolecular ou intermolecular.

Cada uma dessas espécies fornece informações úteis sobre a estrutura da proteína (ou complexo), sendo que as espécies do tipo dead-end trazem informação de que o sítio reativo está exposto ao solvente, além de não deve haver nenhum outro sítio reativo próximo do que já reagiu com o ALC; as

espécies intramoleculares trazem a informação de que dois resíduos próximos na estrutura primária também se localizam dentro da distância do ALC utilizado na estrutura terciária e, finalmente, as espécies intermoleculares que nos dizem que dois resíduos estão próximos na estrutura terciária de uma proteína mesmo sendo de regiões distantes em sua estrutura primária ou, ainda, no caso de um complexo protéico, nos dizem que resíduos de duas proteínas distintas encontram a certa distância quando estas formam o complexo de interesse. Esta última espécie é, sem dúvida, a que fornece informações de maior relevância, seja para uma única proteína ou, principalmente, para complexos protéicos onde, com base nessas espécies, é possível verificar quais regiões de determinada proteína estão próximas de regiões das outras proteínas desse complexo.

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 é a detecção e correta identificação dos peptídeos modificados pelo ALC, uma vez que os mesmos sempre estão presentes em quantidades muito reduzidas na mistura de peptídeos^{43,67}. Várias estratégias têm sido desenvolvidas visando contornar esse problema, como o uso de ALC marcados isotopicamente^{68,69,70}, ALC modificados com grupos específicos visando purificação por cromatografia de afinidade dos peptídeos modificados^{71,72}, ALC cliváveis visando facilitar a detecção dos peptídeos modificados,^{73,74,75} expressão de proteínas alvo marcadas isotopicamente com ^{14}N ^{76,77} e digestão enzimática em água marcada com ^{18}O ^{78,79,80}. 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, possibilitando a identificação dos peptídeos modificados pela diferença de massa proporcionada pela marcação isotópica. Todos esses métodos, no entanto, necessitam de etapas adicionais para facilitar a identificação dos peptídeos modificados por ALC, o que deve acarretar em perda de amostra, o que, como dito anteriormente, é um problema grave, uma vez que os peptídeos

modificados já se encontram em quantidades muito reduzidas em relação aos peptídeos convencionais.

De modo geral, toda metodologia utilizada para identificação de peptídeos modificados por ALC é baseada na fragmentação destes peptídeos. Desse modo, uma compreensão correta sobre a fragmentação desses peptídeos é de importância fundamental para que peptídeos modificados por ALC sejam identificados corretamente, além de possibilitar o desenvolvimento de metodologias baseadas na fragmentação desses peptídeos que facilitem a identificação em larga escala. Em 2003, foi proposta pela primeira vez a possibilidade de implementação de uma ferramenta de bioinformática capaz de interpretar os dados de experimentos de MS3D automaticamente⁹¹. O desenvolvimento dessas ferramentas seria extremamente interessante, uma vez que aumentaria consideravelmente a velocidade de análise de dados e permitiria desse modo a elucidação de inúmeras estruturas em curto intervalo de tempo. Essa ferramenta foi dividida em duas partes, ASAP e MS2Assign. Enquanto o ASAP seria responsável pela atribuição dos peptídeos modificados baseado em dados de MS, o MS2Assign seria utilizado para validar essas identificações pelos dados de fragmentação. Entretanto, nenhum espectro de fragmentação apresentado continha as espécies propostas, sendo estes dominados pela presença de íons do tipo **y** e **b** (a formação desses íons será discutida posteriormente). Posteriormente, o mesmo grupo realizou um estudo sistemático de fragmentação de peptídeos contendo diferentes ALCs derivados de ésteres de NHS. Para realizar esses estudos, foram utilizados peptídeos contendo múltiplas repetições de um aminoácido (A ou G), contendo uma ou duas lisinas (para o estudo de espécies inter ou intramoleculares, respectivamente) e o N-terminal acetilado. A acetilação do N-terminal foi realizada para bloquear esse sítio de reação com o ALC, dirigindo a reação somente à lisina. Isso evitaria a formação de espécies isóbaras que impediriam o estudo de fragmentação dos peptídeos de interesse. Entretanto, a acetilação do N-terminal de peptídeos deve alterar significativamente o perfil de fragmentação dessas espécies, visto que essa modificação exclui um sítio de protonação da molécula. Além disso, a

utilização de seqüências baseadas na repetição de aminoácidos em muitos casos levou a formação de fragmentos isóbaros, de modo que suas estruturas não puderam ser atribuídas. Em vista disso, os mecanismos de fragmentação desses peptídeos não poderiam ser aplicados em experimentos de MS3D, onde proteínas com seqüências aleatórias são modificadas e posteriormente digeridas levando a formação de peptídeos trípticos.

1.4. Análise de Peptídeos por Dissociação Induzida por Colisão - CID

A fragmentação de peptídeos por espectrometria de massas é utilizada rotineiramente para identificação de proteínas. Esse processo é comumente realizado por meio de dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation* – CID)^{81,82,83}. Apesar de outras metodologias para a fragmentação de peptídeos terem sido desenvolvidas, tais como dissociação por captura de elétrons (*electron capture dissociation* - ECD) e dissociação multifotônica por infravermelho (*infrared multiphoton dissociation* – IRMPD), que serão discutidas nas próximas seções, CID é sem dúvida o método mais amplamente empregado, além de ser o de maior disponibilidade em espectrômetros de massas disponíveis comercialmente. Neste processo de CID, os peptídeos são inicialmente introduzidos em uma região de vácuo do espectrômetro de massas por meio dos processos de *electrospray* ou MALDI. Usando uma descrição cabível para a maior parte dos equipamentos comercialmente disponíveis, os peptídeos protonados de interesse são selecionados em um primeiro analisador de m/z e acelerados para uma região do espectrômetro preenchida com um gás inerte (geralmente hélio, argônio ou nitrogênio) proporcionando, assim, a colisão entre os íons e as moléculas do gás inerte. Como resultado, a energia cinética transferida em cada colisão é convertida em energia interna; essa energia interna é distribuída pelas ligações do íon e ocorre a fragmentação (processo é ilustrado na Figura 5).

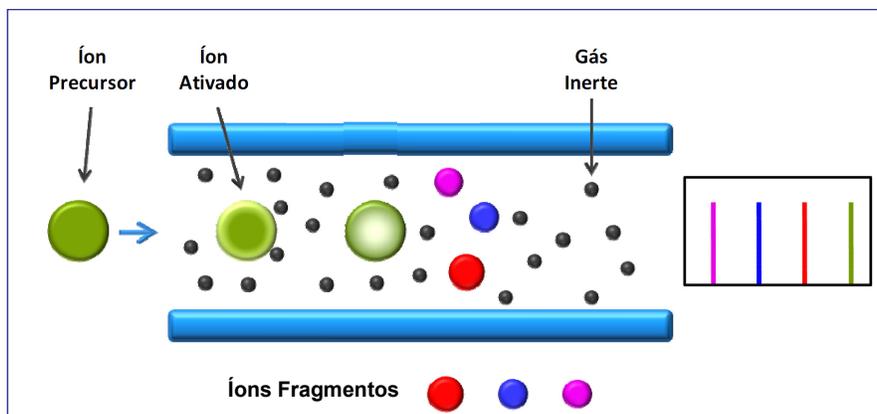


Figura 5. Ilustração do processo de dissociação induzida por colisão (CID). A energia cinética do íon precursor, após colisão com gás inerte, é convertida em energia interna e ocorre a fragmentação.

Para explicar a fragmentação de peptídeos, Wysocki e colaboradores propuseram o modelo do próton móvel⁸⁴, que descreve como a energia interna adquirida induz a transferência dos prótons em cada peptídeo protonado, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por consequência, induzindo a formação de íons fragmentos⁸⁵, que são classificados como íons que retêm a carga (próton) no lado N-terminal, gerando fragmentos **a**, **-b** e **-c**, dependendo da ligação que é fragmentada; e íons que retêm a carga (próton) na região C-terminal, gerando os fragmentos **-x**, **-y** e **-z**, dependendo da ligação que é fragmentada, segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann⁸⁶. As séries de íons fragmentos descritos para peptídeos lineares está ilustrada na Figura 6A. Considerando-se que as ligações peptídicas (amida) são as mais lábeis, espera-se que a formação do par de fragmentos **-b/-y** seja mais freqüente em experimentos de CID que os demais pares de fragmentos, facilitando a interpretação dos espectros. A Figura 6B ilustra como o modelo do próton deve ocorrer para um peptídeo duplamente protonado em experimentos de CID, levando à formação de íons **b** ou **y**. As etapas envolvidas no processo envolvem a transferência do próton, seguida pela formação de um anel oxazolona e posterior clivagem da ligação peptídica (amida), levando a formação de íons **b** (carga no N-terminal) e **y** (carga no C-terminal).

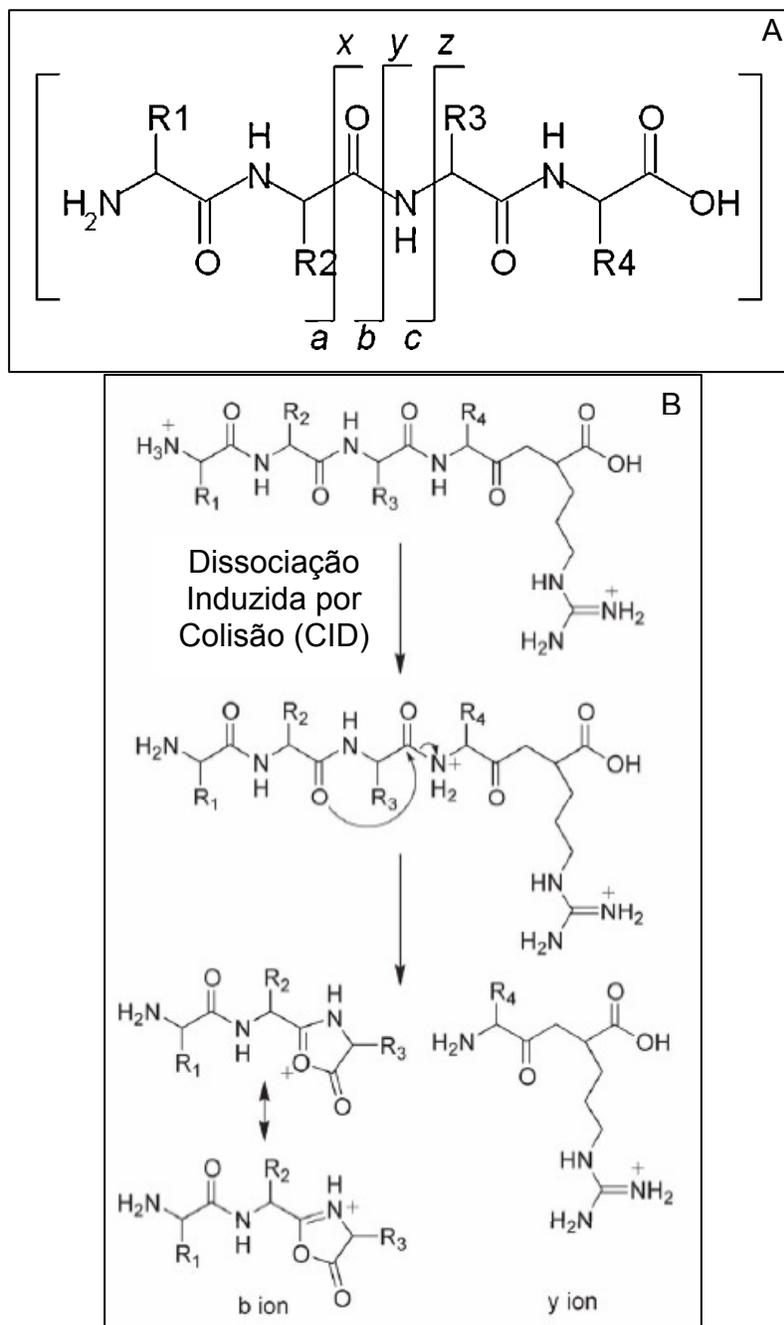


Figura 6. (A) Série de íons fragmentos baseada na cadeia peptídica: a/x, b/y e c/z; (B) Mecanismo de fragmentação de um peptídeo duplamente protonado por CID, seguindo o modelo do próton móvel. Na primeira etapa ocorre a transferência do próton, seguido pela formação de um anel oxazolona e posterior clivagem da ligação peptídica (amida), levando a formação de íons b (carga no N-terminal) e y (carga no C-terminal) (modificado da ref. 84).

Embora experimentos de fragmentação de peptídeos lineares estejam presentes de forma rotineira em laboratórios há alguns anos, estudos de peptídeos modificados por ALC, provenientes de experimentos de ligação

cruzada de proteínas e complexos protéicos apresentam desafios, especialmente para as espécies intra e intermoleculares, de modo que a análise dessas espécies não é realizada em larga escala, quase sempre necessitando de inspeção manual para validação dos dados. A espécie *dead-end* não apresenta um perfil de fragmentação muito diferente de peptídeos lineares, uma vez que o ALC é apenas uma extensão da cadeia lateral da lisina, comportando-se como uma modificação pós-traducional. Já no caso de espécies intramoleculares, temos a presença de um macrocíclico, como ilustrado na Figura 4, de modo que rotas de fragmentação diferentes de peptídeos lineares devem ser observadas. Já as espécies intermoleculares apresentam o maior desafio, uma vez que duas cadeias peptídicas estão presentes e a fragmentação deve ocorrer em ambas as cadeias.

Enquanto existem alguns trabalhos na literatura que mostram espectros de fragmentação de peptídeos modificados por ALCs^{48,52,54,55,61,80,87}, poucos discutem profundamente como o esses peptídeos fragmentam^{88,89,90}. Schilling e colaboradores⁹¹ propuseram uma nomenclatura para os fragmentos provenientes da dissociação de peptídeos modificados por ALC baseado na nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann para peptídeos lineares. No entanto, a grande maioria dos trabalhos por CID que apresentam espectros de fragmentação de peptídeos provenientes de experimentos de ligação cruzada anota apenas íons convencionais (**b** e **y**). Desse modo é de grande interesse verificar a presença de caminhos de fragmentação particulares, tanto por CID como para outros métodos de dissociação, de peptídeos modificados por ALC que permitam identificá-los dentre peptídeos não modificados. Cabe salientar que em CID peptídeos muito grandes, com mais de 15 resíduos, costumam não fornecer espectros de dissociação informativos, uma vez que, devido ao seu tamanho, temos uma maior distribuição de energia ao longo da cadeia, acarretando em poucos fragmentos.

1.5. Dissociação Multifotônica por Infravermelho - IRMPD

O método de dissociação multifotônica por infravermelho (*infrared multiphoton dissociation* – IRMPD) surgiu no final da década de 70 para estudos de fragmentação de moléculas pequenas⁹² e passou a ser utilizado para análise de biomoléculas no final da década de 90, principalmente devido à ausência de métodos eficientes de CID para análises de moléculas grandes em instrumentos do tipo ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR)⁹³. Em experimentos de IRMPD os íons precursores de interesse são isolados e aprisionados na cela de ICR e um feixe de laser infravermelho é direcionado a eles (como ilustrado na Figura 7A). O mecanismo de fragmentação envolve a incidência de múltiplos fótons no precursor, que adquire energia vibracional até ocorrer clivagem das ligações mais lábeis⁹⁴. Em IRMPD, assim como em CID, os precursores passam por um processo lento de ativação (*slow heating method*), e esses eventos, muitas vezes, necessitam de eventos da ordem de ms para ocorrerem de forma eficiente; no caso de CID são necessárias múltiplas colisões com o gás, enquanto que IRMPD múltiplos fótons são necessários para a dissociação^{95,96}. Desse modo, no caso da análise de peptídeos, esses dois métodos de dissociação geram íons fragmentos similares, do tipo **b** e **y** (Figura 7B).

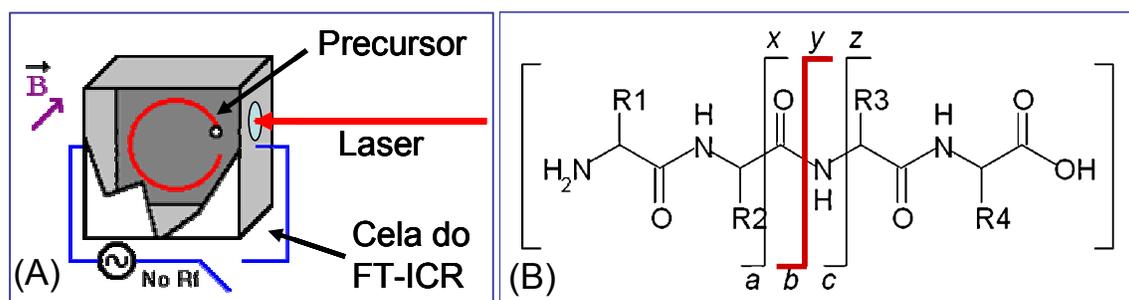


Figura 7. (A) Esquema de um espectrômetro de massas do tipo FT-ICR capaz de realizar experimentos de IRMPD. O precursor (peptídeo protonado) de interesse é aprisionado na cela de ICR e um laser infravermelho é introduzido na cela. O precursor adquire energia vibracional e há dissociação das ligações mais lábeis, fornecendo íons fragmentos **b** e **y** (mostrados em vermelho, B).

A eficiência da dissociação em IRMPD, definida como a abundância relativa do íon precursor em relação a seus fragmentos, depende de três parâmetros: a quantidade de íons irradiados pelo laser, a intensidade do laser (potência do laser, normalmente inferior a 100 W/cm²) e o tempo de irradiação (de 10 a centenas de ms), sendo comum utilizar um feixe de laser não focado, de modo a atingir a maior parte dos precursores presentes na câmara de ICR⁹⁷. Na maior parte dos instrumentos comerciais todos esses parâmetros podem ser controlados manualmente, de forma a aperfeiçoar a dissociação de modo desejado.

Aplicações de IRMPD para estudo estrutural de moléculas pequenas são realizadas para diferenciação de isômeros^{98,99}, pois isômeros normalmente possuem estados diferentes de energia e, em IRMPD, o processo de fragmentação ocorre pelo menor caminho energético. No caso de moléculas maiores, IRMPD tem sido utilizado na caracterização e identificação de peptídeos¹⁰⁰, oligonucleotídeos¹⁰¹ e, principalmente, no estudo que envolve a caracterização de proteínas intactas, conhecido como *top-down*^{102,103}. Até agora, a literatura apresenta apenas um trabalho onde IRPMD foi utilizado em estudos envolvendo ligação cruzada de proteínas e espectrometria de massas¹⁰⁴ e apenas dois espectros de IRMPD são mostrados, contendo apenas íons fragmentos do tipo **b** e **y** atribuídos.

1.6. Dissociação por Captura de Elétrons - ECD

Dissociação por captura de elétrons (*electron capture dissociation* – ECD) representa um dos avanços mais recentes e significativos para a identificação e caracterização de peptídeos e proteínas por espectrometria de massas. A técnica foi desenvolvida por McLafferty e colaboradores em 1998¹⁰⁵ e vêm sendo amplamente aplicada em estudos de *top-down* de proteínas (seqüenciamento de proteínas intactas, sem digestão enzimática)^{106,107} e localização e identificação de modificações pós-traducionais.

Em comparação com CID, o método de dissociação mais difundido, ECD é capaz de fornecer uma sequência de fragmentos mais extensa da cadeia peptídica, de modo que permite que modificações lábeis das cadeias laterais dos resíduos permaneçam intactas durante a dissociação da cadeia peptídica¹⁰⁸. Em relação à questão instrumental, a geometria utilizada para experimentos de ECD é bastante similar ao IRMPD. Os íons precursores, multicarregados positivamente, são aprisionados na cela de instrumentos do tipo FT-ICR e, ao invés de um laser, são irradiados por um feixe de elétrons de baixa energia ($\leq 0,2$ eV), normalmente produzidos por um filamento convencional. Ocorre então a captura de elétrons pelo precursor, de modo que uma neutralização parcial é obtida (reação exotérmica). A dissociação então se dá por um processo descrito como não ergódico, ou seja, ela ocorre antes que haja tempo para redistribuição de energia¹⁰⁹, de modo que toda ligação peptídica deve se fragmentar sem que haja preferência, mantendo intacta até mesmo modificações pós-traducionais lábeis. Uma vez que a clivagem ocorre apenas ao longo da cadeia peptídica é possível manter até mesmo interações não covalentes, sendo que estruturas secundária de proteínas e peptídeos podem ser estudadas por ECD¹¹⁰.

Após a neutralização parcial do precursor multiprotonado íons fragmentos do tipo **c** e **z•** são observados em experimentos de ECD de peptídeos e proteínas e, embora o mecanismo exato de fragmentação em ECD ainda não seja completamente compreendida^{108,109,110}, a idéia mais aceita é ilustrada na Figura 8 (ver legenda).

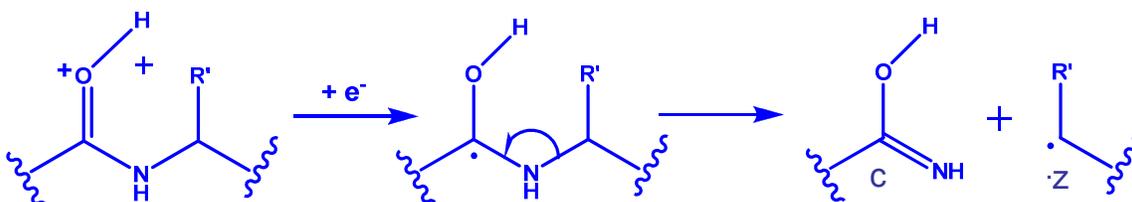


Figura 8. Proposta do mecanismo de fragmentação de proteínas e peptídeos por ECD^{102,103,105}. Após a captura do elétron, uma clivagem homolítica deve ocorrer. Embora não seja completamente compreendido, a dissociação em ECD, diferentes de CID, não ocorre na ligação peptídica (amida). Uma vez que ocorre a neutralização parcial do precursor, é importante notar que o peptídeo em questão deve possuir mais de uma carga, de modo que é possível determinar as m/z dos fragmentos gerados (uma carga na porção N-terminal para verificar íons **c** e outra na C-terminal, para os íons **z•**).

Enquanto métodos lentos de dissociação (CID e IRMPD) fornecem majoritariamente íons fragmentos **b** e **y**, provenientes da ligação peptídica (amida) de peptídeos e proteínas, conforme ilustrado na Figura 8, após a captura do elétron, ECD gera fragmentos do tipo **c** e **z•**, provenientes da clivagem da ligação entre N-C_α da cadeia peptídica.

Para ilustrar a fragmentação extensiva em peptídeos por ECD temos o estudo realizado por Guan e colaboradores¹¹¹. Na Figura 9 temos o espectro de CID (A) e ECD (B) do mesmo peptídeo, o fator de crescimento humano (GHRF) contendo metionina oxidada (Met(O)). Quando peptídeos contendo Met(O) são submetidos a CID é esperado a perda neutra de 64 Da, referente à hidrosulfonilmetano (CH₃SHO) e, verificando o espectro da Figura 9A poucos íons fragmentos **b** e **y** referentes a sequência do peptídeo são observados, levando a uma baixa cobertura do mesmo, enquanto que a perda de 64 Da é verificada com frequência. Já no espectro de ECD (Figura 9B) a perda de 64 não foi observada, mas uma cobertura praticamente completa, com base em íons **c** e **z•**, foi obtida. Embora a cobertura do peptídeo seja muito superior em ECD do que em CID, CID é capaz de fornecer informação sobre a modificação deste peptídeo, no caso, metionina oxidada (- 64 Da), o que leva a conclusão que ambos os métodos são complementares e podem ser utilizado em estudos detalhados que envolvam sequenciamento e identificação de modificações de peptídeos e proteínas. Além disso, com base no espectro da Figura 9B, onde uma ampliação da intensidade dos fragmentos em relação ao precursor foi utilizada, é possível verificar que, embora ECD forneça uma maior cobertura, a eficiência de fragmentação é inferior do que em CID.

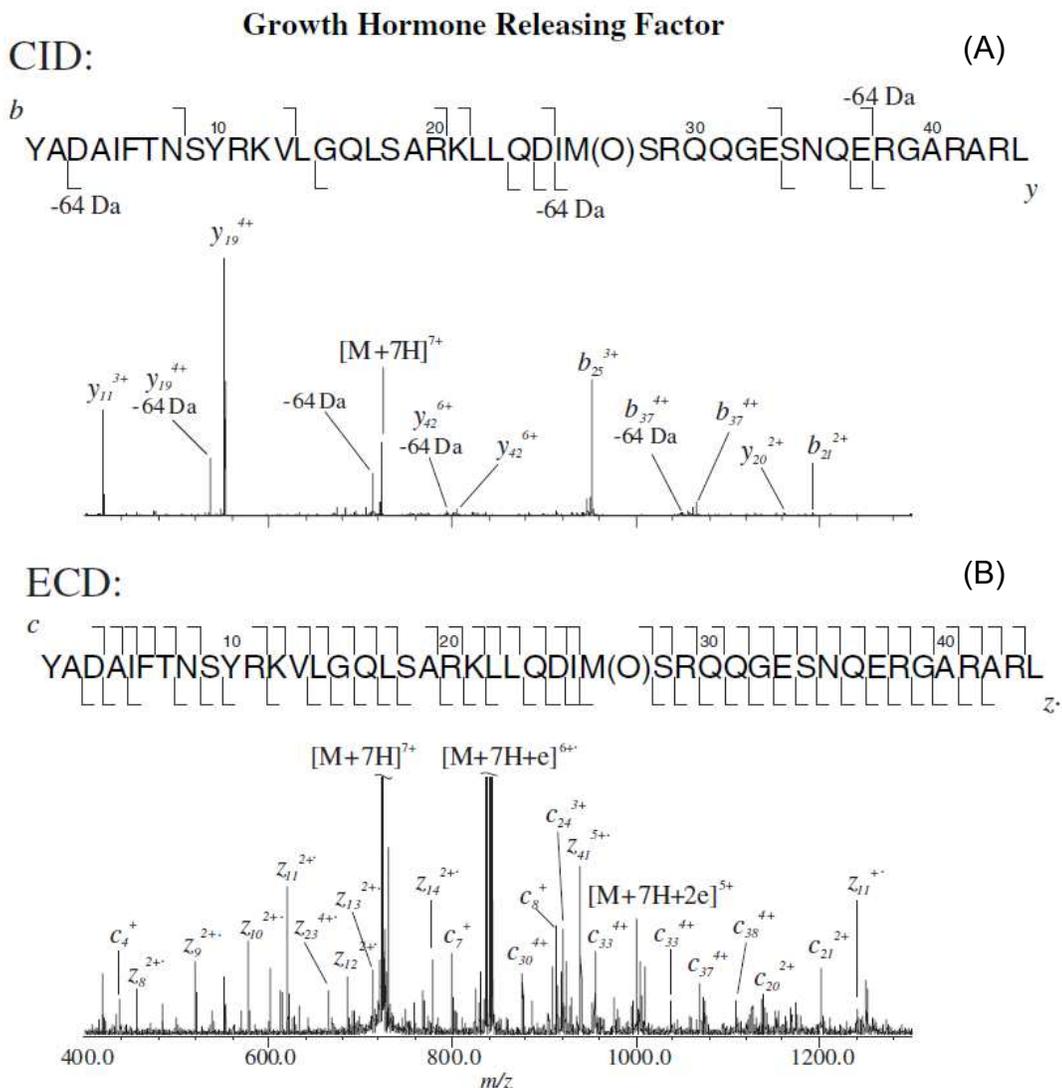


Figura 9. Espectro de CID (A) e ECD (B) do fator de crescimento humano (GHRF), a sequência do peptídeo, bem como a cobertura obtida por CID e ECD são ilustrados. A perda neutra de 64 Da refere-se ao hidrosulfonilmetano (CH_3SHO), proveniente de metionina oxidada e foi verificada apenas por CID. O espectro de ECD fornece uma cobertura sequencial do peptídeo muito superior ao CID¹¹¹.

Mesmo com todas as vantagens de ECD descritas aqui, para realização desse tipo de dissociação é necessário instrumentos do tipo FT-ICR-MS, que é, de modo geral, o tipo de MS mais caro no mercado. No entanto, Hunt e colaboradores desenvolveram recentemente um método similar ao ECD, a dissociação por transferência de elétrons (ETD), que pode ser implementada em instrumentos de baixo custo (em relação a instrumentos do tipo FT-ICR), do tipo *ion traps*^{112,113}. Em ETD, ânions (por exemplo, antraceno) são utilizados como

veículos de transferência de elétrons para precursores multiplamente carregados positivamente (normalmente peptídeos), como consequência temos um processo de fragmentação similar a ECD.

Embora apenas um trabalho cite o uso de ECD para estudo de peptídeos contendo ALC¹⁰⁴, os espectros não são profundamente discutidos. Além disso, ETD vêm sendo amplamente difundido, de modo que é de grande relevância realizar experimentos fundamentais de fragmentação utilizando métodos alternativos de dissociação para peptídeos modificados por ALCs. Como consequência, estudos utilizando tais métodos (como IRMPD, ECD ou ETD) podem mostrar alternativas vantajosas frente a CID para identificação de peptídeos modificados provenientes de experimentos de ligação cruzada de proteínas.

1.7. Espectrometria de Mobilidade Iônica – IMS

A espectrometria de mobilidade iônica (*ion mobility spectrometry* – IMS) foi introduzida no início dos anos 60 por Cohen e Karasek, com nome de cromatografia de plasma ou cromatografia iônica. Considerada uma técnica de separação de íons, sendo os tempos de travessia (*drift time*) de cada íon análogo aos tempos de retenção em cromatografia¹¹⁴. Trata-se de uma técnica eletroforética que permite que íons sejam separados com base em sua massa, carga e seção de choque (que depende de sua geometria). A mobilidade de um íon na fase gasosa é medida através da velocidade com a qual este íon se move através de um gás inerte, sobre a influência de um campo elétrico.

Embora tenha ocorrido uma grande explosão sobre esta técnica no início da década de 70 graças à versatilidade analítica, limites de detecção, análises em tempo real e baixo custo^{115,116}, a partir de 1976 houve um desinteresse sobre IMS, principalmente devido à comparação com a espectrometria de massas (MS), capaz de gerar maiores informações sobre massa e com maior poder de resolução¹¹⁷.

Quando IMS é acoplada à espectrometria de massas passamos a ter uma ferramenta analítica poderosa, capaz de fornecer dados estruturais além da separação de amostras complexas. A união entre IMS e MS, é muitas vezes denominada apenas de IMMS, devido à complementação entre as duas técnicas e a facilidade instrumental com que podem ser unidas. Essa união entre é quase tão antiga quanto à própria IMS, sendo relatada pela primeira vez em 1962, por McDaniel e colaboradores¹¹⁸.

Um instrumento de IMMS deve obedecer cinco processos: introdução de amostra, ionização, separação por mobilidade, separação por m/z e detecção dos íons. Existem quatro tipos de espectrômetros de mobilidade iônica: *drift time*, *aspiration*, *field-asymmetric waveform* e *traveling wave*; e cada um destes pode ser acoplado a uma variedade de espectrômetros de massas. Os instrumentos do tipo *drift time* e *traveling wave*, utilizados neste estudo, serão discutidos a seguir.

No primeiro e mais utilizado tipo de mobilidade iônica, conhecido simplesmente como *drift time*, e comumente chamado de IMS, os íons migram através de um gás inerte, sobre a influência de um campo elétrico baixo e uniforme, de modo que a energia proveniente deste campo elétrico não deve ser maior do que a energia proveniente das colisões entre as moléculas do gás¹¹⁶, conforme ilustrado na Figura 10.

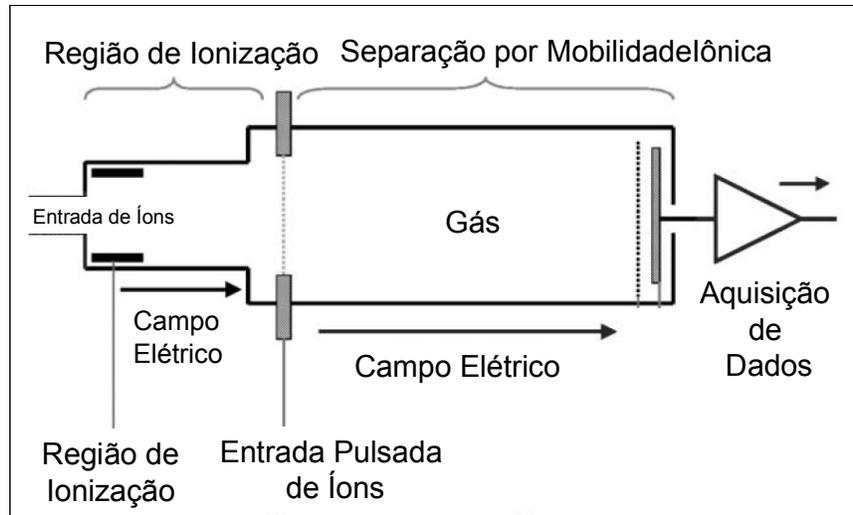


Figura 10. Esquema de uma célula de IMS convencional. Na entrada da célula de difusão (*drift tube*), os íons são submetidos a um campo elétrico baixo, que acelera os íons até o detector (ou um espectrômetro de massas). O gás presente na região de difusão está sob pressão constante, que varia de 1 torr a pressão ambiente. Um íon que passa através do gás sofre considerável número de colisões. Íons maiores possuem maior seção de choque que íons menores, de modo que demoram mais para atravessar a célula de mobilidade, tornando possível a separação de íons com diferentes formas e carga.

Assim os íons possuem energia similar ao gás, e o processo de difusão é dominante. A temperatura e a pressão do gás devem ser uniformes, e densidade das espécies iônicas deve ser baixa o suficiente para que a repulsão coulômbica seja ignorada. Nestas condições a velocidade do íon é diretamente proporcional ao campo elétrico aplicado. A velocidade de difusão dos íons (v_d , cm s^{-1}), na presença do gás, é dependente do campo elétrico (E , V cm^{-1}) e é dada por:

$$v_d = KE$$

Onde K é a constante de mobilidade iônica (K , $\text{cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$). Se o tempo que um íon leva para atravessar uma célula de difusão de comprimento d (cm) é t_d (s), então:

$$K = \frac{d}{t_d E}$$

A mobilidade iônica é normalmente expressa como mobilidade reduzida K_0 , corrigida para condições padrões de temperatura (T , em Kelvin) e pressão (P , em Torr):

$$K_0 = K \frac{273 P}{T 760}$$

A constante de mobilidade iônica está relacionada com condições experimentais e características do analito, e pode ser encontrada por:

$$K = \frac{3q}{6N} \left(\frac{2\pi}{k_b T} \right)^{1/2} \left(\frac{m+M}{mM} \right)^{1/2} \frac{1}{\Omega}$$

Onde q é a carga do íon, N é a densidade do gás, m a massa do gás, M a massa do íon, k_b é a constante de Boltzmann, T é a temperatura na cela de difusão e Ω é a seção de choque do íon. Em campos elétricos elevados a mobilidade dos íons torna-se dependente apenas do campo elétrico, em outras palavras, a presença do gás passa a não influenciar a mobilidade dos íons. Este princípio é utilizado na mobilidade iônica diferencial ou *high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry* – FAIMS.

Um novo método de mobilidade iônica foi recentemente desenvolvido, chamado de *traveling-wave ion mobility spectrometry* (TWIMS)^{119,120,121} e já introduzido comercialmente no equipamento conhecido como Synapt HDMS (Waters, Co). Neste formato, a construção da cela de mobilidade é similar a IMS tradicional (inclusive em relação à presença do gás inerte); no entanto, diferente de IMS, onde um campo elétrico baixo é aplicado continuamente, um campo elétrico RF mais elevado é aplicado em um segmento e arrastado sequencialmente pela cela, o que permite que os íons sejam empurrados e, devido ao choque com gás, temos a separação dos mesmos de acordo com sua mobilidade. Desse modo os íons se movem em pulsos, conforme a onda do campo elétrico elevado passa por estes. Na

Figura 11A temos o esquema da cela de TWIMS e em

Figura 11B temos o movimento dos íons¹²¹ após o pulso elétrico. Na ausência de gás

Figura 11B, todos os íons devem se movimentar de modo simultâneo, no entanto, na presença de gás íons mais volumosos ou com menor número de carga, devem se movimentar de modo mais lento que íons menos volumosos ou em maior estado de carga.

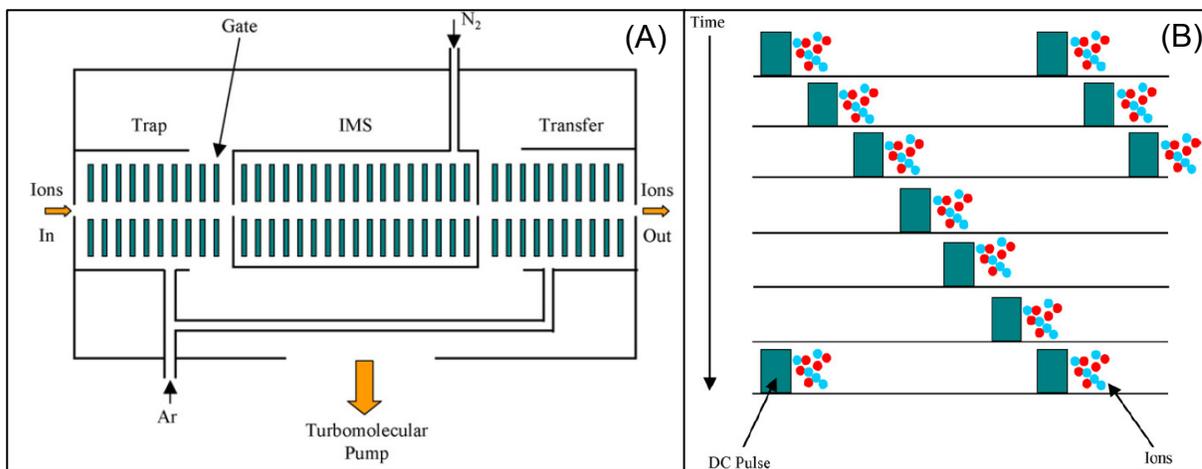


Figura 11. Esquema da célula de TWIMS no Synapt HDMS, (B) movimento dos íons após o pulso elétrico¹²¹, na ausência de gás (todos os íons se movem simultaneamente). Um campo elétrico elevado é aplicado em um segmento e arrastado sequencialmente pela célula, o que permite que os íons sejam empurrados e, devido ao choque com gás, temos a separação dos mesmos de acordo com sua mobilidade. No caso ilustrado não temos a presença de gás, e todos os íons se movem simultaneamente. Desse modo os íons se movem em pulsos, conforme a onda do campo elétrico elevado passa por estes (adaptado de¹²¹).

O primeiro equipamento que fez uso desta tecnologia foi mostrado por Bowers e colaboradores em 2004¹²⁰. Neste caso a célula de TWIMS foi colocada entre a fonte de ionização e o quadrupolo de um espectrômetro de massas do tipo Q-Tof Ultima (Waters, Co.). Quando o uso do TWIMS passou para o equipamento comercial (Synapt) uma célula similar a esta foi posicionada no lugar da câmara de colisão de um Q-Tof, entre o quadrupolo e o ToF¹²¹. A configuração do equipamento, com a célula de TWIMS entre o quadrupolo e o ToF, permite que vários tipos de análises sejam realizados. Analisando a

Figura 11A verificamos que a célula de mobilidade possui, na verdade, três setores de *traveling-waves*: o primeiro deles (*trap*) é responsável por aprisionar os íons, proporcionando a entrada pulsada desse para a próxima cela; na segunda (IMS), situada em uma região com gás (normalmente N₂), ocorre a separação por mobilidade, e a terceira (*transfer*) fica responsável por transferir os íons do quadrupolo para o ToF. As células de TWIMS funcionam da seguinte maneira: os guias de íons (*stacked ring ion guides* – SRIG, anéis por onde os íons passam pelo centro, como mostrado na Figura 12) são formados por eletrodos planares arranjados ortogonalmente ao eixo de transmissão dos íons¹²¹. Uma vez que as câmaras de aprisionamento (*trap*) e transferência

(*transfer*) operam sob pressões similares à de câmaras de colisões convencionais (10^{-2} mbar) é possível que íons sejam fragmentados em ambas essas regiões, permitindo que experimentos similares a MS^3 sejam realizados.

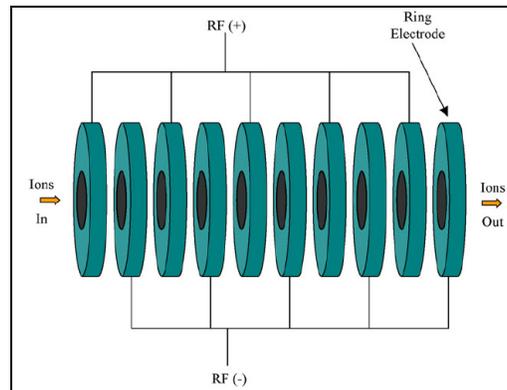


Figura 12. Guia de íons (*stacked ring ion guides – SRIG*) responsável pelo funcionamento da técnica de mobilidade iônica conhecida como *traveling wave* (TWIMS) (adaptado de ¹²¹).

Tendo em vista o potencial de separação e de análise estrutural proporcionado pela técnica de IMMS, é de grande interesse o uso da mesma para estudos envolvendo ligação cruzada e espectrometria de massas. Até o momento não há relatos na literatura do uso de IMMS para estudos de peptídeos e/ou proteínas modificados por ALCs.

2. OBJETIVOS

O **objetivo geral** deste trabalho consistiu em explorar a fragmentação e mobilidade iônica de peptídeos provenientes de experimentos de ligação cruzada utilizando espectrometria de massas, para servir de base nas aplicações de proteômica estrutural.

Os **objetivos específicos** deste projeto são:

- i) Obtenção de peptídeos modelos para realização de experimentos de fragmentação;
- ii) Estudo de fragmentação de espécies Intra e Intermoleculares por CID;
- iii) Emprego de métodos alternativos de dissociação: ECD e IRPMD;
- iv) Uso de experimentos seletivos para identificação de peptídeos contendo ALCs;
- v) Utilização de IMMS para análise de peptídeos isoméricos (contendo ALCs);
- vi) Uso de IMMS para separação entre peptídeos lineares e peptídeos modificados por ALC.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material

Todos os peptídeos utilizados neste estudo foram adquiridos da Proteimax (SP, Brasil); os ALCs utilizados foram: glutarato de disuccinimidila (DSG, Pierce, IL, EUA), suberato de disuccinimidila (DSS) e sebacato de disuccinimidila (DSSeb) (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Os demais reagentes, quando não especificado, foram adquiridos da Tedia Chemicals (OH, EUA). As proteínas utilizadas nesse trabalho (Hemoglobina e Lisozima) foram adquiridas da Sigma (EUA) e a tripsina da Promega (Gold, Sequence Grade, EUA). Todos os reagentes foram utilizados sem prévia purificação.

3.2. Estudo de fragmentação de peptídeos contendo ALC por CID

3.2.1. Espécies Intramoleculares

Para o estudo de fragmentação de peptídeos de espécies intramoleculares foram utilizados peptídeos com as seguintes sequências: AGAKGAERLVKAGVR (PX), Ac-ARKGCREVTKNDLR (P3), Ac-ARYTKDLSQRAFKGMR (P4) e Ac-ARGKWPREVKIHR (P5). O agente de ligação cruzada utilizado foi o DSS.

3.2.2. Espécies Intermoleculares

Para o estudo de fragmentação de peptídeos de espécies intermoleculares foram utilizados peptídeos com as seguintes: Ac-RKRVWSEKGNMAR (P1), Ac-RLKRDTYQAGKFHR (P2), Ac-ARKGCREVTKNDLR (P3), Ac-ARYTKDLSQRAFKGMR (P4) e

AGAKGAERLVKAGVR (PX). O termo “Ac-” refere-se ao resíduo N-terminal acetilado. Os ALCs utilizados foram o DSS, DSSeb e DSG.

3.2.3. Reação de Ligação Cruzada

Os peptídeos foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 a uma concentração final de 40 μ M; por sua vez os ALCs foram dissolvidos em *N,N*-dimetilformamida (DMF) em concentração final de 1 mg/mL e adicionado em 50 vezes de excesso molar à solução anterior. A reação com os ALCs foi mantida a temperatura ambiente por duas horas, seguido da adição de tampão Tris•HCl (1 M, pH 7,6) até atingir uma concentração final de 50 mM. Após 15 minutos, adicionou-se tripsina (razão tripsina/peptídeo 1:50 em massa) e a digestão enzimática foi conduzida a 37° C por 1 hora para obtenção de espécies intramoleculares 3 horas para obtenção das espécies intermoleculares. Após a digestão os produtos da reação foram purificados usando o cartucho Oasis HLB (Waters Co.) e o solvente foi evaporado utilizando evaporador rotativo (SpeedVac, ThermoFisher, EUA).

3.2.4. Análise de Espécies Intra e Intermoleculares por MS

Para as análises por MALDI-MS, as amostras foram resuspensas em 1 mL de solução aquosa contendo 50% ACN e 0,1% TFA. A amostra foi preparada pelo método *dried droplet*, utilizando-se como matriz o ácido α -ciano-4-hidroxi-trans-cinâmico (CHCA, 10 mg/mL, na mesma solução do peptídeo). Os espectros foram adquiridos no equipamento Q-Tof Premier (Waters Co.), que opera com um laser de estado sólido de 200 Hz. Os parâmetros de análise foram 250 a.u. (energia do laser), 10 V (sample plate) e 2200 V (MCP). O gás de colisão utilizado foi o Argônio e os espectros de fragmentação foram adquiridos manualmente, aumentando-se a energia de colisão até a completa dissociação

do precursor. Antes da análise foi efetuada a calibração externa usando uma mistura de polipropileno glicol (600, 800 e 2000 Da) de m/z 300 até 3000.

As análises de ESI-MS foram realizadas após resuspender as amostras em 1 mL de solução aquosa contendo 50% ACN e 0,1% ácido fórmico, utilizando-se para isso o equipamento Q-ToF Premier. Os experimentos foram realizados por infusão direta da amostra com fluxo de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, com voltagens do cone e capilar de 40 V e 3,5 kV, respectivamente. Como no caso anterior, os espectros de fragmentação foram adquiridos aumentando-se a energia de colisão até completa dissociação do precursor. Os espectros adquiridos foram deconvoluídos utilizando-se o algoritmo MaxEnt3 (Waters Co.). Em todos os casos, os espectros foram calibrados internamente utilizando-se como padrão a massa do precursor. Antes da análise foi efetuada a calibração externa usando oligômeros de ácido fosfórico de m/z 100 até 2000.

3.3. Estudo de Varredura de Íon Precursor (PIS) para Auxiliar na Detecção de Peptídeos Modificados por ALCs

3.3.1. Preparação de Amostras

A amostra denominada PX+Hemoglobina foi preparada misturando-se quantidades equimolares da amostra contendo diversas espécies modificadas pelo ALC DSS proveniente do peptídeo PX (cuja preparação foi descrita anteriormente) com um padrão de digestão enzimática utilizando tripsina de hemoglobina bovina. Para comparação foi utilizado um controle contendo apenas o digesto trípico de hemoglobina.

O experimento de ligação cruzada em lisozima com DSS, DSSeb e DSG foi realizado adicionando-se o ALC desejado dissolvido em DMF (1 mg/mL) à solução de 10 μM de proteína em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5, na proporção molar de 1:50 (proteína/DSS). Após 30 minutos de reação, adicionou-se Tris•HCl 1M pH 7,5 de modo que sua concentração final fosse 50 mM. Após 15 minutos, adicionou-se ditioneitol (DTT, razão tripsina/proteína 1:50 em

massa) e a reação foi conduzida por 1 hora a 60° C. Em seguida adicionou-se iodoacetamida (IAA, 1:10 m/m), sendo que a reação ocorreu por 30 minutos no escuro; após esse período, tripsina foi adicionada (1:50 m/m) e a digestão enzimática foi conduzida a 60° C por 1 hora.

3.3.2. Análise por LC-MS/MS

A análise por Varredura de Íon Precursor (PIS – *Precursor Ion Scan*) foi realizada no equipamento Q-ToF Ultima (Waters Co.) acoplado a o sistema cromatográfico UPLC nanoAcquity (Waters Co.). Em geral, 1 µL de amostra foi injetada e os peptídeos foram dessalinizados na coluna Symmetry C18 (Waters Co.) por 5 minutos. Após esse período, os peptídeos foram direcionados para a coluna BEH130 C18 (Waters Co.), onde foi feito um gradiente (45 minutos) de água/0,1% ácido fórmico (Sol. A) e ACN/0,1% ácido fórmico (Sol.B), fluxo 1,1 µL/min, na coluna com o seguinte perfil: 100% → 70% A de 0 a 30 minutos; 70% → 50% de 30 a 32 minutos; 50% até 38 minutos; 50% → 100% de 38 a 40 minutos. Os parâmetros utilizados no equipamento foram os seguintes: 2 s (tempo de aquisição do espectro), 3,5 kV (voltagem do capilar), 100 V (voltagem do cone), 10 eV (energia de colisão no modo de baixa energia), 70-85 eV (energia de colisão no modo de alta energia) e 2200 V (MCP). A energia de colisão utilizada no modo de alta energia foi obtida após a aquisição de espectros de fragmentação adquiridos manualmente, por 10 segundos, em diversas energias, para diversos peptídeos modificados por ALC até que observar a formação dos íons diagnósticos de espécies modificadas. Os espectros de fragmentação foram calibrados utilizando-se a massa do trímero de ácido fosfórico injetado ao longo da corrida (m/z 294,9385).

3.4. Estudo de Fragmentação de Espécies Intermoleculares por ECD e IRMPD

3.4.1. Peptídeos e ALCs utilizados

Para os estudos de IRMPD e ECD os seguintes peptídeos foram utilizados: Ac-ARAKGAEFAVYAGVR (P6); Ac-ARAKGAEFAVHAGVR (P7); Ac-ARAKGAEFAVSAGVR (P8); Ac-ARAYVALKA (P9) e Ac-ARAHVALKA (P10). Os ALCs DSS, DSG e DSSeb foram utilizados.

3.4.2. Formação de Espécies Intermoleculares

As espécies intermoleculares foram formadas entre os seguintes peptídeos P6-P7; P8-P9; P8-P10; P6-P8 e P7-P8. Para as reações, 200 nmol de cada par de peptídeo (100 nmol de cada) foi reagido com 200 nmol do ALC utilizado (DSS, DSG ou DSSeb), resultando em um total de 50 µL de reação (tampão fosfato, pH 7,5). As reações procederam por 1 h e, após esse período, a mesma concentração de ALC foi adicionada ao meio reacional e mantido por mais 1 h. Após esse período tampão Tris•HCl 1M pH 7,5 foi adicionado até obter uma concentração final de 50 mM. Os pares formados entre os peptídeos P6 e P7, P6 e P8 e P7 e P8 foram ainda digeridos enzimaticamente pela adição de tripsina em uma proporção em massa de 1:50 (enzima/substrato) e a reação procedeu por 3 h à 37°C.

3.4.3. Preparação das Amostras e Análise por MS

Os experimentos de IRMPD e ECD foram realizados em colaboração com o Prof. Marcos N. Eberlin, no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, Unicamp. Antes da análise por MS, todos os produtos de reação foram dessalinizados como descrito anteriormente. As análises de nano-ESI-MS/MS foram realizadas em um instrumento LTQ FT Ultra de 7 Tesla (Thermo Scientific

Co., San Jose, EUA) acoplados a uma fonte de NanoMate TriVersa (Biosciences, Ithaca, NY, EUA), com voltagem no capilar de 1,5 kV. O instrumento foi previamente calibrado com uma mistura de cafeína, peptídeo MRFA e Ultramark 1621 (Sigma-Aldrich). Os espectros de IRMPD foram adquiridos mantendo a energia do laser em 100 e variando o tempo de exposição de 20 a 200 ms. Os espectros de ECD foram adquiridos mantendo a energia do feixe de elétrons em 4 e variando o tempo de exposição de 3 a 20 ms. Todos os espectros foram manualmente interpretados.

3.5. Separação de Peptídeos Isoméricos Contendo ALC por IMMS

3.5.1. Peptídeos, ALCs e Reação de Ligação Cruzada

Para o estudo de mobilidade de espécies do tipo *dead-end* os seguintes peptídeos com N-terminal acetilado foram utilizados Ac-RKRVWSEKGNMAR (P1), Ac-ARYTKDLSQRAFKGMR (P4), Ac-ARAKGAEFVKAGVR (P11) e o peptídeo com N-terminal livre AGAKGAERLVKAGVR (PX). Neste estudo o ALC DSS foi empregado. Cada peptídeo foi solubilizado em tampão fosfato 50 mM em três diferentes pHs (6, 7 e 8) a uma concentração de 40 µM. O DSS foi dissolvido em DMF (10 mg/ml) e adicionado em excesso molar de 50 vezes. Para favorecer a formação de espécies do tipo *dead-end* o DSS foi adicionado ao meio reacional antes dos peptídeos (favorecer a hidrólise). As reações ocorreram a temperatura ambiente por 45 min e tampão Tris (1M, pH 7,6) foi adicionado até uma concentração final de 50 mM.

3.5.2. Análise por IMMS

As amostras foram dessalinizadas utilizando cartuchos de fase reversa Oasis HLB, eluídas com 0,1% ácido fórmico em ACN e posteriormente diluídas na proporção de 1:1 com 0,1% de H₂O. Os experimentos de IMMS foram

conduzidos em um instrumento Synapt HDMS (Waters Co.). As análises foram realizadas com fonte de ESI por infusão direta, com fluxo de 6 $\mu\text{L}/\text{min}$, com voltagem no capilar de 3,0 kV e no cone de 40 V. Para os peptídeos em questão, tanto para experimentos de MS quanto MS/MS, as espécies triplamente carregadas foram selecionadas no quadrupolo, seguido de separação por mobilidade iônica e posterior análise no TOF. A energia de colisão (CE) foi mantido na câmara de aprisionamento (Trap) em 6 eV e variada, conforme a m/z de cada peptídeo, na câmara de transferência (Transfer). As condições de obtidas para separação por mobilidade iônica serão discutidas detalhadamente. Argônio (Ar) foi utilizado como gás de colisão no Trap e Transfer enquanto N_2 foi utilizado como gás de separação para IMS. Todos os espectros de ESI-MS/MS obtidos (IMMS) foram processados utilizando o algoritmo de deconvolução MaxEnt 3 (Waters Co.). O instrumento foi previamente calibrado utilizando oligômeros de ácido fosfórico para uma m/z de 100 a 2000.

3.6. Mobilidade Iônica de Peptídeos Modificados por ALC e Peptídeos Lineares

3.6.1. Preparação de Amostras – Universidade de Edimburgo, Escócia

Essa etapa do trabalho foi realizada na Universidade de Edimburgo, Escócia, sob supervisão dos Prof. Juri Rappsilber do *Wellcome Trust Centre for Cell Biology* e da Profa. Perdita Barran, da *School of Chemistry*.

Os seguintes peptídeos foram utilizados nos estudos para obtenção de seção de choque: Fmoc-LLDKYLRVGFYKYGAR (LR16) e Fmoc-THAVKTEASVAALEKLAER (TR20) (Biomatik, Canadá). O ALC utilizado foi o suberato de bissulfosuccinimidila (BS3, Pierce, EUA). Para obtenção da espécie intermolecular do peptídeo LR16, a reação foi realizada com 125 μM de peptídeo, excesso de BS3 de 25 vezes em volume final de 200 μl em tampão

TEAB 25 mM, pH 8,5 (bicarbonato de trietilamônia). A reação foi realizada em temperatura ambiente, por 2 h e finalizada pela adição de tampão bicarbonato de amônio 1 M (ABC) até concentração final de 50 mM por 15 min. Para obtenção das espécies intramoleculares, *dead-end* (uma e duas modificações) e lineares (não modificados), para os peptídeos LR16 e TR20, a solução estoque dos peptídeos (1 mg/ml) foi adicionada após 5 minutos da adição de BS3 ao tampão e, ao invés de 2 h de reação, um período de 15 min. foi utilizado. Após a reação com BS3, 200 μ l de uma solução 20% de piperidina em dimetil formamida (DMF) foi adicionada para remover o grupo Fmoc do N-terminal dos peptídeos. A reação de desproteção ocorreu à temperatura ambiente por 5 h. Para os frascos referentes às espécies intermoleculares, tripsina foi adicionada em uma proporção de 50 peptídeo:1tripsina por 16 h à 37°C. Para as outras espécies a mesma proporção de tripsina, por um período de 2 h à 37°C Foi utilizado. Após essas etapas, obtivemos as seguintes espécies foram obtidas: peptídeos lineares (não modificados), intramoleculares, *dead-end* (com uma e duas modificações) e intermolecular (apenas para o peptídeo LR16). Antes das análises por IMMS (seja por infusão direta ou cromatografia líquida), as amostras foram desalinizadas utilizando ponteiras de pipeta contendo pequenos discos de fase reversa C18 (octadecilsilano, 3M, EUA), como descrito na ref. ¹²². Antes de carregar as amostras, as ponteiras foram ativadas com metanol, seguido por condicionamento com 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético). As amostras foram então carregadas, lavadas com 0,1% TFA para remoção do sal e, posteriormente, eluidas com 80% de acetonitrila, 0,1% TFA.

Para cálculo da seção de choque (Ω), uma solução 200 μ M de cada um dos dois peptídeos (LR16 e TR20) em 1:1 H₂O/acetonitrila 0,1% ácido fórmico foram analisadas por infusão direta no instrumento MoQToF¹²³, trata-se de um equipamento construído pelo grupo de pesquisa da Prof. Perdita Barran, que possui uma cela de mobilidade iônica convencional antes do quadrupolo de um Q-ToF, utilizando uma fonte de nano-*electrospray* (nano-ESI). Os dados foram adquiridos com voltagem no capilar de, aproximadamente, 1,5 kV; a pressão na cela de mobilidade foi de 3,5 Torr, usando He como gás de colisão; as voltagens

de mobilidade variaram de 60 a 10 V e a voltagem de injeção foi de 35 V. A temperatura em que os experimentos foram realizados foi de 300 K e a frequência do *pusher* foi de 70 μ s.

Para os estudos de mobilidade envolvendo uma mistura complexa de peptídeos contendo ALC, 20 peptídeos, todos com N-terminal bloqueado por grupo Fmoc (fluorenilmetiloxacarbonil), arginina como C-terminal e uma lisina em sua sequência foram utilizados. Para que a reação de ligação cruzada ocorresse entre as diferentes moléculas dos peptídeos o seguinte procedimento foi utilizado: 5 μ l do estoque de cada peptídeo (5 mg/ml) foram misturados, seguido por 5 μ l de uma solução 25% de trietilamina (TEA) e 5 μ l de DMF contendo 1,5 mg de BS3. A reação ocorreu por 16 hs, a 60°C sob agitação de 800 rpm. Depois desse período, 15 μ l de ABC saturado foi adicionado e incubado por 2h a 60°C. Para remoção dos grupos Fmoc, 200 μ l de uma solução 20% de piperidina em DMF foi adicionado e incubado por 16 h a temperatura ambiente. Para efeito de comparação, um extrato de *Escheichia coli* foi digerido com tripsina seguindo o protocolo: 100 μ g de *E. coli* (30 μ l), 30 μ l de Urea 8 M, 2 μ l de DTT, por 30 min a 37°C, seguido pela adição de 2 μ l de iodoacetamida (IAA) 20 min no escuro; após esse período 60 μ l de ABC 25 mM e 2 μ l de tripsina 2mg/ml foi adicionado; a digestão enzimática ocorreu por 16 h, a temperatura ambiente. Levando em consideração que em alguns desses peptídeos temos a presença de metionina e essa pode estar oxidada temos, após a reação com o ALC, mais do que 200 peptídeos intermoleculares.

Para os experimentos de LC-IMMS realizados pela empresa Waters, em Manchester, Reino Unido, um cromatógrafo líquido do tipo Acquity nanoUPLC acoplado em um instrumento Synapt G2, com fluxo de 300 nL/min, fase móvel 0,1% ácido fórmico em H₂O (A) e 0,1% ácido fórmico em acetonitrila (B), em uma corrida total de 90 min, com gradiente de 0 a 30% de B em 50 min, 30 a 70% de B de 50 a 75 min, 70% de 75 a 85 min e 0% B até 90 min. O IMMS foi utilizado com voltagem no capilar de 3 kV, cone de 40 V, função de mobilidade ativa. O instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico antes das

análises. Todos os dados obtidos foram processados utilizando os programas MassLynx 4.1 e Driftscope 2.1 (Waters, Co.)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo de Fragmentação de Peptídeos Modificados por CID

4.1.1. Desenho de Peptídeos Modelo

Os peptídeos utilizados nesta primeira etapa do projeto foram adquiridos com a seguinte sequência comum AC-xxRxxxKxxxRxxxKxxxR, onde x representa número variável de qualquer aminoácido, exceto lisina (K) e arginina (R). O uso de peptídeos contendo composições e número variável de aminoácidos permitiu atribuir, de forma inequívoca, os íons presentes nos espectros de MS/MS. Uma vez que diversos resíduos diferentes estão presentes nos quatro peptídeos temos ainda como vantagem a capacidade de verificar a presença de fragmentações dependente da sequência. No entanto, o grande atributo destes peptídeos está na posição fixa dos resíduos K e R, o que torna possível, após a reação com o ALC, e digestão parcial ou completa com tripsina, a obtenção de espécies intra e intermoleculares, partindo de um mesmo peptídeo (Figura 13). Desse modo, partindo do peptídeo linear (Figura 13A), após a reação do peptídeo com o ALC uma espécie intramolecular, contendo o N-terminal acetilado é gerada (Figura 13B) e, seguida pela digestão com tripsina, os dois produtos de interesse podem ser obtidos: i) peptídeo contendo DSS, intramolecular, após digestão parcial com tripsina, onde apenas a primeira R é clivada (Figura 13C); ii) peptídeo contendo DSS, gerando a espécie intermolecular, após digestão completa com tripsina (clivagem nas duas R, Figura 13D). A obtenção destas duas espécies pode ser realizada controlando o tempo de digestão com tripsina: verificamos que, após uma hora, a espécie intramolecular é favorecida; já a obtenção da intermolecular é verificada após três horas de digestão. É importante relatar que ambas as espécies obtidas representem peptídeos trípticos contendo ALC encontrados em experimentos de ligação cruzada de proteínas.

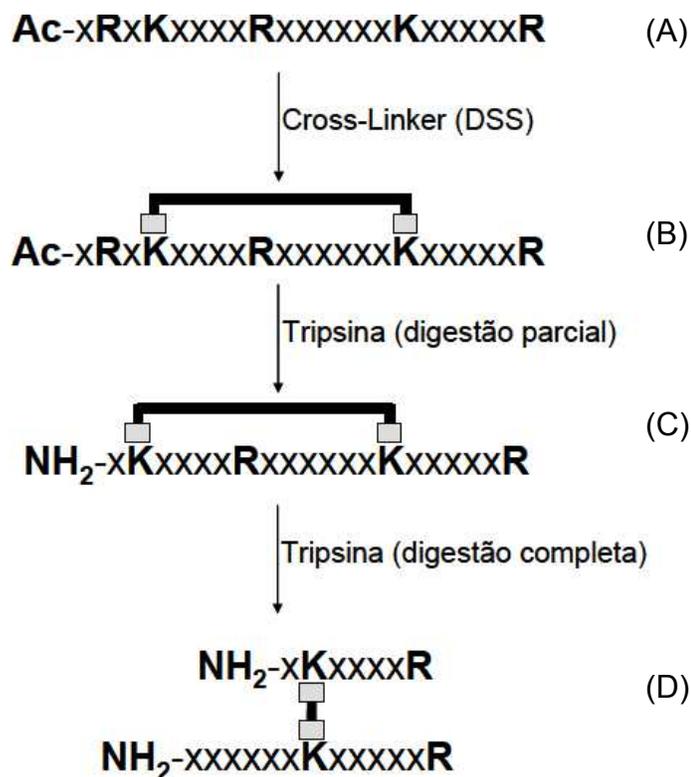
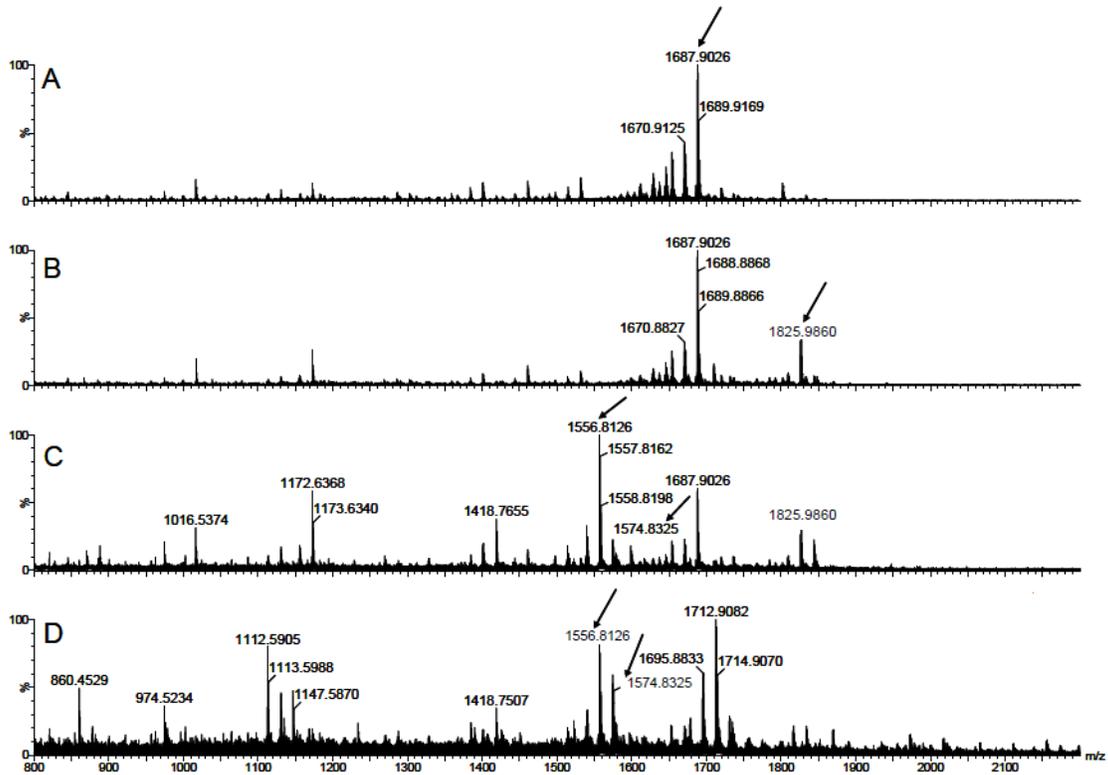


Figura 13. Esquema geral da reação dos peptídeos com ALC para a formação de espécies intra e intermoleculares. Partindo de um peptídeo linear, com sequência comum AC-xxRxxxKxxxRxxxKxxxR (A), onde x representa um número variável de qualquer aminoácido, exceto lisina (K) e arginina (R); após a reação com o ALC temos a formação de espécie intramolecular com N-terminal acetilado (B); seguida por digestão parcial com tripsina temos a formação de espécie intramolecular com N-terminal livre (C) e, finalmente, após digestão total com tripsina a formação de espécie intermolecular (D).

A utilização de diferentes peptídeos com seqüências aleatórias permitiu a atribuição inequívoca de vários íons fragmentos que seriam isóbaros no caso da utilização de seqüências com repetições de um mesmo aminoácido. Esses peptídeos também permitiram o estudo de fragmentações dependente da seqüência, ao mesmo tempo em que as posições fixas dos resíduos de lisina e arginina possibilitaram a formação tanto de espécies intra e intermoleculares em um único experimento e a partir de um único peptídeo precursor. Além disso, como as espécies intermoleculares são geradas a partir dos peptídeos intramoleculares, não é necessária a utilização de grandes concentrações de peptídeos nos experimentos, o que reduz significativamente os custos; de fato, a

concentração de peptídeo utilizada nesse trabalho é cerca de 200 vezes menor que o de experimentos descritos na literatura¹²⁴. A estratégia experimental para isso é extremamente simples: os peptídeos reagem com DSS (ou outro ALC) por 2 horas e após esse período é realizada a digestão enzimática com tripsina, onde o tempo da proteólise favorece a formação das espécies intra (1 h de digestão enzimática) ou intermoleculares (3 hs ou mais de digestão com tripsina).

Para ilustrar este procedimento estão ilustrados nas Figura 14, Figura 15, Figura 16 e Figura 17 os espectros de MALDI-MS dos peptídeos P3, P4, P5 e PX antes e depois da reação com o DSS, digestão com tripsina por 1 hora (P3, P4 e P5) e 3 horas. As espécies de interesse estão indicadas por setas. Pelos espectros é possível notar que o rendimento da reação com o DSS é dependente da seqüência dos peptídeos, sendo que enquanto para P3 o rendimento foi de aproximadamente 30%, a reação com PX converteu praticamente todo o material de partida no produto desejado. A formação de outras espécies, como peptídeos tipo *dead-end* também é afetada pela seqüência do peptídeo. Além disso, é possível observar que com diferentes tempos de digestão pode-se formar preferencialmente as espécies intra ou intermolecular, conforme esperado. Nota-se ainda que o controle do tempo de digestão com tripsina determina a presença majoritária de espécies intra ou intermoleculares, sendo que também esses rendimentos se mostraram dependentes da seqüência dos peptídeos. Esse comportamento é esperado visto que a cinética de digestão enzimática é mais rápida no resíduo de arginina exposto, gerando preferencialmente a espécie intramolecular não-bloqueada em menores intervalos de digestão.



Ac-ARKGCREVTKNDLR m/z 1687.9

↓
DSS

Ac-ARKGCREVTKNDLR m/z 1825.9

↓
Tripsina (1 hora)

NH₂-KGCREVTKNDLR m/z 1556.8

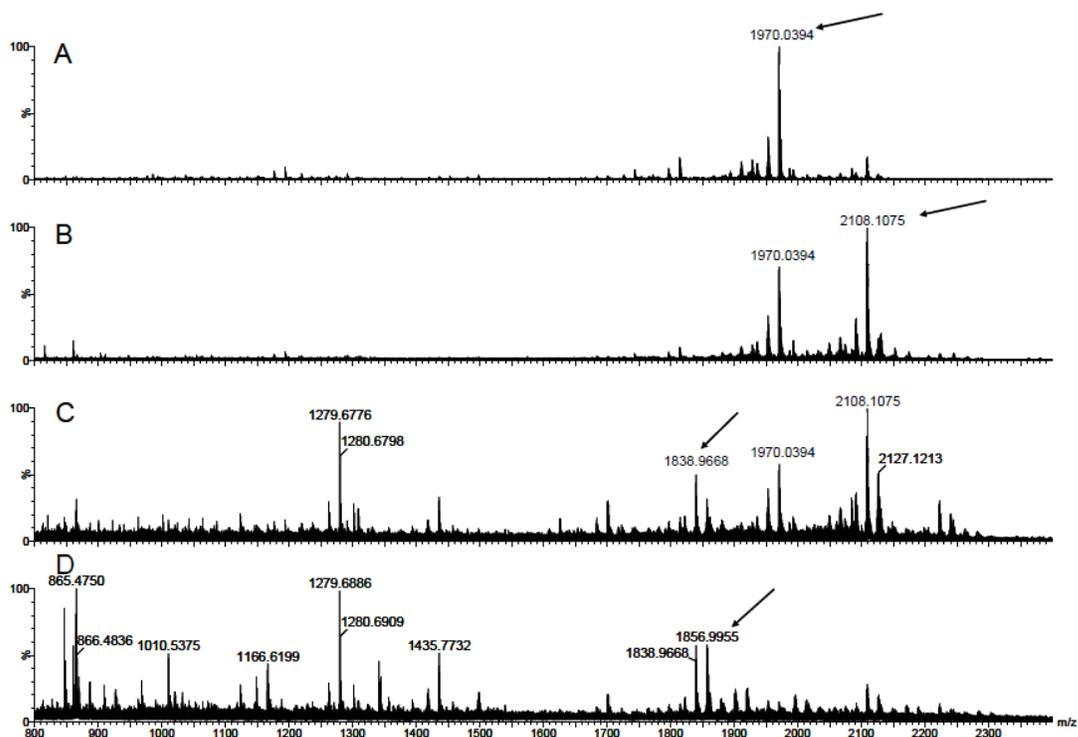
↓
Tripsina (3 horas)

NH₂-KGCR

m/z 1574.8

NH₂-EVTKNDLR

Figura 14. Espectros de MALDI-MS do peptídeo P3 intacto (A), após a reação com DSS (B) e digestão com tripsina por 1 hora (C) e 3 horas (D). Os íons assinalados com uma seta correspondem às espécies de interesse. Abaixo temos o esquema de reação com DSS e digestão enzimática para o peptídeo P3, e suas respectivas m/z .



Ac-ARYTKDLSQRAFKGMR m/z 1970.0

↓ DSS

Ac-ARYTKDLSQRAFKGMR m/z 2108.1

↓ Tripsina (1 hora)

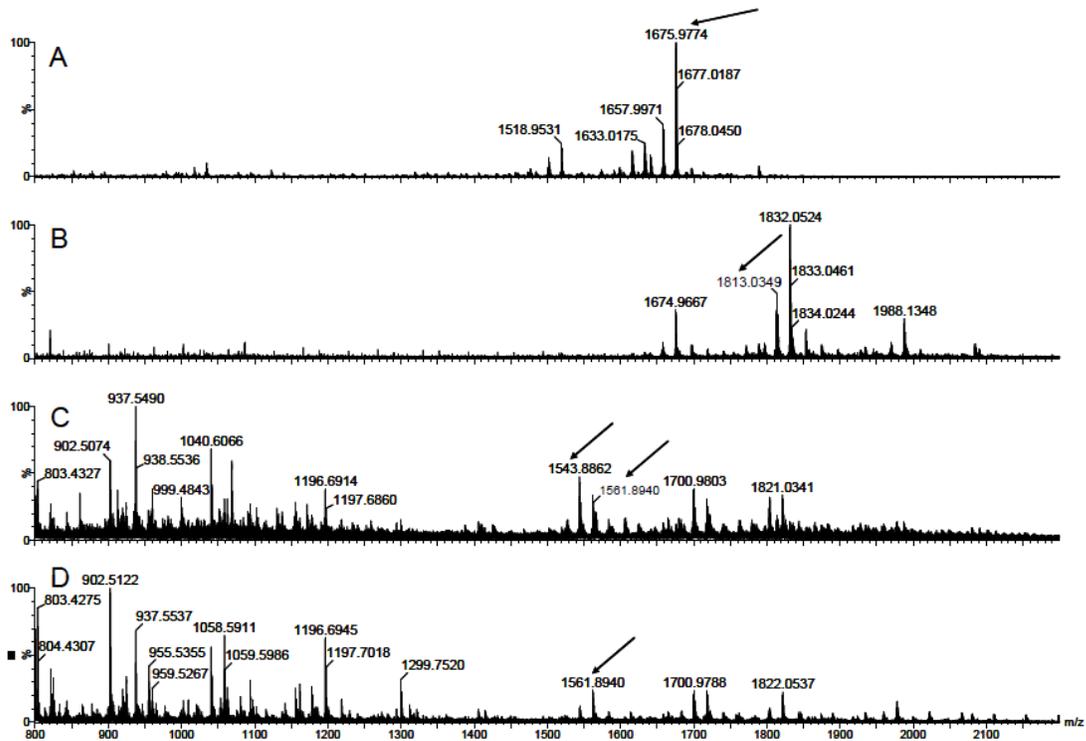
NH₂-YTKDLSQRAFKGMR m/z 1839.0

↓ Tripsina (3 horas)

NH₂-YTKDLSQR m/z 1857.0

NH₂-AFKGMR

Figura 15. Espectros de MALDI-MS do peptídeo P4 intacto (A), após a reação com DSS (B) e digestão com tripsina por 1 hora (C) e 3 horas (D). Os íons assinalados com uma seta correspondem às espécies de interesse. Abaixo temos o esquema de reação com DSS e digestão enzimática para o peptídeo P4, e suas respectivas m/z .



Ac-ARGKWPREVKIHR m/z 1674.9

DSS

Ac-ARGKWPREVKIHR m/z 1813.0

Tripsina (1 hora)

NH₂-GKWPREVKIHR m/z 1543.9

Tripsina (3 horas)

NH₂-GKWPR

m/z 1561.9

NH₂-EVKIHR

Figura 16. Espectros de MALDI-MS do peptídeo P5 intacto (A), após a reação com DSS (B) e digestão com tripsina por 1 hora (C) e 3 horas (D). Os íons assinalados com uma seta correspondem às espécies de interesse. Abaixo temos o esquema de reação com DSS e digestão enzimática para o peptídeo P5, e suas respectivas m/z .

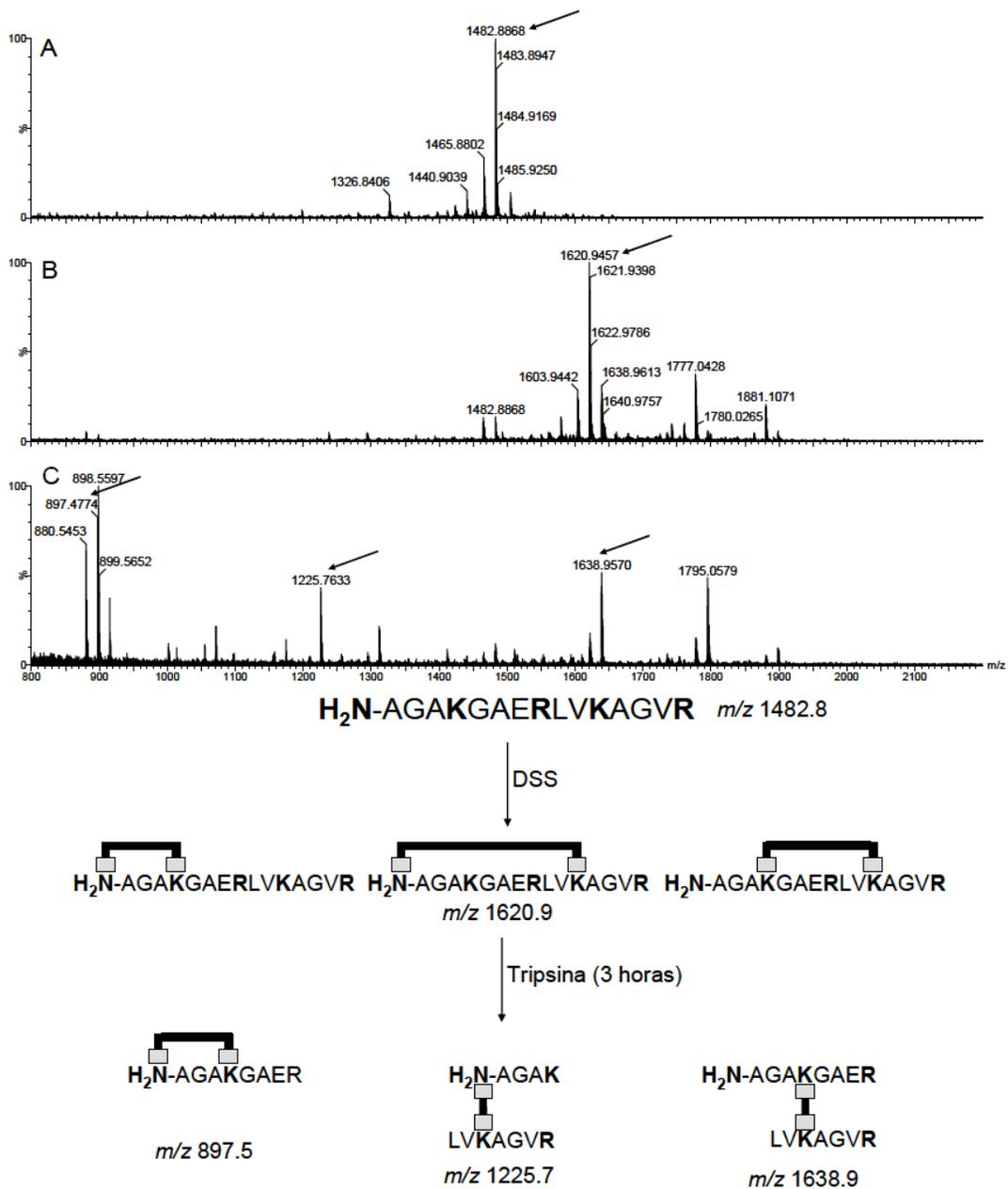


Figura 17. Espectros de MALDI-MS do peptídeo PX intacto (A), após a reação com DSS (B) e digestão com tripsina por 3 horas (C). Os íons assinalados com uma seta correspondem às espécies de interesse. Abaixo temos o esquema de reação com DSS e digestão enzimática para o peptídeo PX, e suas respectivas *m/z*.

Nesse ponto, é importante notar que existe a possibilidade da formação de espécies isóbaras que poderiam interferir no estudo de fragmentação das moléculas de interesse. No caso da formação das espécies intermoleculares, pode haver coincidência de massas para todos os peptídeos entre as espécies

intermoleculares, cuja digestão ocorreu em todos os sítios trípticos não modificados e espécies *dead-end*, onde a modificação se encontra em uma das lisinas e na qual a digestão ocorreu somente no primeiro resíduo tríptico (R em todos os casos). Essa coincidência está exemplificada na Figura 18 para o P3.

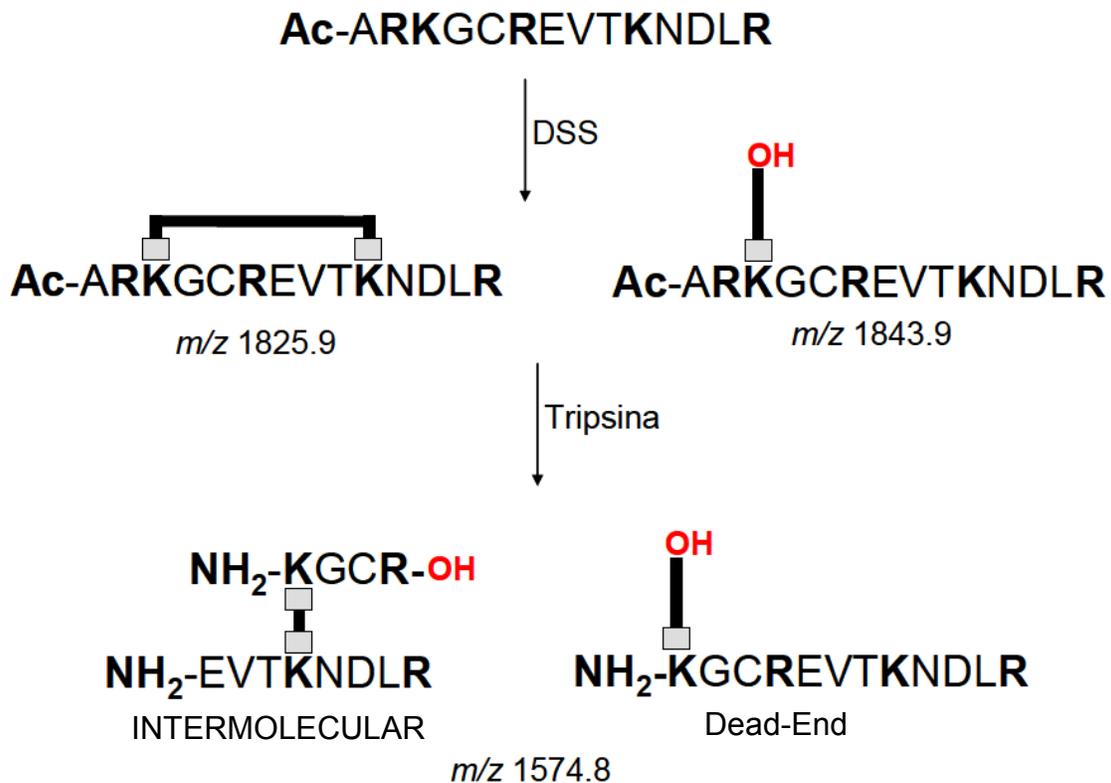


Figura 18. Exemplo de possível coincidência de massas para o peptídeo P3 entre as espécies intermolecular e *dead-end*.

Essa possibilidade não pode ser descartada em princípio, uma vez que em todos os espectros, após a reação com DSS (Figura 14B a Figura 17B) é possível observar a formação de peptídeos do tipo *dead-end*, com intensidades relativas que variam de 10% (P3) a 100% (P5). Entretanto, existem motivos para que se possa afirmar que essas coincidências não acontecem utilizando o procedimento experimental descrito anteriormente. No caso de P1 por exemplo, de modo a obter a espécie *dead-end* isóbara ao peptídeo intermolecular de interesse (*m/z* 1574.8) seria necessário que o peptídeo *dead-end* inicial (*m/z*

1843.9) mantivesse intacto à digestão com tripsina por 3 horas tendo como único sítio de clivagem digerido a primeira arginina (Figura 18). Qualquer outro produto de digestão em um sítio tríptico levaria a formação de uma espécie *dead-end* com diferente m/z . Além disso, o espectro de dissociação do peptídeo intermolecular após 16 horas de digestão é idêntico ao espectro do mesmo íon após 3h de digestão, o que indica que estes íons correspondem à espécie intermolecular.

4.1.2. Fragmentação de Espécies Intramoleculares por CID

Espécies intramoleculares são relativamente comuns em experimentos de ligação cruzada de proteínas, uma vez que, após a reação com o ALC, sua estrutura torna-se mais rígida, tornando a digestão enzimática um pouco mais difícil que o normal. Como resultado, espécies intramoleculares, formadas por peptídeos grandes, muitas vezes contendo sítios de clivagem enzimática, acabam sendo observadas com frequência.

Além disso, outra espécie que deve estar presente em experimentos de ligação cruzada, mas pouco estudada, corresponde à reação entre o ALC e a porção N-terminal da proteína. De modo geral essa parte da proteína é flexível e conhecendo quais resíduos estão próximos a ela podemos ter informação sobre como essa porção está presente na estrutura da proteína.

Na Figura 19 temos os espectros de MALDI-MS/MS das espécies intramoleculares formadas a partir dos peptídeos P3, P4 e P5. As estruturas de cada uma dessas espécies e os íons fragmentos atribuídos estão presentes em seus respectivos espectros. A nomenclatura utilizada para atribuição dos íons fragmentos foi utilizada conforme Schilling e colaboradores⁹¹.

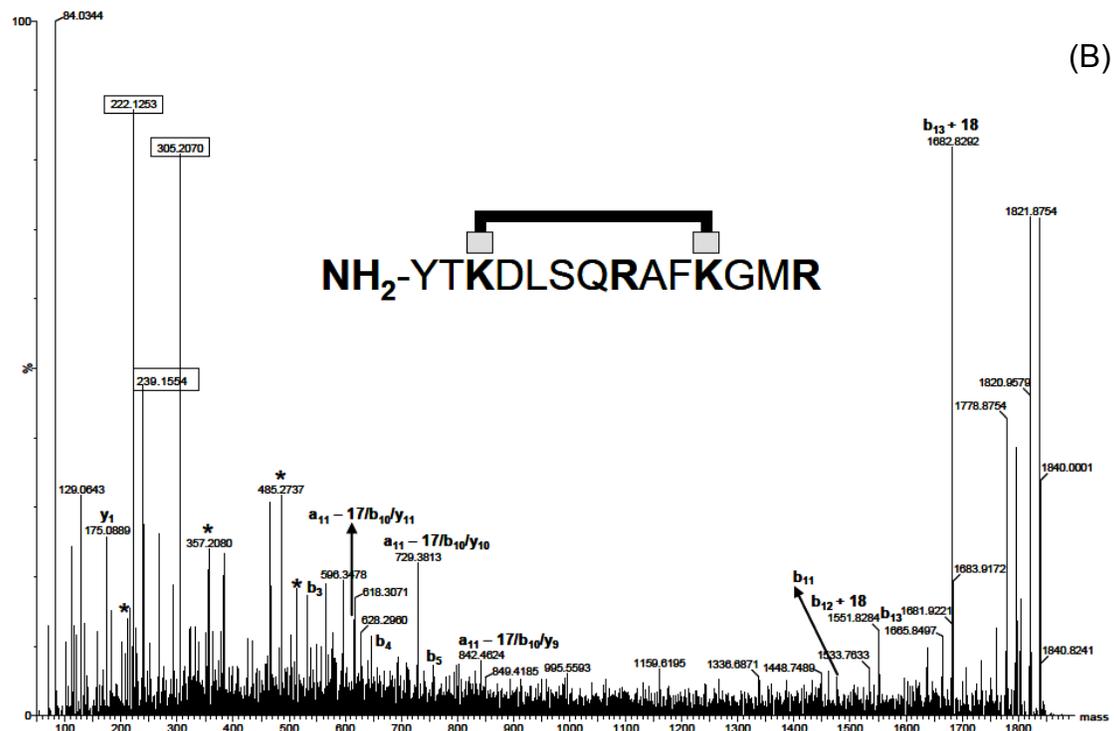
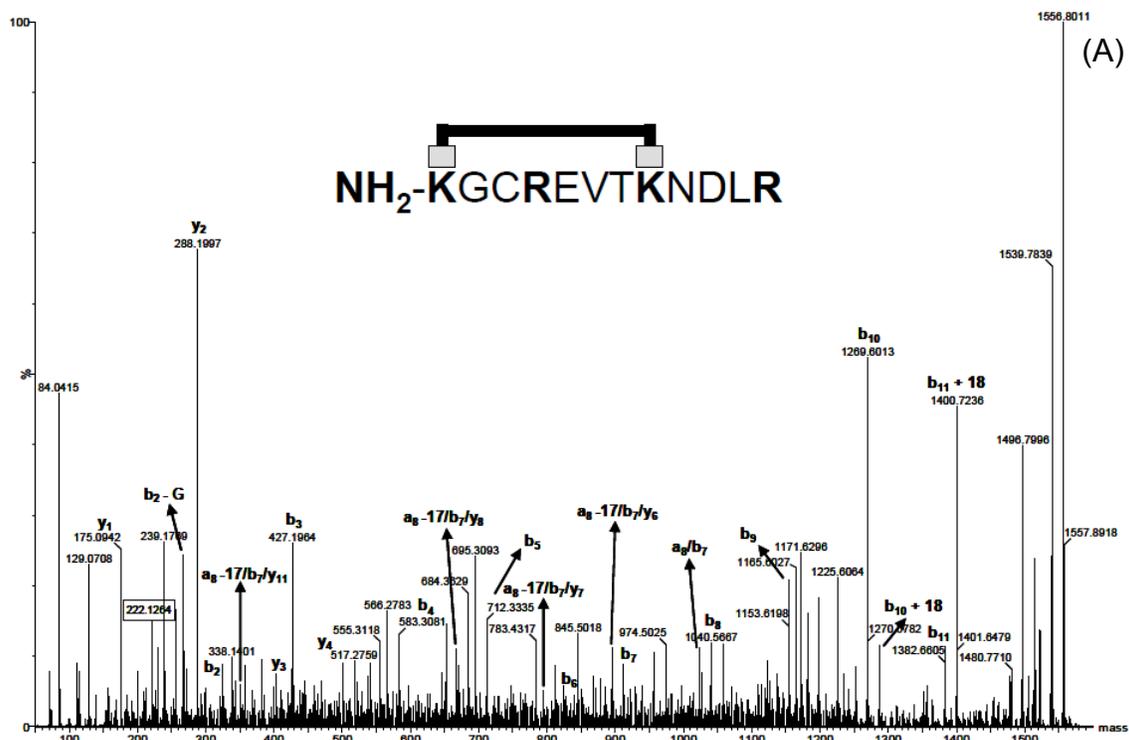


Figura 19. (Continua).

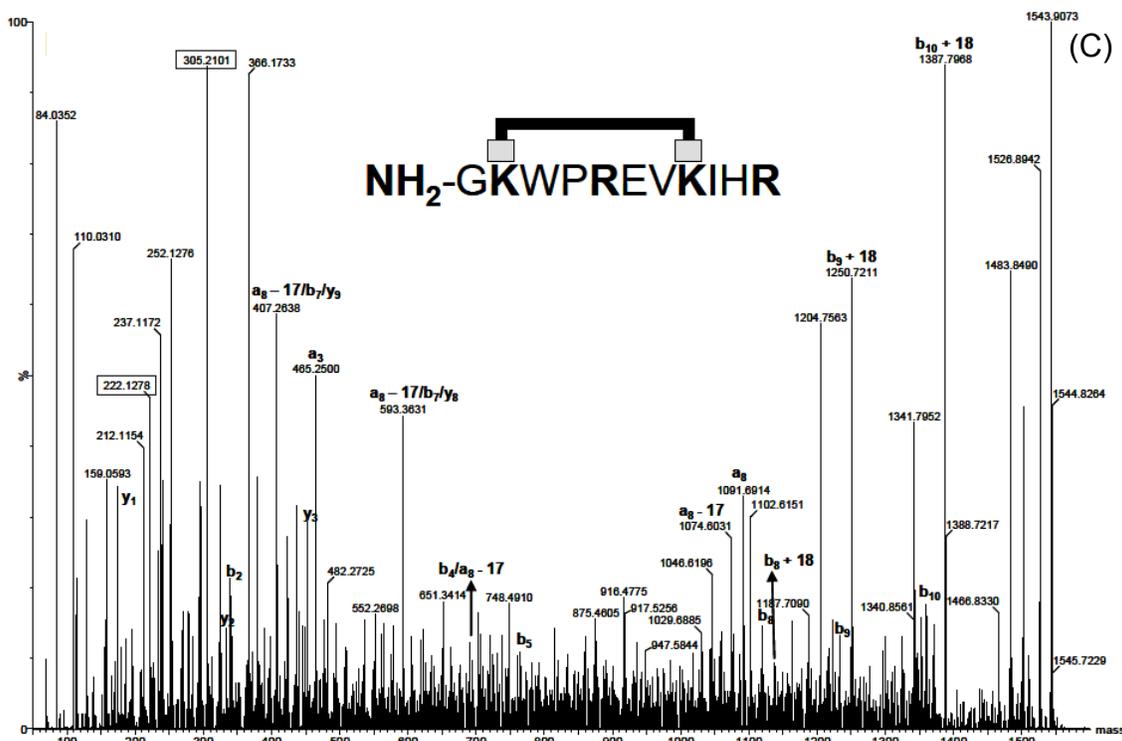


Figura 19. Espectros de MALDI-MS/MS das espécies P3 (A), P4 (B) e P5 (C). As estruturas de cada uma dessas espécies e os íons atribuídos estão presentes em seus respectivos espectros. A formação dos íons fragmentos de m/z 222, 239 e 305 (circulados) está descrita no texto. Íons marcados com * são fragmentos internos.

Espécies intramoleculares formadas a partir de ALCs derivados de ésteres de NHS, como o DSS utilizado neste estudo, podem comportar-se como peptídeos cíclicos e lineares, uma vez que a reação entre o DSS e a Lys forma outra ligação amida. Desse modo, foi verificado que a reação ocorre em duas etapas: primeiro na porção linear e, posteriormente, na porção cíclica do peptídeo modificado. Íons fragmentos gerados a partir da porção linear de cada peptídeo (como na porção NDLR do peptídeo P3) são íons **b** e **y** convencionais.

Quando a fragmentação atinge a porção cíclica do peptídeo modificado, ela pode seguir por dois caminhos, uma vez que a ligação peptídeo-DSS é também uma ligação amida: i) na ligação DSS/Lys ou ii) na cadeia do peptídeo. Se a fragmentação ocorrer na ligação DSS/Lys, o DSS passa a se comportar como uma extensão da cadeia lateral da lisina, e a fragmentação deve continuar de forma convencional, ao longo da cadeia peptídica, conforme ilustrado Figura 20, para o peptídeo P3. No caso do peptídeo P3, onde o primeiro resíduo é a

Lys (responsável pela ligação com o DSS), o fragmento de m/z 267,1, referente ao íon y_1 pode ser facilmente verificada; os outros íons dessa sequência, provenientes do caminho da fragmentação onde a clivagem ocorreu entre a Lys e o DSS, também estão presentes (y_2 : 324,1; y_3 : 427,2; y_4 : 583,3; y_5 : 712,3; y_6 : 811,4 e y_7 : 912,5). Íons referentes a este caminho de fragmentação também estão presentes nos espectros dos peptídeos P4 e P5, mas com intensidades inferiores ao P3. O relato deste caminho de fragmentação é de extrema relevância, pois, uma vez que a modificação por DSS pode se comportar como uma modificação convencional da cadeia lateral de um resíduo (no caso a Lys), a identificação destas espécies pode ser facilitada pelo uso de ferramentas de busca em banco de dados, utilizando o DSS como uma modificação da Lys.

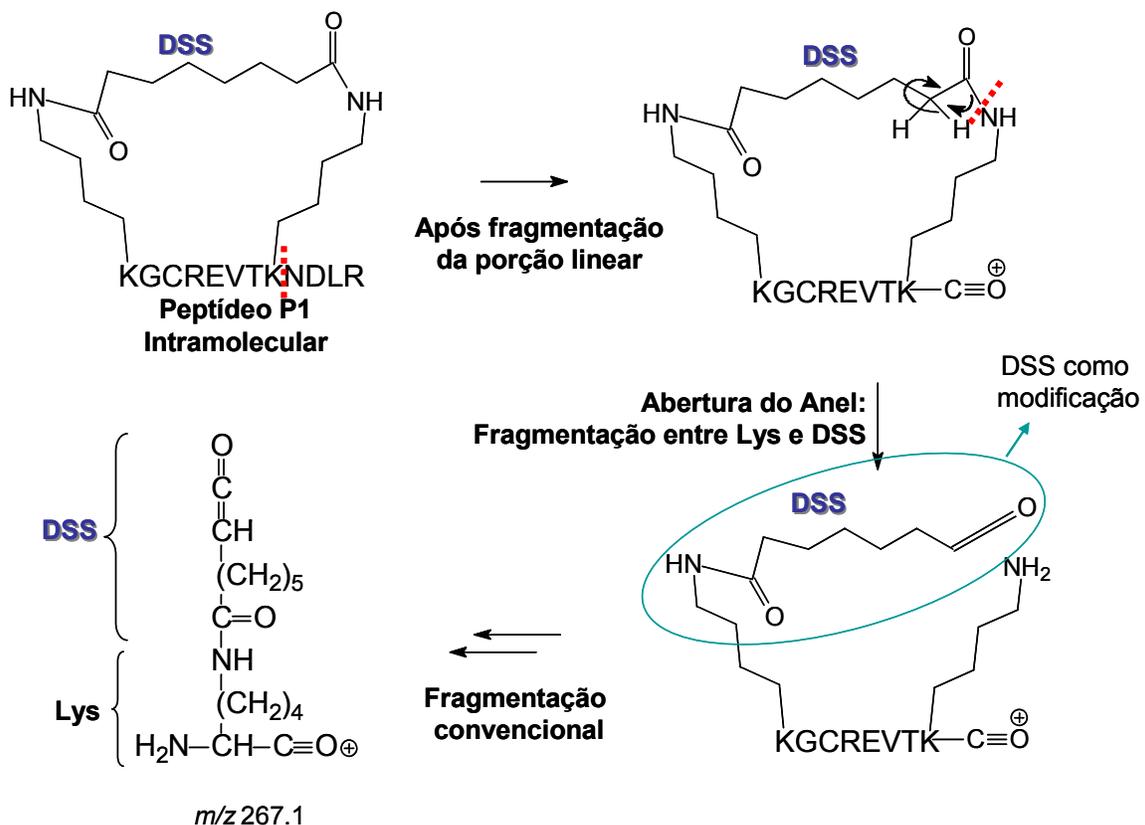


Figura 20. Caminho de fragmentação presente em espécies intramoleculares onde a fragmentação ocorre entre a Lys e o ALC (no caso DSS). O peptídeo P3 foi utilizado como exemplo. Primeiro a fragmentação deve ocorrer na porção linear do peptídeo e, uma vez que atinge a porção cíclica, ocorre a clivagem entre a ligação DSS/Lys e fragmentação segue pela sequência do peptídeo, onde o DSS comporta-se como uma extensão da cadeia lateral da Lys.

No outro caminho, a fragmentação ocorre ao longo da cadeia peptídica, mantendo as duas Lys conectadas pelo DSS (Figura 21). Tendo o peptídeo P3 como representativo, o íon de m/z 1040,5 (Figura 19A) refere-se ao fragmento atribuído a ambos os resíduos de Lys conectados pelo DSS. Uma vez que a fragmentação atinge a porção cíclica da molécula, a dissociação segue pela cadeia peptídica, e ocorre a abertura do anel macrocíclico, conforme ilustrado na Figura 21. O nitrogênio ϵ da Lys ataca o carbono α do mesmo resíduo, levando a formação de um anel de seis membros. Esse anel contém um grupo amina, proveniente do nitrogênio α , que pode ser perdido em forma de NH_3 , levando a formação de um anel tetrahidropiridina (representado daqui por diante nos espectros por {K}). A fragmentação ocorre ao longo dos demais resíduos, até levar aos íons fragmentos de m/z 222,1; 239,2 e 305,2. É importante notar que esses íons são compostos pelo DSS e lisina, sendo que a presença deles é um indicativo da cadeia do DSS ligada à resíduos de lisina. Não existe nenhum íon **b**, **a** ou **y**, proveniente dos 20 aminoácidos naturais que possua a mesma m/z desses três íons, reforçando ainda mais a capacidade que desses fragmentos de serem utilizados como diagnósticos da presença de espécies modificadas por DSS. Os íons de m/z 222,1 foi primeiramente observado por Seebacher e colaboradores¹²⁵, mas o mecanismo de formação não foi proposto. Não há relatos anteriores para os outros dois íons fragmentos (239,2 e 305,2). O íon de m/z 305,2 é 83,1 Da maior que o de m/z 222,1 e contém em sua estrutura dois anéis tetrahidropiridina provenientes das duas Lys ligadas pelo DSS; m/z 222,1 contém um anel tetrahidropiridina de uma das Lys ligado ao DSS e 239,2 refere-se ao anel tetrahidropiridina com um grupo NH_2 de uma das Lys ligado ao DSS.

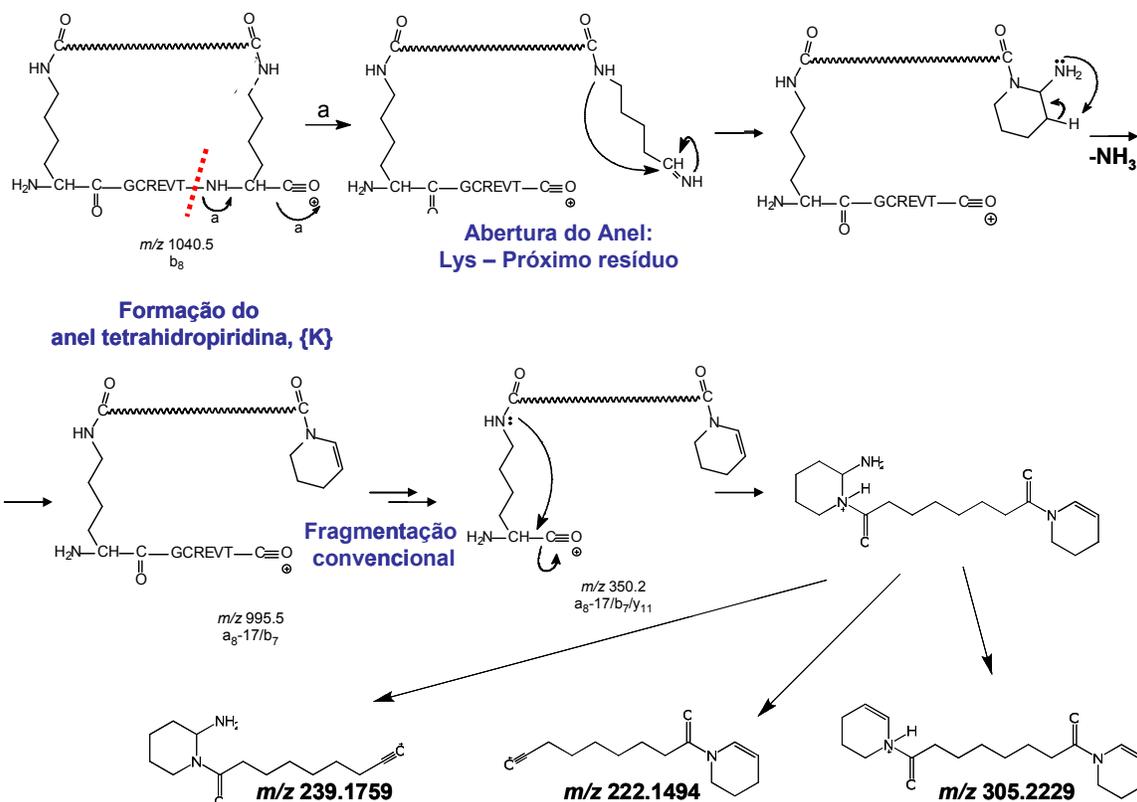


Figura 21. Caminho de fragmentação presente em espécies intramoleculares onde a fragmentação ocorre entre a Lys e o resíduo adjacente (ao longo da cadeia peptídica). Nesse caso ambas Lys permanecem conectadas pelo DSS. O peptídeo P3 foi utilizado como exemplo. Temos a ciclização da Lys, levando ao anel tetrahidropiridina (representado por {K}). Esse caminho de fragmentação levou a identificação dos íons diagnósticos de espécies modificadas por DSS, de m/z 222,1; 239,2 e 305,2.

Embora ambos os caminhos de fragmentação estejam presentes para os três peptídeos estudados, a preferência por um destes caminhos é dependente da sequência do peptídeo: enquanto para P3 a clivagem entre o DSS/Lys é preferencial, para P4 e P5 a fragmentação ao longo da cadeia peptídica, deixando as Lys unidas pelo DSS foi o caminho seguido de forma a gerar fragmentos mais intensos.

Para o estudo da espécie intramolecular formada entre o N-terminal e Lys, utilizamos o peptídeo PX que possui o N-terminal livre, diferente dos outros, que possuem o N-terminal acetilado. A espécie intramolecular de PX estudada foi previamente mostrada Figura 17, com $[M+H]^+$ de m/z 897,5. O espectro de MALDI-MS/MS está ilustrado na Figura 22. Neste espectro é possível verificar a presença do íon fragmento de m/z 464,2; referente ao íon b_4 , que contém a

porção cíclica da espécie intramolecular. A fragmentação deste íon leva a perda de CO, NH₃ e os demais resíduos, até a formação do íon de m/z 222. Neste caso, o mecanismo alternativo, onde ocorre a clivagem entre o DSS e a Lys é praticamente ausente. Outra característica interessante dessa espécie é a ausência do íon fragmento de m/z 305, pois, como mostrado previamente, este íon é derivado da união de duas lisinas pelo DSS e, nesta espécie, a ligação do DSS ocorre entre uma lisina e o N-terminal do peptídeo.

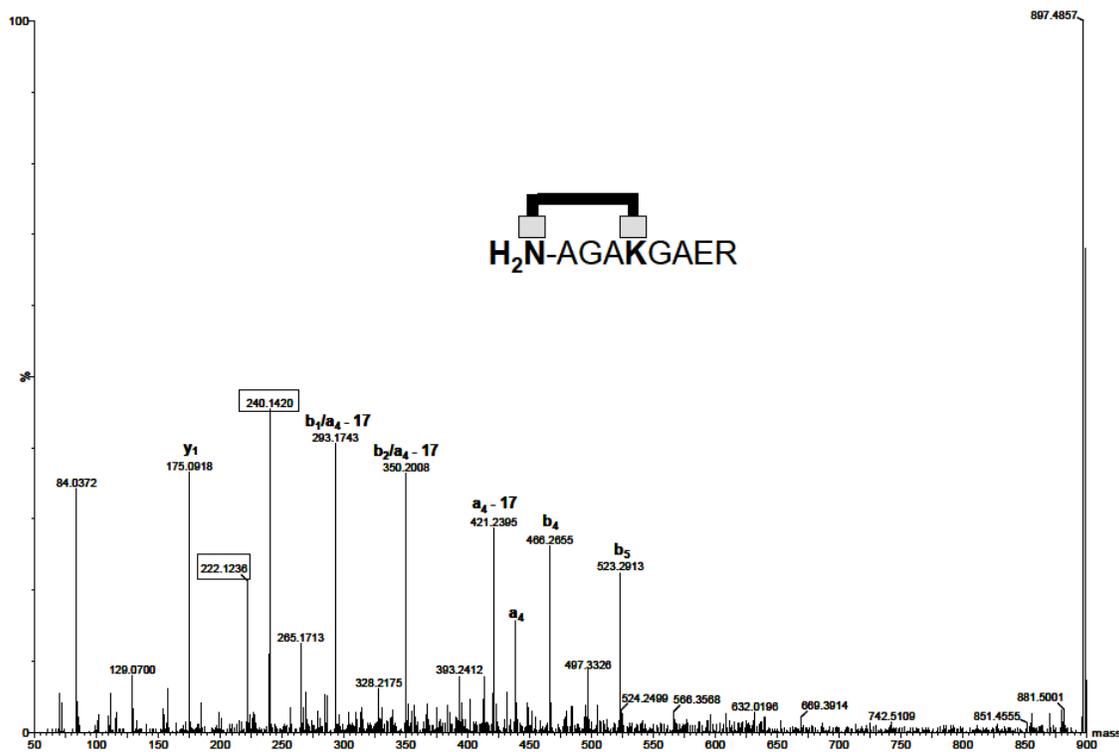


Figura 22. Espectro de MALDI-MS/MS da espécie intramolecular envolvendo uma Lys e o N-terminal do peptídeo PX.

Como consideração em relação as espécies intramoleculares foi possível notar que, uma vez que a fragmentação atinge a porção cíclica do peptídeo modificado, ela pode seguir por dois caminhos competitivos, que depende da sequência do peptídeo. Além disso, a presença de íons diagnósticos (m/z 222,1; 239,2 e 305,2), capazes de auxiliar na identificação de espécies modificadas por DSS foi notada.

O trabalho referente ao estudo de fragmentação de espécies intramoleculares foi publicado no *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*¹²⁶.

4.1.3. Estudo de Espécies Intermoleculares

Como dito anteriormente, espécies intermoleculares, provenientes de experimentos de ligação cruzada de proteínas, foram reportados na literatura como os de mais difícil interpretação¹²⁴, visto que os fragmentos podem ser oriundos de uma ou ambas as cadeias, além da possibilidade da ruptura das ligações do próprio ALC. Esses peptídeos são extremamente interessantes do ponto de vista estrutural, uma vez que conectam resíduos de lisinas distantes na estrutura primária da proteína ou de diferentes proteínas. Desse modo, essas informações são extremamente úteis tanto na determinação do tipo de enovelamento de uma proteína bem como na elucidação da topologia de complexos protéicos.

Para os experimentos de MALDI e ESI-MS/MS de espécies intermoleculares os seguintes peptídeos foram levados em consideração: P1, P2, P3, P4 e PX. Como ALCs, foram utilizados DSS, DSSeb e DSG. Com exceção de PX, todos os outros peptídeos possuem o N-terminal acetilado e, conseqüentemente, o sítio reativo frente aos ALCs devem ser as lisinas. No caso do PX, conforme ilustrado na Figura 17, o N-terminal livre permite a formação de duas diferentes espécies intermoleculares após a digestão, que serão denominadas PX1 (peptídeo intermolecular conectado por duas K de m/z 1638.9) e PX2 (peptídeo intermolecular conectado via K e N-terminal, m/z 1225.7). PX2 representa uma espécie intermolecular formada entre o N-terminal da proteína e um resíduo de lisina e, embora a fragmentação desse tipo tenha sido negligenciada na literatura, sua ocorrência em experimentos de ligação cruzada de proteínas deve ser muito comum, visto que em geral o N-terminal das proteínas é muito flexível. As espécies intermoleculares utilizadas neste caso foram obtidas de forma similar às espécies intramoleculares, empregando um tempo maior de digestão enzimática (3 h). Na Figura 23 temos um esquema

ilustrando a obtenção das espécies intermoleculares utilizadas neste estudo. As m/z presentes na Figura 23 correspondem a espécies intermoleculares formadas utilizando DSS como ALC; os análogos, formado com DSSeb e DSG, apresentam +28 Da e -42Da, respectivamente.

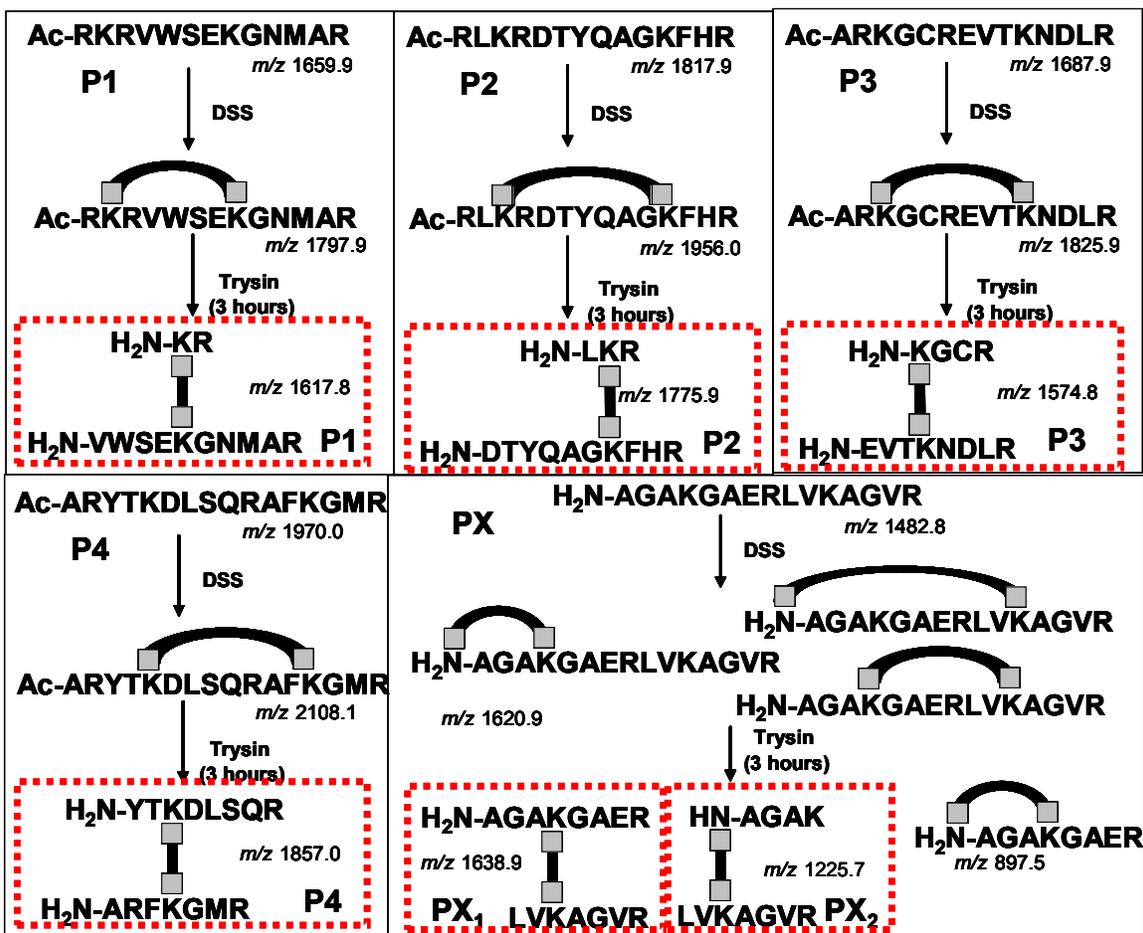


Figura 23. Formação de espécies intermoleculares a partir dos peptídeos P1, P2, P3, P4, PX1 e PX2. As m/z ilustradas aqui são referentes ao uso do DSS como ALC.

Além das espécies de interesse, indicadas por setas no espectro de MALDI-MS da Figura 24, é notada a presença de outros íons. Íons de m/z maiores do que as espécies intermoleculares de interesse são atribuídos, principalmente, a formação de espécies contendo dois ALCs hidrolisados (duplo *dead-end*), por exemplo, o íon de m/z 1794,5 em PX; 1773,8 para P1 e 1730,0 para P3. No caso de PX, o íon de m/z 1897,6 foi atribuído a dois *dead-ends*, um deles proveniente da hidrólise enquanto no outro, a porção do ALC que não

reagiu com o peptídeo não foi hidrolisada mas sofreu ataque do Tris (será discutido abaixo). A presença de íons de m/z menores do que as espécies intermoleculares de interesse referem-se ao peptídeo intacto, como no caso de m/z 1482,4 para PX, espécies intramoleculares, como de m/z 1620,9 para PX; m/z 1556,8 para P3 e 1838,9 para P4; ou espécies do tipo *dead-end*, derivadas de fragmentos do peptídeo intacto, após a digestão enzimática, como o íon de m/z 1434,7 de P4, atribuído a sequência Ac-ARYTKDLSQR, onde ao Lys foi modificada pelo ALC hidrolisado. É importante notar que, como os peptídeos possuem pelo menos três sítios de clivagem enzimática, pelo menos três pequenas espécies *dead-ends* para cada um dos peptídeos podem ser observadas e, levando em consideração uma digestão enzimática incompleta, esse número pode ser ainda maior. Observando os espectros de MALDI-MS da Figura 24 é possível notar a complexidade das amostras.

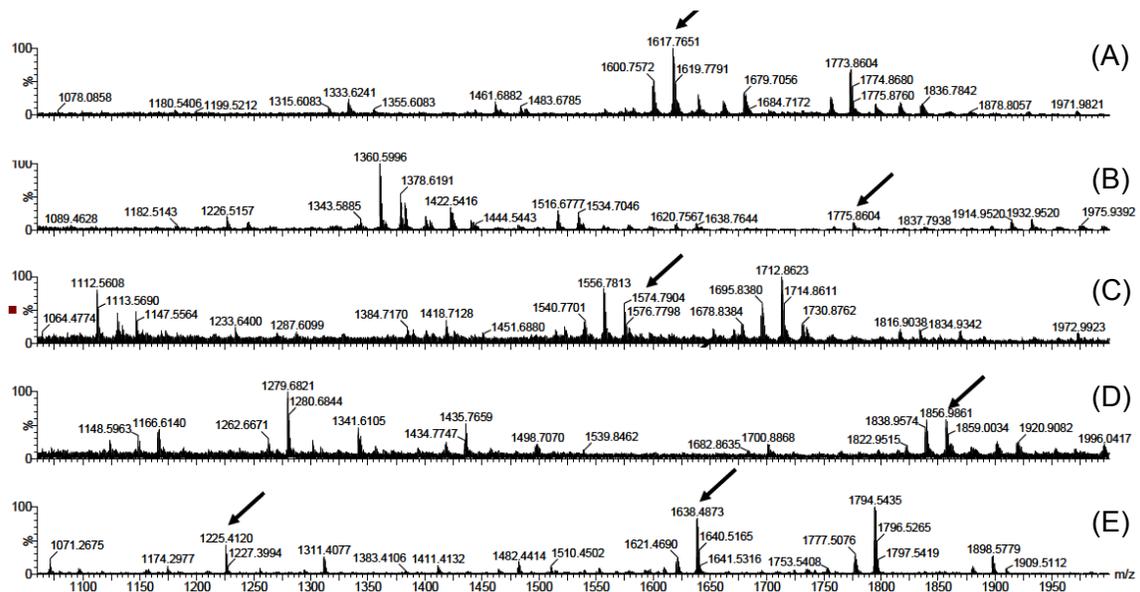


Figura 24. Espectro de MALDI-MS dos peptídeos P1 (A), P2 (B), P3 (C), P4 (D) e PX(D). As setas indicam as m/z referente às espécies intermoleculares formadas a partir destes peptídeos.

Como previamente discutido, espécies do tipo *dead-end* são geradas pela hidrólise da porção do ALC que não reagiu com o peptídeo e, quando utilizando DSS, acarreta em uma modificação de +156 Da em relação a massa do peptídeo. No entanto, como brevemente mencionado acima, é possível que,

ao invés da hidrólise, a porção do ALC que não reagiu com o peptídeo sofra um ataque nucleofílico proporcionado por uma molécula de Tris, presente no tampão utilizado para parar a reação entre o ALC e o peptídeo. Esse tipo de *dead-end*, quando utilizando DSS, acarreta em uma modificação de +259 Da em relação à massa do peptídeo não modificado. Desse modo, existe uma competição entre H₂O e Tris, capaz de gerar dois tipos de *dead-end*, aumentando ainda mais a complexidade das amostras. Na Figura 25 temos o espectro de MALDI-MS do peptídeo PX onde, após a reação com DSS (mas antes da digestão enzimática), temos a presença desses dois *dead-ends*, de *m/z* 1638,8 e 1741,9 para o produto hidrolisado e que sofreu ataque por Tris, respectivamente.

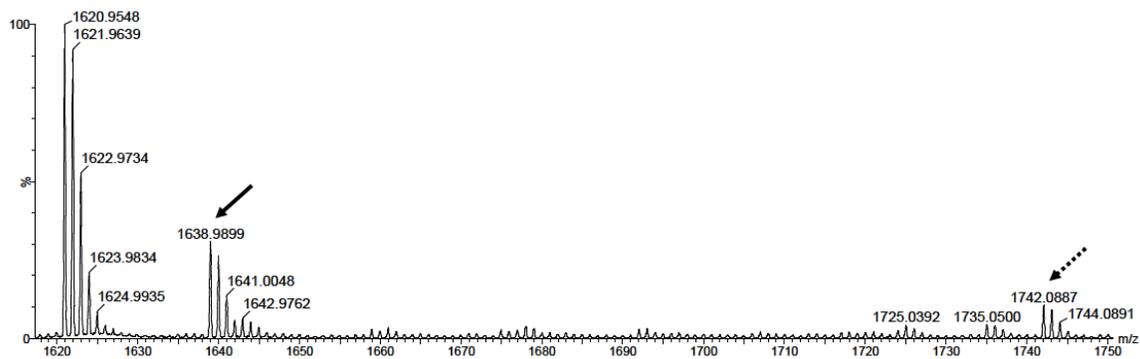


Figura 25. Espectro de MALDI-MS do peptídeo PX, onde temos as espécies de *dead-end* formada pela hidrólise (*m/z* 1638,9) e após o ataque por Tris (*m/z* 1742,1).

A presença de espécies intermoleculares formadas a partir da reação de ligação cruzada entre dois peptídeos não foi observada. Como previamente reportado¹²⁴, para que haja esse tipo de reação uma concentração de peptídeo maior do que a utilizada (que foi de 40 μ M) é necessária, algo em torno de 4 mM.

4.1.4. Fragmentação de Espécies Intermoleculares por ESI-MS/MS utilizando CID

ESI e MALDI foram utilizados como fontes de ionização para os estudos de fragmentação de espécies intermoleculares. Os estados de carga mais intensos de cada uma das espécies intermoleculares foram selecionados para os experimentos de CID utilizando ESI. Os espectros anotados de ESI-MS/MS das espécies intermoleculares, utilizando DSS como ALC, dos peptídeos P1 (m/z 539,9; $[M+3H]^{3+}$), P2 (m/z 592,6; $[M+3H]^{3+}$), P3 (m/z 787,9; $[M+2H]^{2+}$), P4 (m/z 928,9; $[M+2H]^{2+}$), PX1 (m/z 546,9, $[M+3H]^{3+}$) e PX2 (m/z 613,4; $[M+2H]^{2+}$) estão presentes na Figura 26.

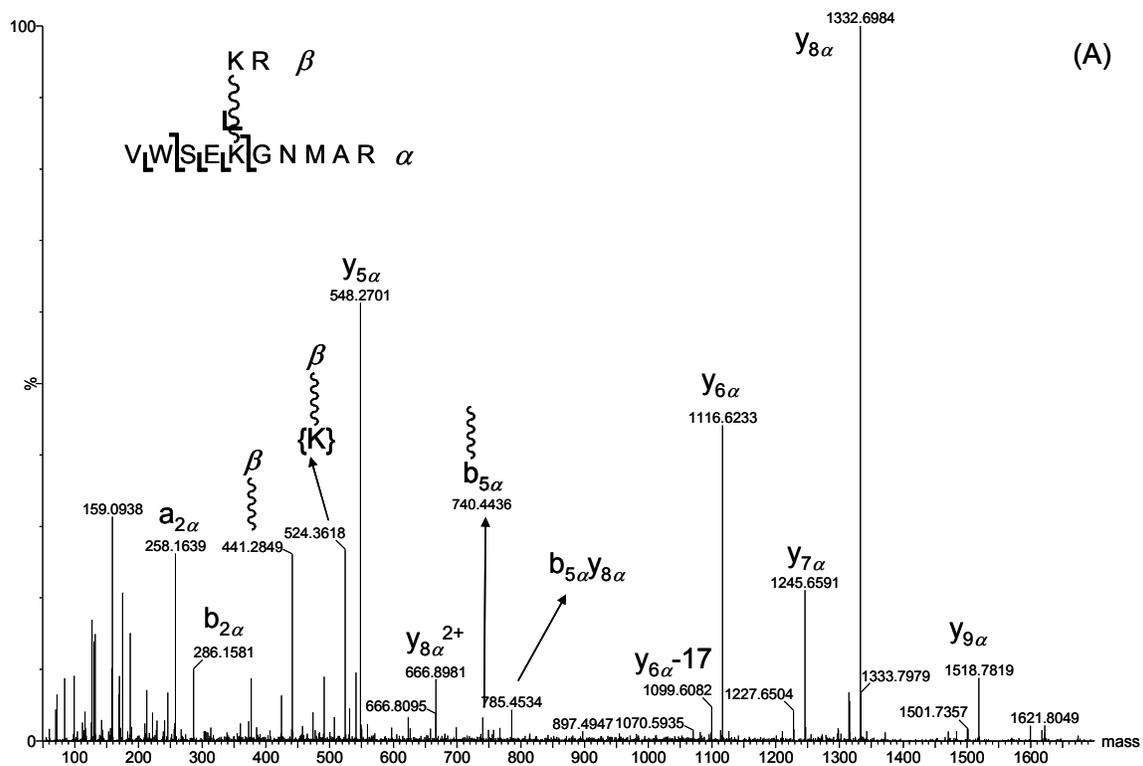


Figura 26. (Continua).

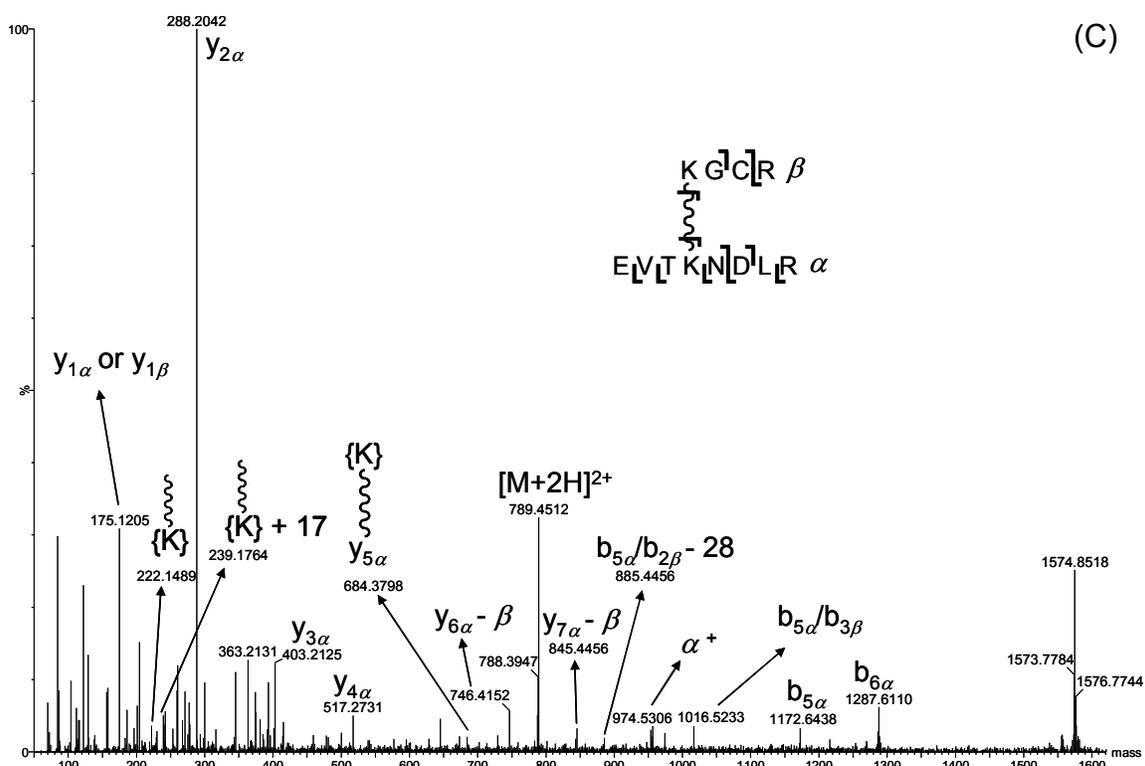
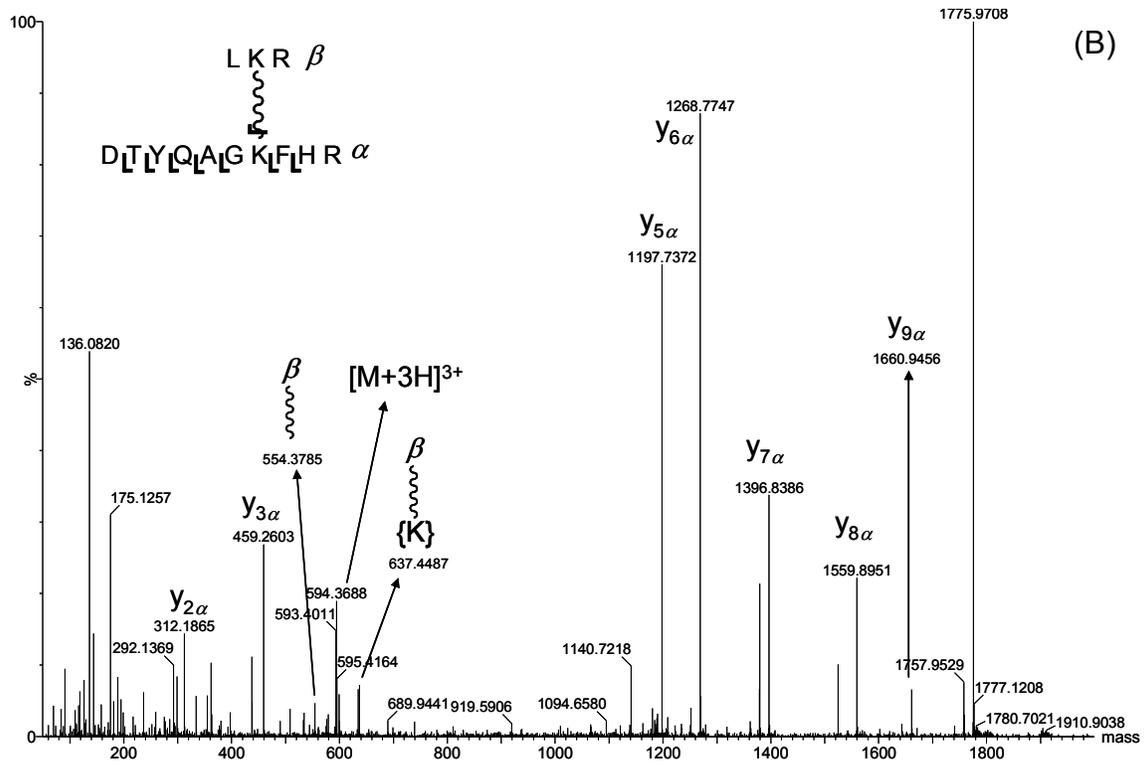


Figura 26. (Continua).

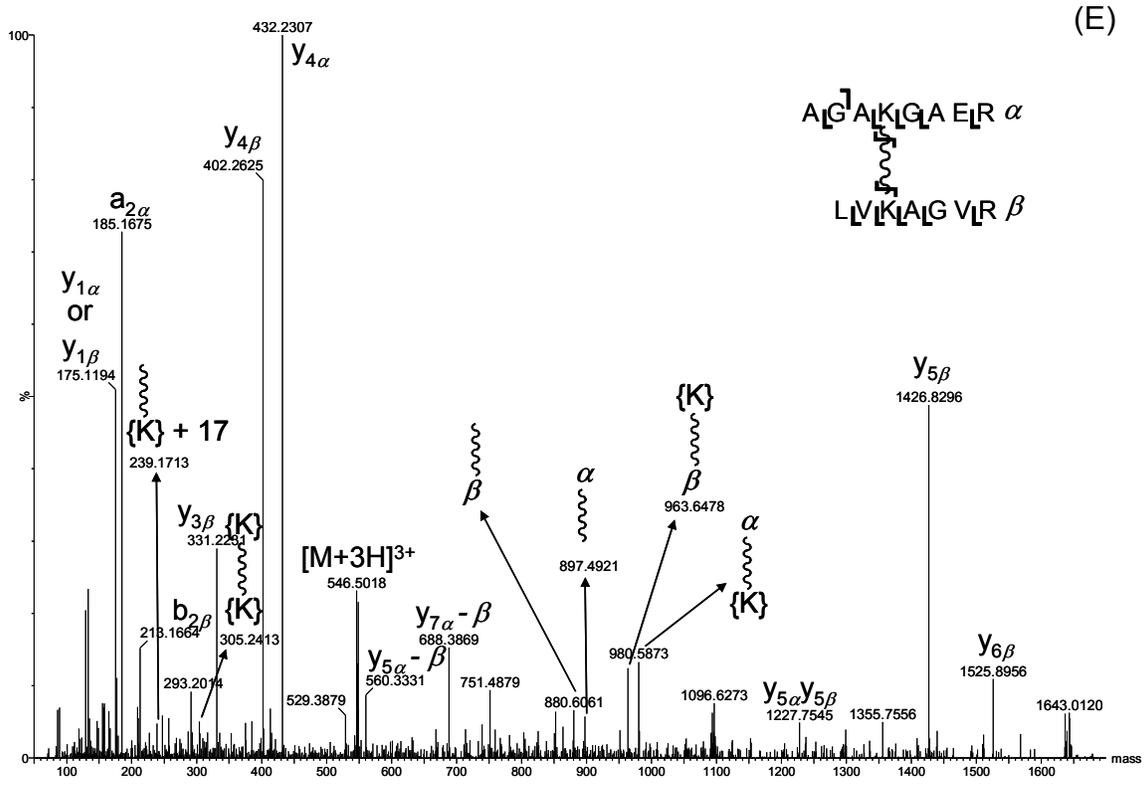
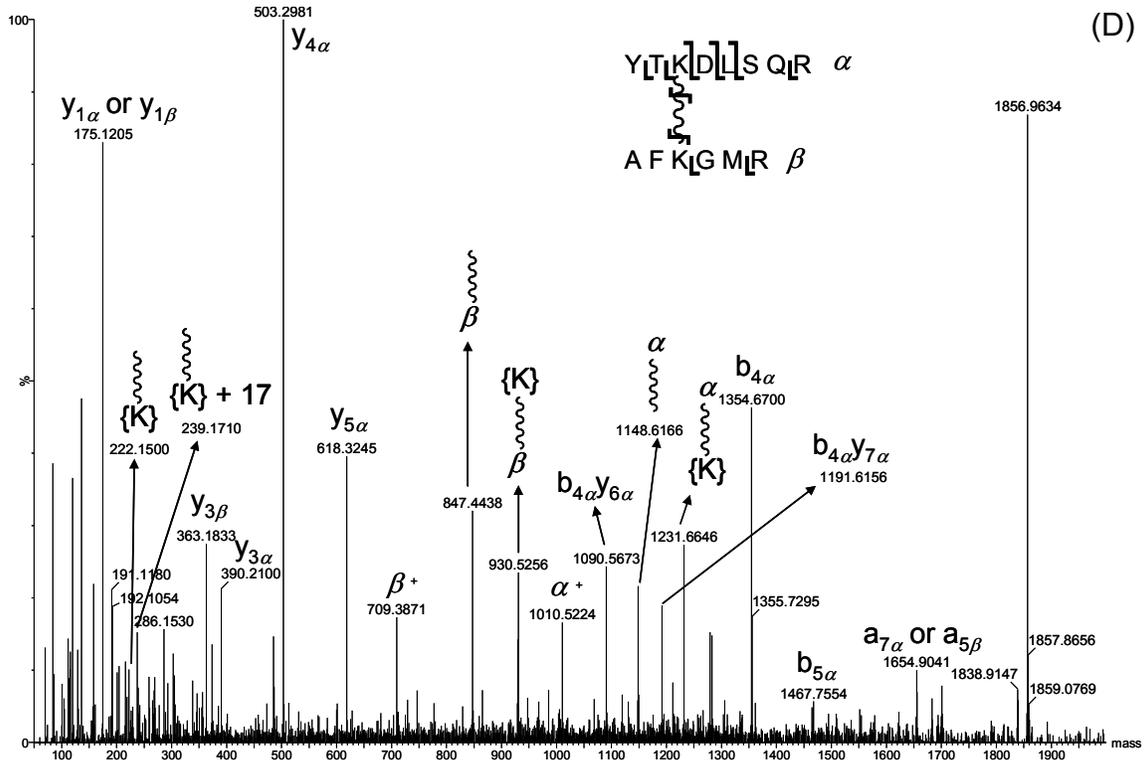


Figura 26. (Continua).

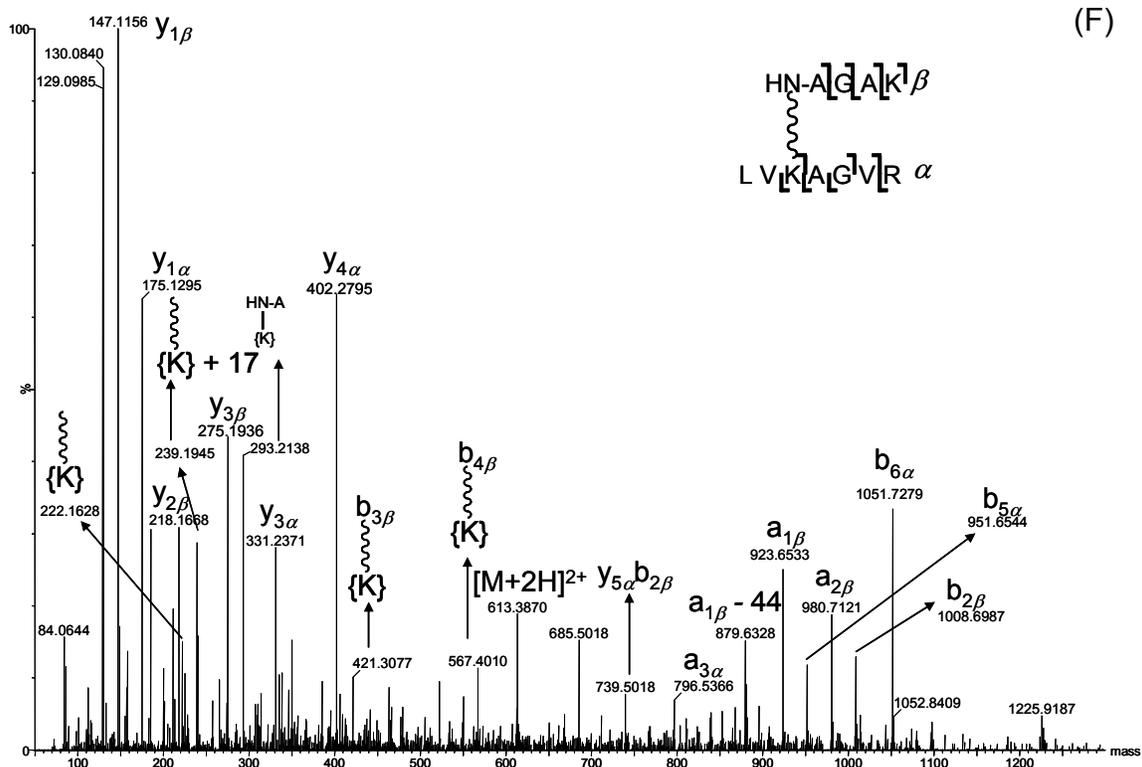


Figura 26. Espectros anotados de ESI-MS/MS das espécies intermoleculares dos peptídeos P1 (m/z 539,9; $[M+3H]^{3+}$), P2 (m/z 592,6; $[M+3H]^{3+}$), P3 (m/z 787,9; $[M+2H]^{2+}$), P4 (m/z 928,9; $[M+2H]^{2+}$), PX1 (m/z 546,9; $[M+3H]^{3+}$) e PX2 (m/z 613,4; $[M+2H]^{2+}$).

A análise dos espectros de ESI-MS/MS de P1, P2, P3, P4, P3, PX1 e PX2 obtidos indicam a presença de fragmentos do tipo **b** e **y**, comumente encontrados na dissociação de peptídeos lineares. Em todos os casos é possível observar a formação de fragmentos nos quais uma das cadeias tem uma ligação peptídica clivada enquanto a outra cadeia se encontra intacta, por exemplo, no espectro de P3 o íon $b_{6\alpha}$ indica a clivagem da ligação Asp-Leu (D-L), com a manutenção do ALC K-K, e a cadeia β permanece intacta; isso significa que uma das cadeias pode funcionar como se fosse uma modificação no aminoácido da outra cadeia. No entanto, é interessante notar a origem desses fragmentos (provenientes de cadeia α ou β) depende de cada uma dessas espécies. No caso de P1, onde a cadeia β apresenta um tamanho muito menor que a cadeia α (cadeia β possui apenas 2 resíduos) é possível notar somente a formação de fragmentos provenientes da cadeia α , sendo possível observar os íons $a_{2\alpha}$ (m/z 258,1), $b_{2\alpha}$ (m/z 286,1) e $y_{5\alpha}$ (m/z 548,2) e os íons que

contém a cadeia β ligada à cadeia α : y_{6a} (m/z 1116,6), y_{7a} (m/z 1245,6), y_{8a} (m/z 1332,7) e y_{9a} (m/z 1518,8). O mesmo comportamento foi observado para a espécie intermolecular do peptídeo P2, que apresentam a cadeia β com tamanho muito inferior ao da cadeia α (a cadeia β possui 3 resíduos). Nesses dois casos, como observado nos espectros da Figura 26A e B, a cadeia β comporta-se como uma modificação da cadeia α . Por outro lado, quando ambas as cadeias possuem tamanhos grandes, como é o caso de P4 e PX1, a dissociação ocorre em ambas as cadeias α e β . No espectro de ESI-MS/MS de P4 é possível observar a presença dos íons $a_{7\alpha}$ ou $a_{5\beta}$ (m/z 1654,9), $b_{5\alpha}$ (m/z 1467,8), $b_{4\alpha}$ (m/z 1354,7) e $y_{3\beta}$ (m/z 363,2) enquanto que para PX1 os íons $y_{4\alpha}$, $y_{5\alpha}$, $y_{7\alpha}$, $y_{3\beta}$, $y_{4\beta}$, $y_{5\beta}$, $y_{6\beta}$ e $y_{7\alpha}$ foram atribuídos. Uma possível explicação para esses fatos pode estar na localização do próton quando da dissociação desses peptídeos: como a fragmentação dessas espécies é dirigida pela carga, a maior cadeia tende a se fragmentar com maior frequência, visto que é nesta que o próton se localizará a maior parte do tempo. Isso explica o porquê da distribuição homogênea dos fragmentos quando ambas as cadeias apresentam massas muito próximas (caso de P4 e PX1). A espécie intermolecular, formada entre a Lys e o N-terminal fragmentou de forma similar às espécies formadas a partir dos outros peptídeos e, como no caso de P4 e PX1, fragmentos oriundos de ambas as cadeias foram observados.

Outra característica observada nesses espectros que ainda não havia sido descrita na literatura está relacionada à formação do íon correspondente a uma das duas cadeias intactas (ruptura da ligação amida entre uma cadeia peptídica e o ALC). Como exemplo, pode-se observar a formação dos íons de m/z 974,5 referente ao íon α^+ de P3, e 1010,5 e 709,3 referentes às espécies α^+ e β^+ de P4 respectivamente. Esse tipo de fragmentação deve ser esperado, visto que a ligação entre o DSS e o nitrogênio da lisina é do tipo amida, ligação essa mais comumente rompida em espectros de CID de peptídeos (levando à formação dos íons **b** e **y**).

Foi verificado ainda a formação preferencial de íons análogos ao imônio da lisina modificada com DSS (análogo, pois a Lys está modificada pelo ALC).

Íons imônios são fragmentos gerados pela dissociação de duas ligações: ligação amida entre o N-terminal do resíduo e o C-terminal do resíduo anterior e a ligação entre o carbono α e o carbono da carbonila dentro do mesmo resíduo. Embora a formação preferencial de fragmentos derivados de íons imônios já houvesse sido descrita na literatura, suas estruturas e mecanismos de fragmentação permaneciam desconhecidos (esses íons foram denominados de $KL\alpha/\beta - 17$, porém nenhuma estrutura foi associada a essa espécie).⁹¹ É interessante notar que sempre que houve a formação do imônio da lisina contendo DSS, a outra cadeia conectada ao ALC permaneceu intacta. Essas espécies podem ser observadas nos espectros de P1 (m/z 524,4), P2 (m/z 637,5) P3 (m/z 684,3), P4 (m/z 930,5 e 1148,6), PX1 (m/z 897,4 e 963,6), PX2 (m/z 567,4). Além disso, uma característica interessante associada à formação dessas espécies está no fato de que quase sempre esses íons estão acompanhados de uma perda neutra de 83 Da, como no caso de P1 (m/z 441,3), P2 (m/z 554,4), P4 (m/z 847,4 e 1148,6), PX1 (m/z 880,5 e 897,4) e PX2 (m/z 484,2). Em todos esses casos o tamanho relativo das cadeias α e β influenciam a formação dessas espécies, uma vez que os fragmentos derivados de imônios contendo o ALC estão presentes em ambas as cadeias apenas no caso das espécies que possuem as duas cadeias com tamanho grande, como é o caso de P4 e PX1. O símbolo {K} refere-se ao anel tetrahidropiridina, formado a partir do fragmento análogo ao íon imônio da Lys, conforme ilustrado no mecanismo proposto na Figura 27.

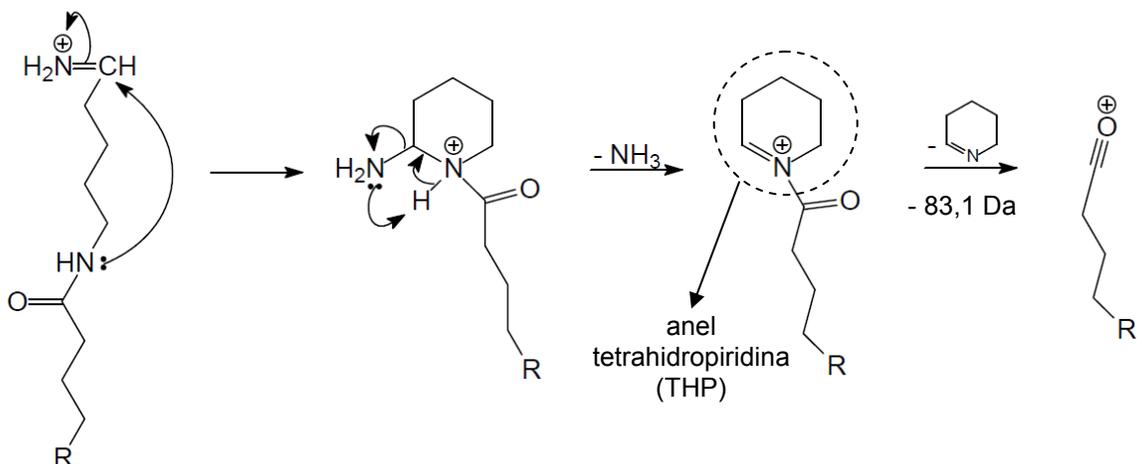


Figura 27. Proposta de formação do anel tetrahidropiridina a partir do íon análogo ao imônio de Lys.

Nessa proposta, ocorre um ataque do nitrogênio da lisina conectada ao DSS ao carbono α do mesmo resíduo. Esse ataque é favorecido tanto pela eletrofilicidade desse carbono, uma vez que este está ligado a um átomo de nitrogênio positivo por uma ligação dupla, quanto pela formação de um anel estável de 6 membros. Esse íon pode facilmente perder um grupo amônio, levando a formação de um anel tetrahidropiridina (THP, indicado por {K} nos espectros de fragmentação). A perda neutra de 83 Da por sua vez é decorrente da clivagem da ligação C-N, com a saída do anel THP, levando a formação do íon acílio correspondente. É possível notar que a estrutura do anel THP é composta somente por átomos da lisina; desse modo, essa proposta de fragmentação é suportada pelo fato de que em espectros de fragmentação de peptídeos contendo esse resíduo, sempre que há a formação do imônio da lisina, ocorre também a formação de outro íon de m/z 84, referente ao anel THP protonado. Como no caso do peptídeo modificado o nitrogênio do anel, após a perda do grupo amônio, não se encontra ligado a nenhum outro átomo de hidrogênio, a THP sai como uma espécie neutra, deixando a carga no oxigênio. A perda neutra de THP no entanto é extremamente interessante, uma vez que ela é específica para a presença de ALCs, o que leva a indicação de uma espécie modificada pelo ALC.

Ainda com relação a formação do anel THP a partir do rearranjo da cadeia lateral da lisina, é possível notar que caso a outra extremidade do ALC se ligue a outra lisina (e não ao N-terminal), também é possível que esta se rearranje do mesmo modo, levando a formação de um íon fragmento cuja estrutura seria composta por dois anéis THPs separados pela cadeia espaçadora do ALC, no caso do DSS, de m/z 305,2 conforme ilustrado na Figura 28.

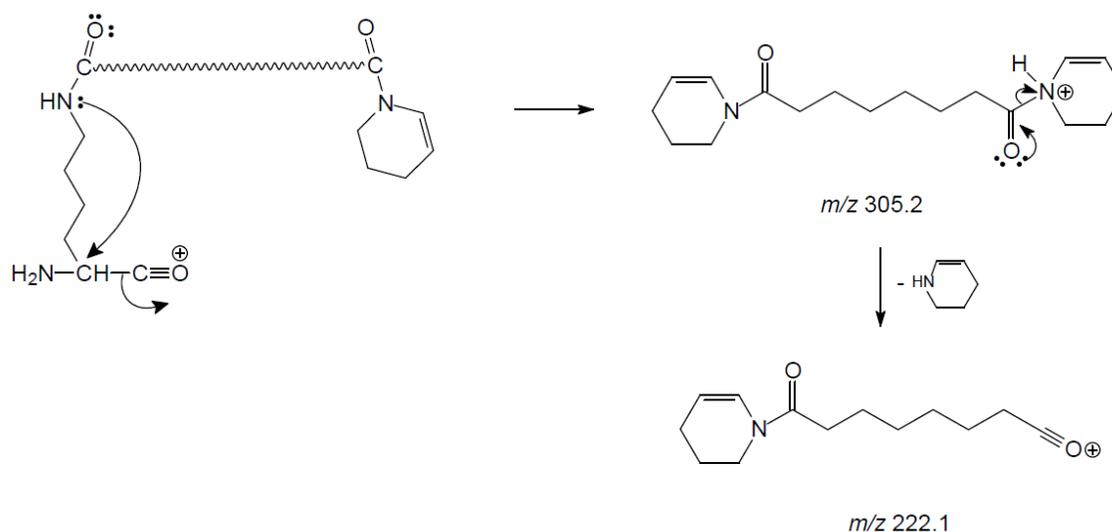


Figura 28. Formação de um íon fragmento cuja estrutura seria composta por dois anéis THPs separados pela cadeia espaçadora do ALC (as m/z referem-se ao uso de DSS) de m/z 305,2; a perda neutra de um anel THP (- 83 Da) leva a formação do íon de m/z 222,1.

A formação dessa espécie, de m/z 305, representada por {K}-{K} nos espectros da Figura 26 está presente em praticamente todas as espécies intermoleculares estudadas. Como era esperado, no caso da espécie intermolecular PX2, formada a partir da união de uma Lys e o N-terminal, esse fragmento não está presente (temos apenas uma Lys). A partir do fragmento de m/z 305, a perda neutra de um anel THP (- 83 Da) leva a formação do íon de m/z 222,1 (indicado por {K}- nos espectros da Figura 26). Outro íon fragmento de interesse e proveniente do mesmo caminho é o de m/z 239,2, porém sem a perda de amônia do rearranjo da cadeia lateral da lisina para formação do anel THP (segunda etapa da Figura 27). Como era esperado, os fragmentos de m/z 222,1 e 239,2 estão presentes na espécie PX2. Como relatado anteriormente,

todos esses íons também estão presentes na fragmentação de espécies intramoleculares e sua formação foi proposta na Figura 21.

4.1.5. Fragmentação de Espécies Intermoleculares por MALDI-MS/MS utilizando CID

Os dados de MALDI-MS/MS dos peptídeos P1, P2, P3, P4, PX1 e PX2 são mostrados na Figura 29A, B, C, D, E e F, respectivamente. Assim como quando utilizando ESI como fonte de ionização, as anotações presentes nos dados de MALDI-MS/MS foram realizadas de acordo com a referência 91.

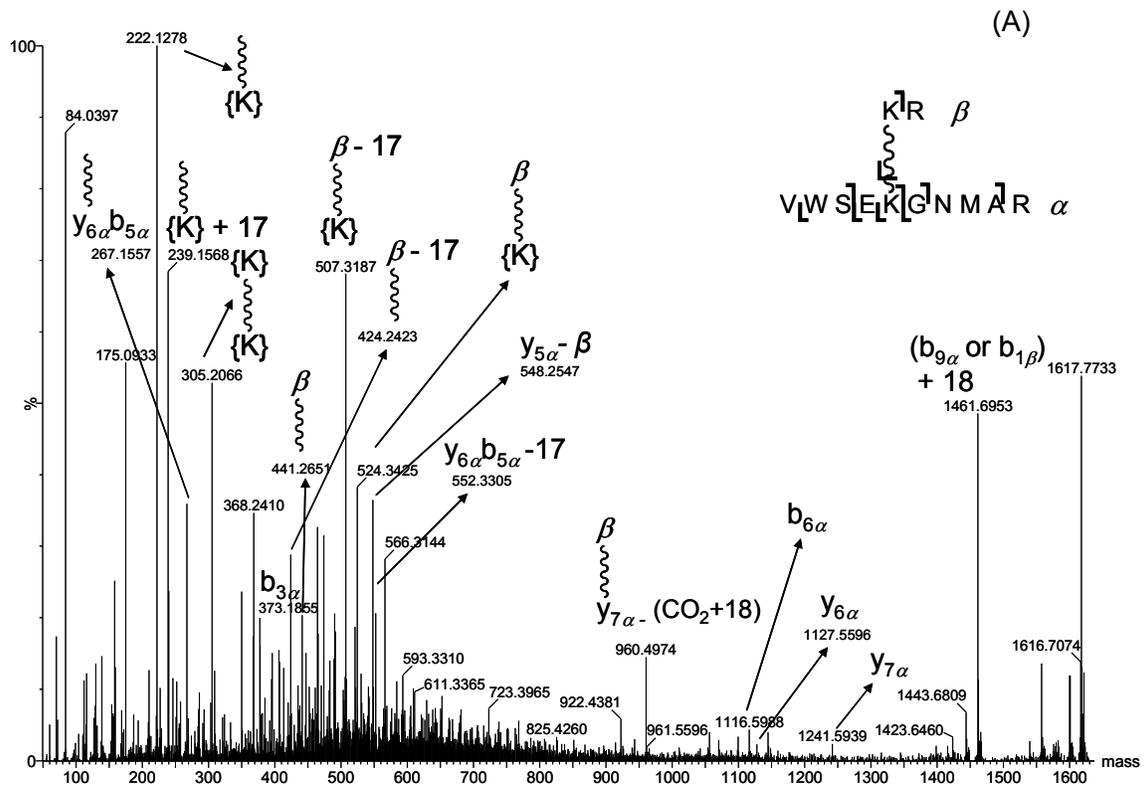


Figura 29. (Continua).

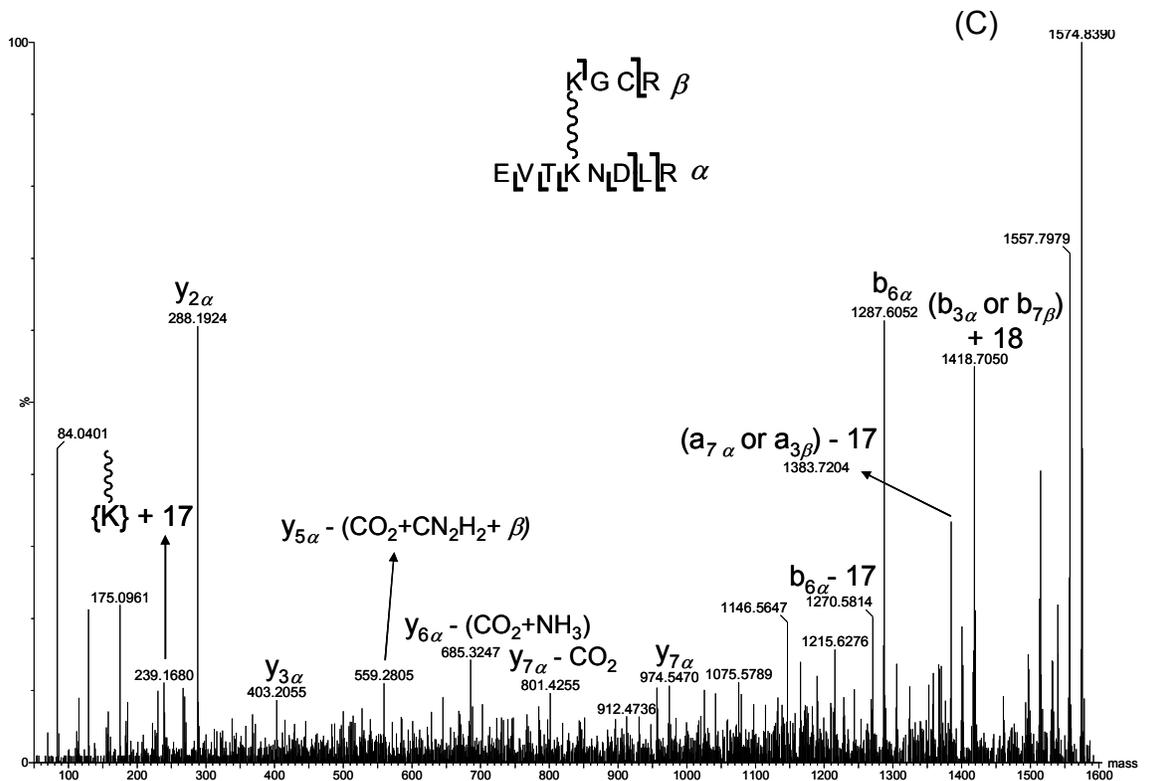
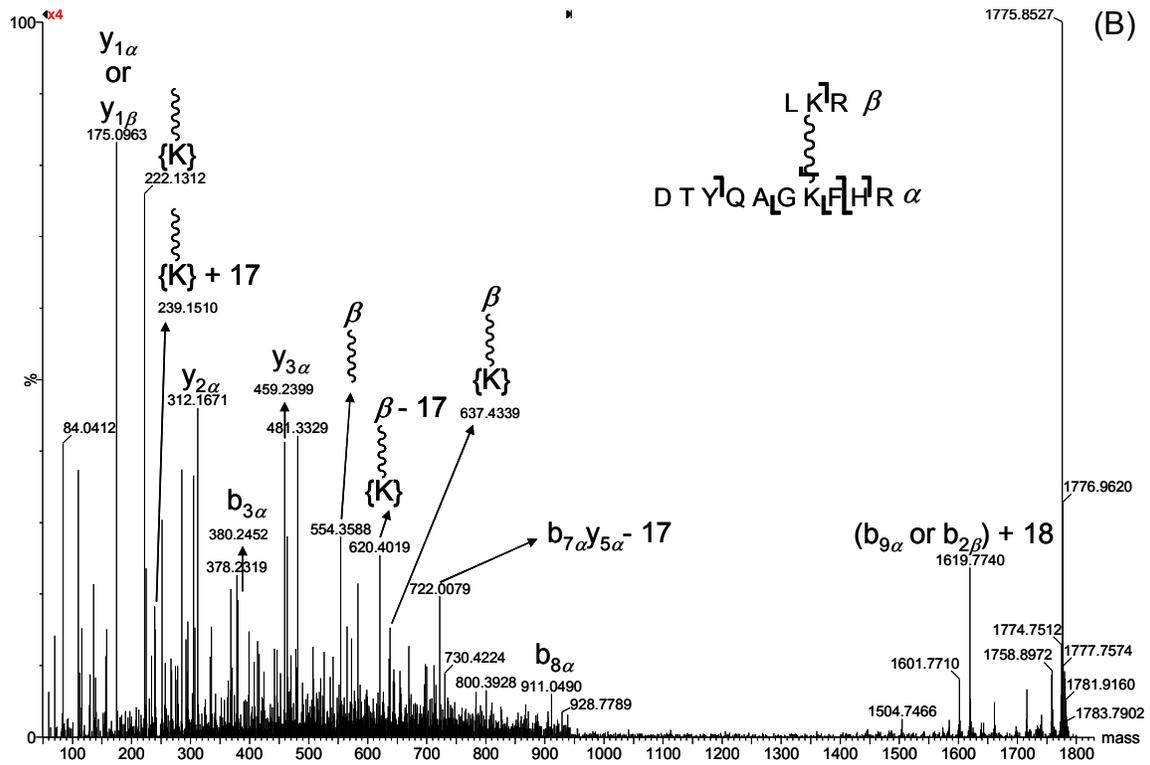


Figura 29. (Continua).

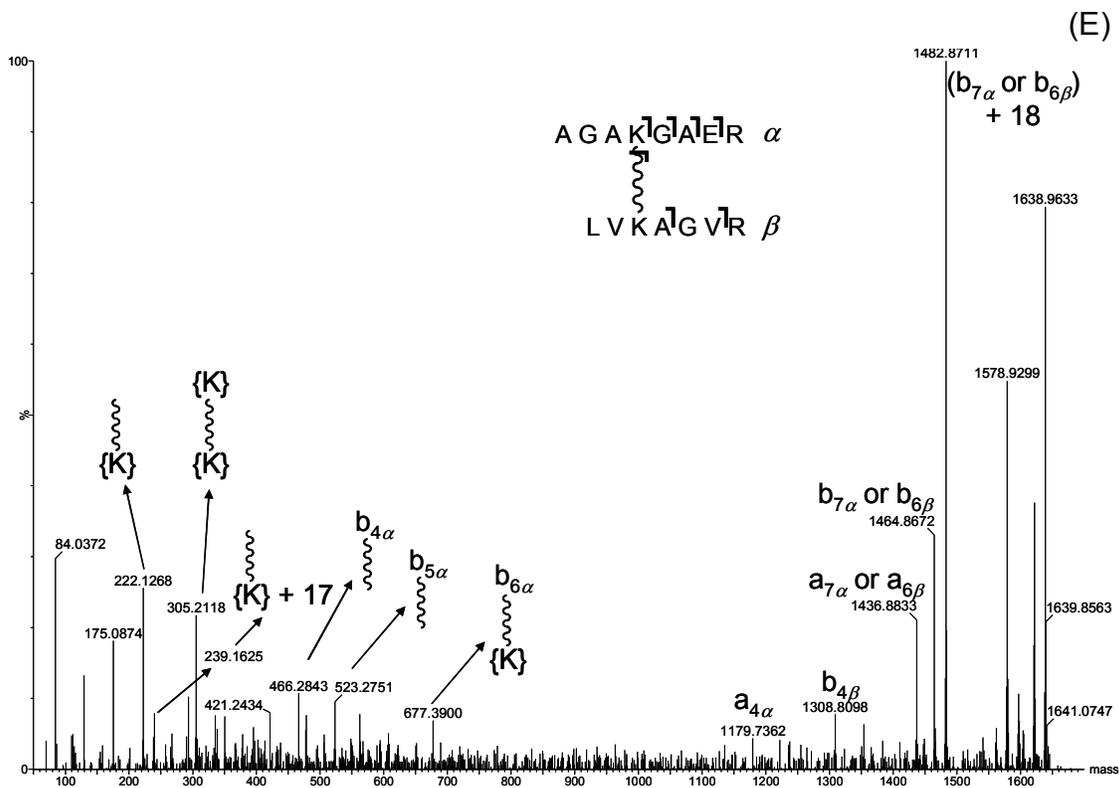
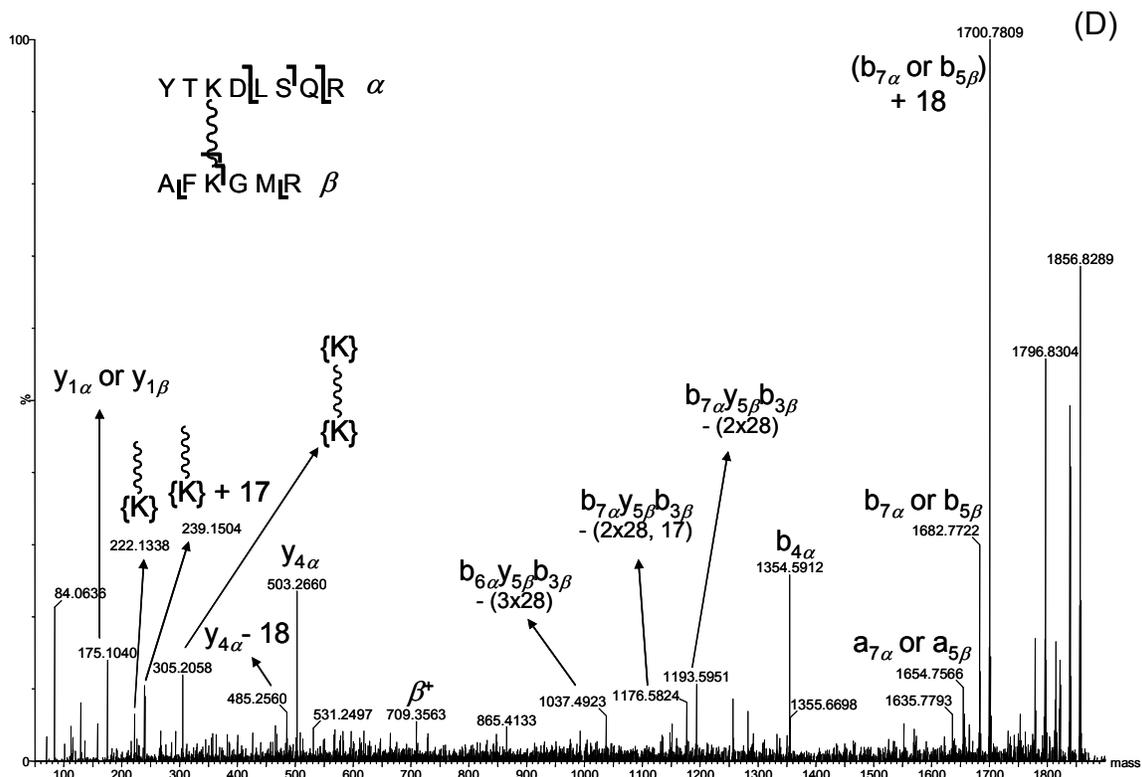


Figura 29. (Continua).

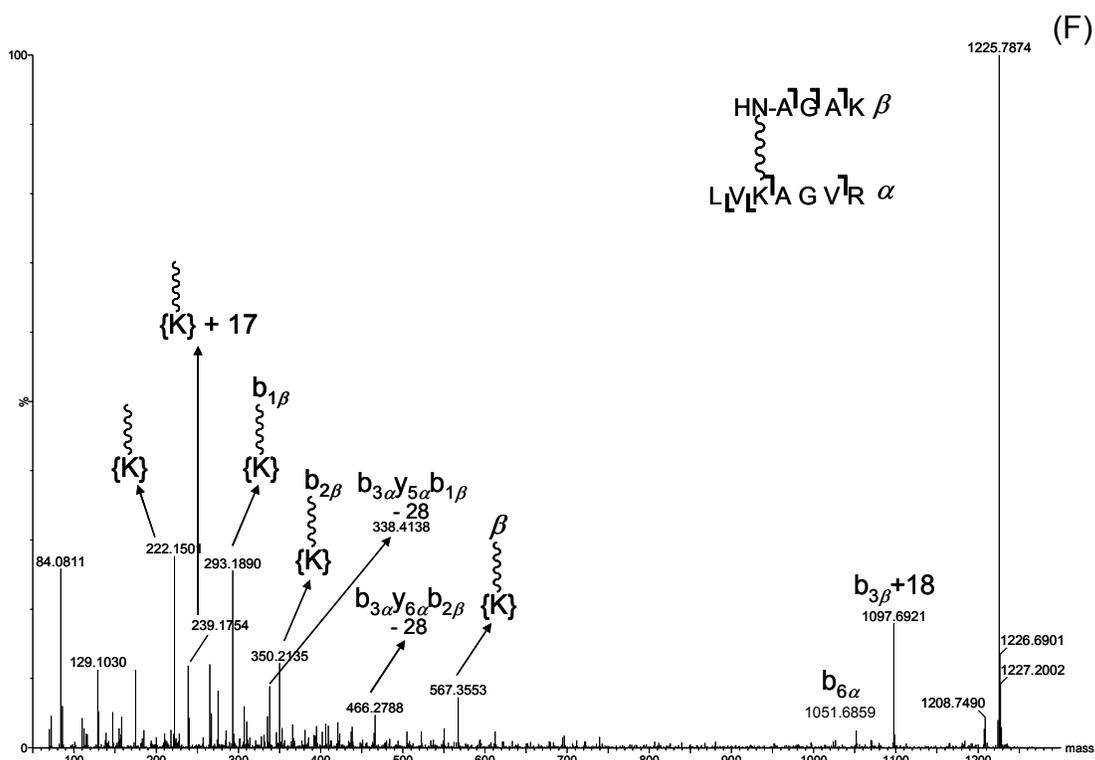


Figura 29. Espectros anotados de MALDI-MS/MS das espécies intermoleculares dos peptídeos P1 (A, m/z 1617,8; $[M+1H]^{1+}$), P2 (B, m/z 1775,9; $[M+1H]^{1+}$), P3 (C, m/z 1574,8; $[M+1H]^{1+}$), P4 (D, m/z 1857,0; $[M+1H]^{1+}$), PX1 (E, m/z 1638,9; $[M+1H]^{1+}$) e PX2 (F, m/z 1225,7; $[M+1H]^{1+}$).

Em relação aos dados de ESI-MS/MS, os espectros de fragmentação de MALDI das espécies intermoleculares não são tão informativos quanto à seqüência de aminoácidos, visto que esses contêm um menor número de íons tipo **y** e **b**. Mesmo apresentando menos fragmentos que ESI, é possível notar que grande parte das características observadas anteriormente também estão presentes quando utilizando MALDI. Por exemplo, para P1 (Figura 29A), que possui a menor cadeia β em relação à cadeia α , a maior parte dos fragmentos são provenientes da dissociação da cadeia maior: $b_{6\alpha}$ (m/z 287,6), $y_{2\alpha}$ (m/z 288,2), $y_{3\alpha}$ (m/z 403,2) e $y_{7\alpha}$ (m/z 974,5). Quando partimos para espécies com a cadeia β maior, fragmentação em ambas as cadeias são observadas, como é o caso de P4 (Figura 29D), onde os íons $b_{4\beta}$ (m/z 1308,8) e $b_{8\alpha}$ (m/z 911,9) foram observados. Assim como em ESI-MS/MS, fragmentos referentes às cadeias α^+ e β^+ foram observados, como a cadeia α^+ de P3 (m/z 974,5, Figura 29C) e a

cadeia β^+ de P4 (m/z 709.4, Figura 29D). A perda neutra de 83 Da, referente ao anel THP também esta presente em MALDI. A cadeia β de P1 ligada ao anel THP pelo DSS (m/z 524,3), após a perda de 83 Da leva ao fragmento de m/z 441,3 (Figura 29A). Os íons diagnósticos (m/z 222,1; 239,2 e 305.2) estão presentes nos espectros de MALDI com intensidade superior aos de ESI. Em adição às características observadas em ESI, os espectros de MALDI mostraram a presença de fragmentos internos, como é o do íon fragmento de m/z 1193,6 de P4, atribuído ao íon $y_{7\alpha}$ ligado ao DSS e aos resíduos internos FK da β (Figura 29D).

4.1.6. Uso de Diferentes ALCs para Formação de Espécies Intermoleculares

Com intuito de validar as atribuições realizadas usando DSS e verificar a influência do ALC na dissociação de espécies intermoleculares, outros dois ALCs foram utilizados para obtenção de espécies intermoleculares e realização de novos experimentos de fragmentação. A estrutura dos ALCs utilizados, incluindo DSS, glutarato de disuccinimidila (DSG) e sebacato de disuccinimidila (DSSeb) são ilustradas na Figura 30.

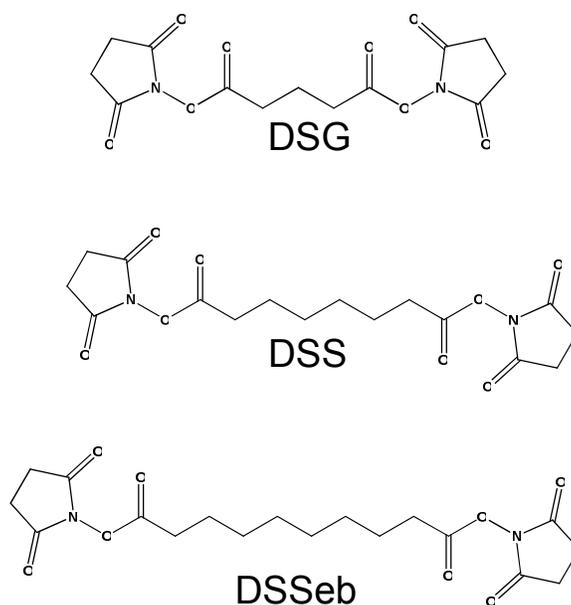


Figura 30. Estrutura dos agentes de ligação cruzada (ALC): glutarato de disuccinimidila (DSG), suberato de disuccinimidila (DSS) e sebacato de disuccinimidila (DSSeb).

DSG e DSSeb são análogos do DSS: DSSeb possui dois grupos $-CH_2-$ adicionais (um aumento de massa de 28 Da em relação ao DSS) e DSG possui três $-CH_2-$ a menos que DSS (menos 42 Da em relação ao DSS). O uso de ALCs semelhantes permite a identificação de íons de modo similar a experimentos envolvendo marcação isotópica, de modo que íons que contém DSSeb ou DSG em sua estrutura devem aparecer com uma diferença de massa de + 28 ou - 42 Da, respectivamente; já íons que não contêm o ALC devem apresentar a mesma m/z em qualquer situação. A Figura 31 ilustra dados de ESI-MS/MS das espécies $[M+2H]^{2+}$ intermolecular de P4 gerados com DSSeb (m/z 942,9; A), DSS (m/z 928,9; B) e DSG (m/z 908,9; C); íons marcados com estrela não contêm o ALC, e apresentam a mesma m/z nos três espectros; por outro lado, íons marcados com triângulo são equivalentes mas possuem m/z deslocados, devido à presença de diferentes ALCs em suas estruturas.

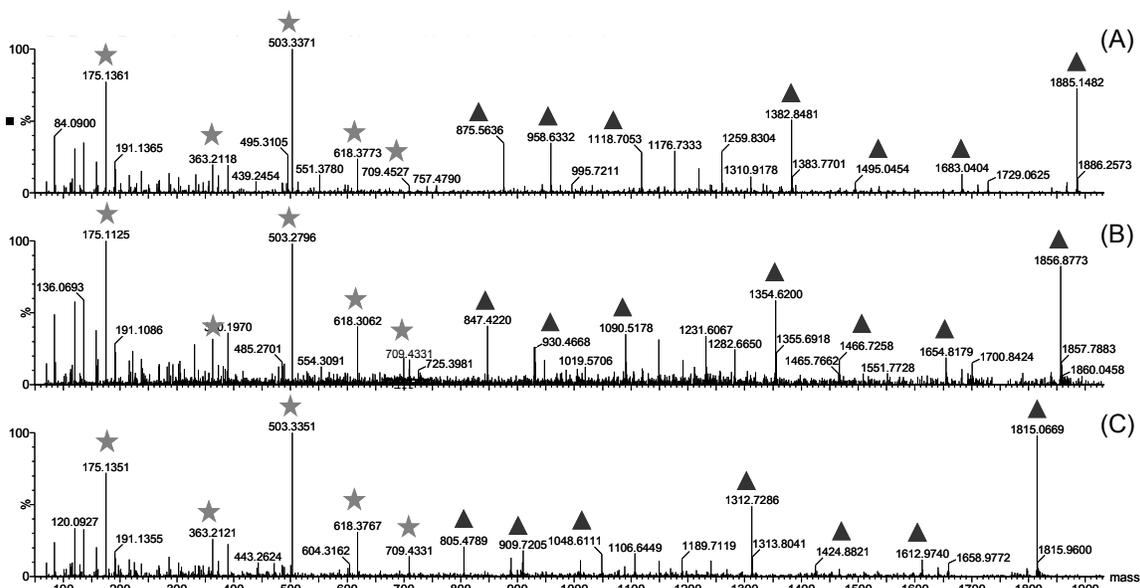


Figura 31. ESI-MS/MS da espécie intermolecular de P4, duplamente carregado, gerados a partir dos ALCs: DSSeb (m/z 942,9; A), DSS (m/z 928,9; B) e DSG (m/z 908,9; C). Íons marcados com “estrela” não contêm o ALC em sua estrutura e possuem o mesma m/z nos três espectros. Íons marcados por triângulo apresentam m/z deslocado pois são oriundos dos diferentes (+28 para o DSSeb e -42 para o DSG, em relação ao DSS).

Íons análogos aos íons diagnósticos gerados a partir do DSS (m/z 222,1; 239,2 e 305,2) também estão presentes quando utiliza-se DSSeb e DSG como ALCs e, como esperado, apresentam m/z deslocadas devido aos diferentes tamanhos das cadeias espaçadoras do ALC utilizado. Isso faz que, utilizando DSSeb os íons diagnósticos aparecem com m/z 250,2; 267,2 e 333,3; já com DSG m/z 180,1; 197,1 e 263,1 (Figura 32).

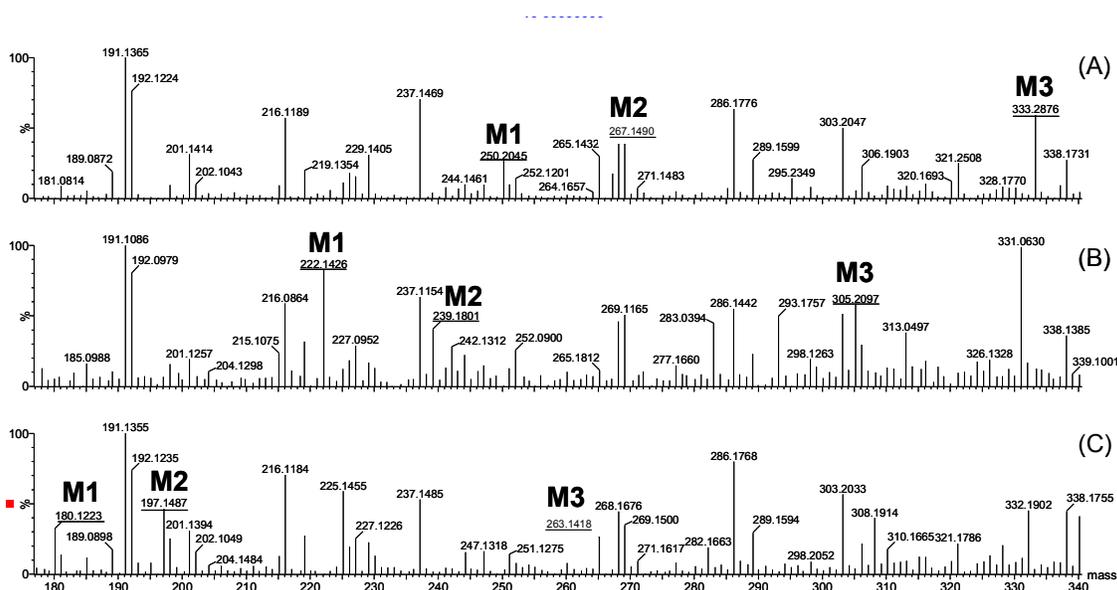


Figura 32. Região expandida dos espectros ilustrados da Figura 31 (P4 ESI-MS/MS). (A) íons diagnósticos formados quando utilizando DSSeb: m/z 250 (M1), 267 (M2) e 333 (M3); (B) íons diagnósticos quando utilizando DSS: m/z 222 (M1), 239 (M2) e 305 (M3); (C) íons diagnósticos quando utilizando DSG: m/z 180 (M1), 197 (M2) e 263 (M3).

A Tabela 1 resume as principais características observadas no estudo de espécies intermoleculares. Além disso, como verificado na Figura 31, as características observadas quando DSS é empregado como ALC pode ser estendida para espécies geradas a partir de outros ALCs provenientes de ésteres de NHS, semelhantes ao DSS, como é o caso de DSSeb e DSG. Como pode ser visto na Tabela 1, a perda neutra do anel THP (- 83,1 Da) foi verificada para grande maioria das espécies geradas por ESI. Além disso, o comportamento da cadeia β como uma modificação da cadeia α é um efeito mais pronunciado em ESI do que em MALDI. A presença dos íons marcadores,

M1, M2 e M3, referentes aos fragmentos de m/z 222, 239 e 305 para o DSS, e seus respectivos análogos para DSG e DSSeb, estão presentes tanto em ESI quanto MALDI.

Tabela 1. Características de fragmentação observadas para as espécies intermoleculares utilizando MALDI e ESI como fontes de ionização.

	MALDI	ESI
Perda de 83,1 Da (THP)	P1,P2	P1,P2,P4,PX1,PX2
Cadeia β como modificação	P1	P1, P2, P3
222,1 (M1)	P1,P2,P4,PX1,PX2	P1,P2,P3,P4,PX2
239,2 (M2)	P1,P2,P3,P4,PX1,PX2	P1,P3,P4,PX1,PX2
305,2 (M3)	P1,P4,PX1	P1,P3,PX1

O estudo de fragmentação de espécies intermoleculares foi submetido ao periódico *Journal of Mass Spectrometry*.

4.2. Varredura de Íon Precursor (PIS) para Identificação de Espécies Modificadas por ALCs

Como previamente discutido nesse trabalho, um dos maiores problemas em experimentos de ligação cruzada de proteínas e espectrometria de massas é a identificação das espécies modificadas pelos ALCs. Uma metodologia baseada em MS que pode auxiliar na identificação de espécies modificadas, utilizando ALCs convencionais, como DSS, é a varredura de íon precursor (Precursor Ion Scan – PIS). Experimentos do tipo PIS foram desenvolvidos inicialmente em instrumentos do tipo Triplo Quadrupolo, e refere-se a um experimento de MS/MS onde o primeiro analisador de m/z realiza a varredura de todos os íons gerados na fonte, sendo esses fragmentados na cela de colisão. O segundo analisador de m/z encontra-se fixo em uma determinada m/z , permitindo que apenas fragmentos com essa m/z passem por este analisador (na Figura 33 temos uma representação de diferentes tipos de experimentos de MS/MS, inclusive PIS). Desse modo, esse tipo de análise é extremamente

vantajoso quando se deseja buscar uma determinada classe de compostos em uma matriz complexa, desde que esta gere um íon fragmento característico. Vale ressaltar nesse ponto que PIS é o experimento oposto ao típico Varredura de Íons Produtos, onde o primeiro analisador seleciona um íon de determinada m/z , esse é fragmentado e todos os seus fragmentos são varridos no segundo analisador (Figura 33).

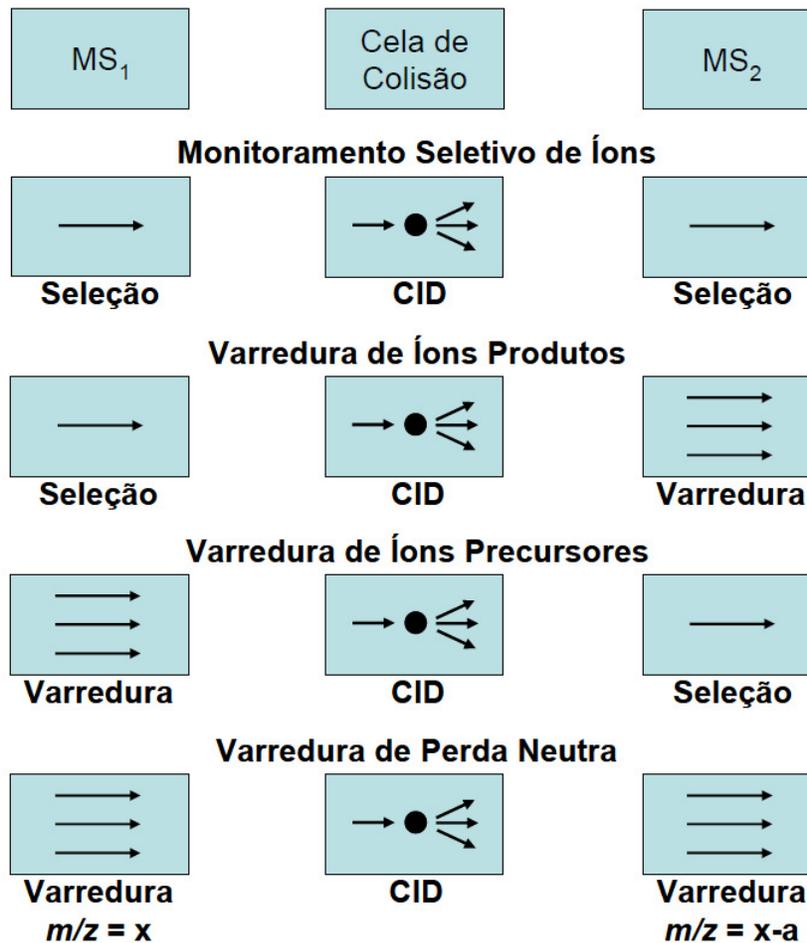


Figura 33. Representação esquemática de experimentos de MS/MS.

PIS em instrumento do tipo Triplo Quadrupolo e *Ion Traps* Lineares vêm sendo utilizado em proteômica para determinação de sítios de fosforilação^{127,128,129}, modificação por aldeído¹³⁰, identificação e diferenciação de oligossacarídeos ligados por nitrogênio ou oxigênio em proteínas^{131,132,133}.

Em 2002, Bateman propôs a utilização do equipamento Q-Tof em um experimento similar ao PIS¹³⁴. Em princípio, o experimento de PIS não pode ser realizado em equipamentos tipo Q-Tof, uma vez que analisadores Tof não tem capacidade de filtrar íons de determinada m/z . O método proposto consiste em um experimento no qual o quadrupolo transmite íons continuamente, enquanto o Tof adquire espectros alternados com e sem fragmentação (isso é feito alterando-se a energia de colisão com o gás). Caso o fragmento de interesse seja gerado na colisão, um espectro de varredura de íons produtos é adquirido para identificar o precursor que gerou o fragmento. Esse tipo de experimento traz as vantagens de equipamentos tipo Q-Tof quando comparados a triplo quadrupolos, como alta velocidade de aquisição de espectros aliada a alta sensibilidade e exatidão de massas. Desde então, PIS em equipamentos tipo Q-Tof tem sido utilizado para identificação e quantificação de fosfopeptídeos^{135,136}, detecção e diferenciação de dimetilação em arginina¹³⁷ e na detecção de peptídeos glicosilados¹³⁸.

Como mencionado acima, para realização de experimentos de PIS, é necessário a presença de íon diagnóstico no espectro de Varredura de Íons Produtos, ou seja, um fragmento característico de uma determinada classe de compostos. Com base nos estudos de fragmentação de peptídeos contendo ALCs, foi possível identificar três íons característicos para cada ALC. Quando utilizando DSS temos os seguintes íons 222,1494; 239,1759 (peptídeos contendo DSS) e 305,2229 (peptídeos contendo DSS conectados por duas lisinas), ilustrados na Figura 34. Para DSSeb temos os seguintes íons 250,1807; 267,2072 (peptídeos contendo DSSeb) e 333,2542 (peptídeos contendo DSSeb conectados por duas lisinas). Para DSG temos os seguintes íons 180,1025; 197,1290 (peptídeos contendo DSG) e 263,1760 (peptídeos contendo DSG conectados por duas lisinas). Esses íons apresentam grande potencial para sua utilização em experimentos de PIS envolvendo ligação cruzada de proteínas utilizando qualquer um desses ALCs, uma vez que suas m/z não coincidem com nenhuma combinação de íons tipo **a**, **b** ou **y** (íons mais comuns na fragmentação de peptídeos por colisão) dos 20 aminoácidos naturais. Esse dado, aliado à alta

exatidão de massas do Tof, pode conferir alta especificidade para esse tipo de análise.

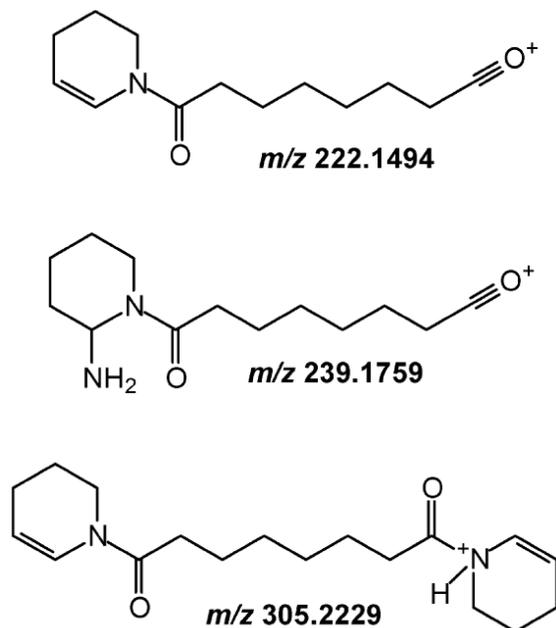


Figura 34. Estrutura dos íons diagnósticos gerados a partir do DSS (222,1494; 239,1759 e 305,2229). Os análogos, gerados a partir do DSG apresentam três grupos $-CH_2-$ a menos (m/z 180,1025; 197,1290 e 263,1760). Os análogos, gerados a partir do DSSeb apresentam dois grupos $-CH_2-$ a mais (m/z 250,1807; 267,2072 e 333,2542).

O primeiro experimento realizado consistiu na análise da amostra gerada a partir da reação com o peptídeo PX e o DSS, de modo que várias espécies modificadas pelo ALC são esperadas (intra e intermoleculares, além dos *dead-end*). A Figura 36 apresenta o cromatograma da amostra PX com baixa energia de colisão (sem fragmentação), de modo que espécies mais intensas estão indicadas no cromatograma e foram alvo dos estudos de fragmentação de espécies intramoleculares e intermoleculares. A Figura 36 apresenta os cromatogramas de íons selecionados de alta energia de colisão (houve fragmentação) para os íons diagnósticos com alta exatidão (m/z 222,1494; 239,1759 e 305,2229 \pm 0,02 Da).

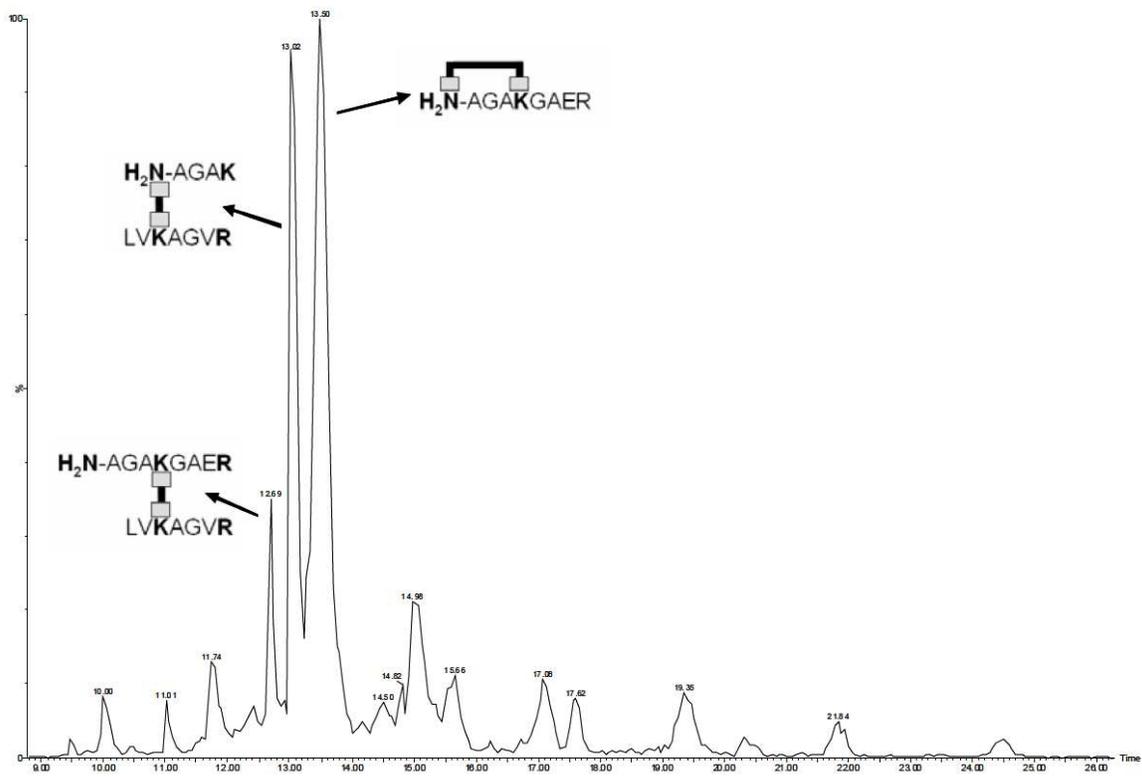


Figura 35. Cromatograma da amostra proveniente da reação entre o peptídeo PX e DSS (após digestão enzimática) com baixa energia de colisão (sem fragmentação). As espécies mais intensas estão indicadas.

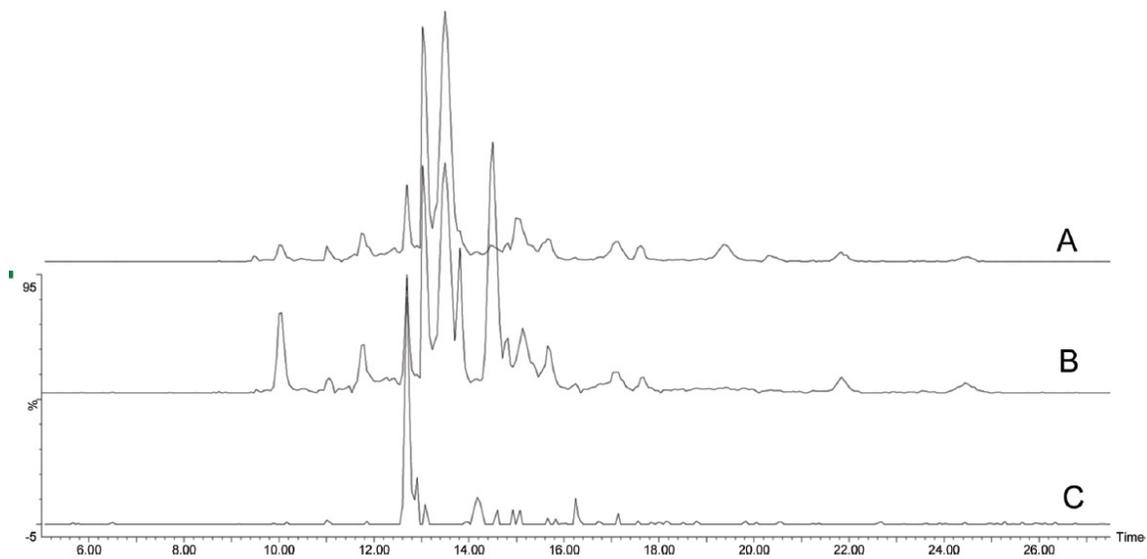


Figura 36. Cromatograma de íons selecionados da amostra PX com alta energia de colisão, indicando a presença dos íons de m/z 222,1494 (A), 239,1759 (B) e 305,2229 (C) utilizando erro de 0,02 Da.

É possível observar no cromatograma de baixa energia de colisão (Figura 36) a presença de várias outras espécies além das indicadas na Figura. Além disso, quando fragmentadas essas espécies dão origem aos fragmentos dos íons marcadores, o que indica que todos esses sinais são referentes a espécies contendo DSS em sua estrutura. Isso já era esperado, uma vez que após a reação com o DSS e digestão com tripsina, várias espécies foram formadas (como é verificado no espectro de MALDI-MS do produto da reação, Figura 17, além das mencionadas anteriormente: espécies contendo somente *dead-end* ou *dead-end* mais ligações intra ou intermolecular, produtos de digestão incompleta, dentre outros). Desse modo, é interessante notar o grande potencial do uso de PIS para detecção de peptídeos modificados por ALCs.

Baseado na Figura 36, é possível verificar a importância da utilização de mais do que apenas um dos três íons diagnósticos, uma vez que, alguns peptídeos modificados pelo ALC geram apenas um deles. Além disso, a detecção simultânea desses íons fragmentos no mesmo experimento é possível em equipamentos Q-Tof sem perda de sensibilidade (diferentemente de equipamentos triplo quadrupolos, onde cada canal adicional a ser monitorado diminui a sensibilidade).

Com o intuito de simular uma amostra envolvendo proteínas, foi realizado outro experimento onde uma alíquota da amostra do peptídeo PX (mesma utilizada anteriormente) foi adicionada a um digesto da proteína hemoglobina em quantidades estequiométricas. A Figura 37 apresenta o cromatograma adquirido com baixa energia de colisão das amostras controle (digesto de hemoglobina) e experimento (digesto de hemoglobina + PX). É clara a presença de um maior número de picos cromatográficos devido à presença de picos referentes amostra PX. A Figura 38 apresenta os cromatogramas de íons selecionados de alta energia de colisão (íons diagnósticos que indicam a presença de peptídeos modificados por DSS); e uma das principais características desses cromatogramas refere-se à especificidade dos íons marcadores, ou seja, com a alta exatidão de massas de um Tof, nenhum peptídeo da hemoglobina quando fragmentado gera um dos íons diagnóstico.

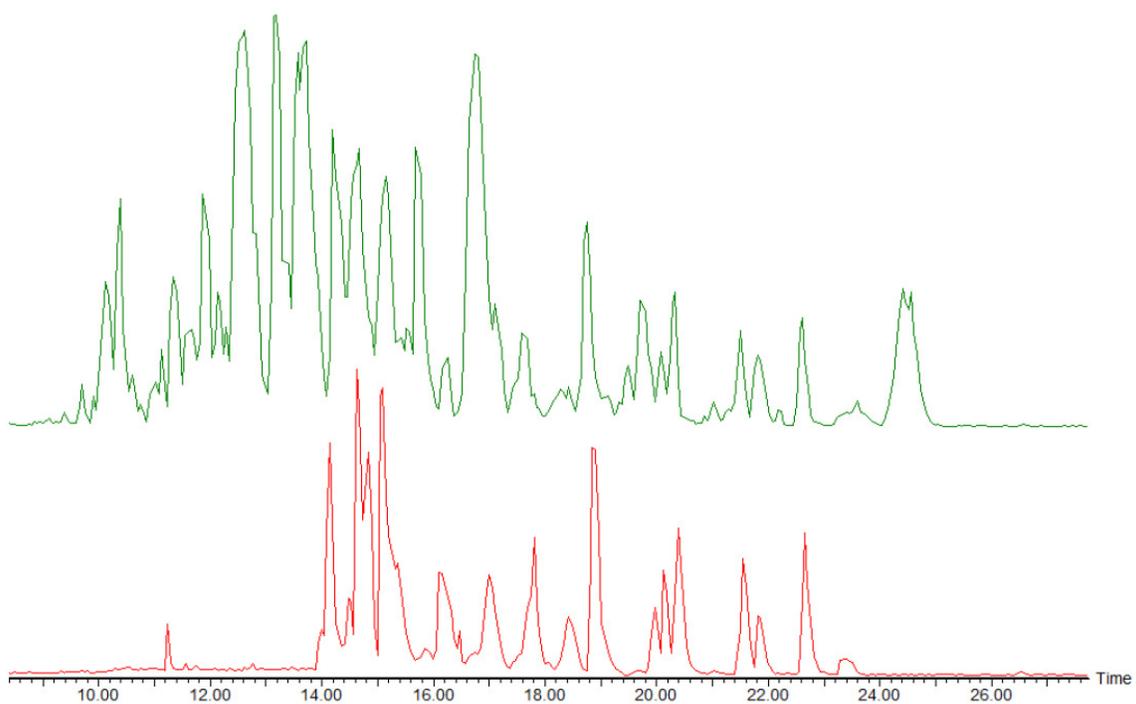


Figura 37. Cromatogramas adquiridos com baixa energia de colisão para a hemoglobina digerida com (linha verde) e sem PX (linha vermelha).

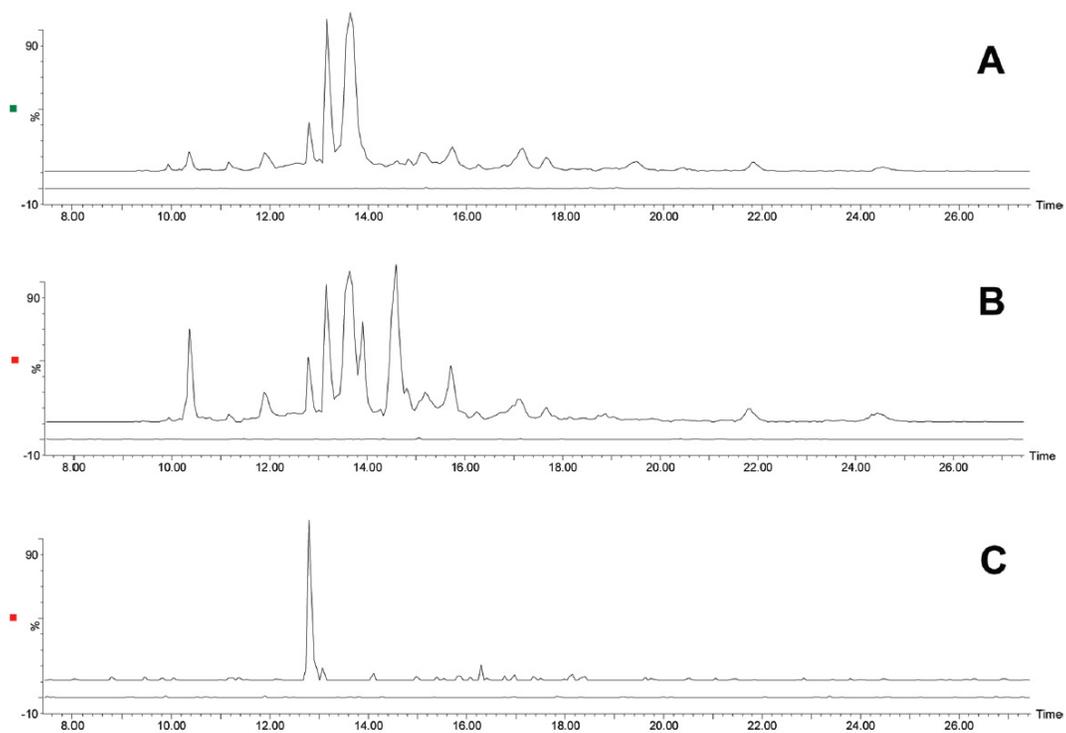


Figura 38. Cromatogramas de íons selecionados com alta energia de colisão para as amostras contendo hemoglobina + PX (traço superior) e somente hemoglobina (traço inferior), indicando a presença dos íons diagnósticos, de m/z 222,1 (A); 239,1 (B) e 305,2 (C).

O próximo passo na utilização de PIS como método de detecção de peptídeos contendo DSS foi realizar um experimento de ligação cruzada com proteína. Com isso, o alvo escolhido foi a proteína lisozima, uma proteína modelo pequena e com estrutura resolvida por Cristalografia de Proteínas e por Ressonância Magnética Nuclear. Além disso, essa proteína tem um grande número de resíduos de lisina, o que a torna um bom alvo para a validação do método apresentado. A Figura 39 indica os cromatogramas referentes aos íons diagnósticos de peptídeos modificados por DSS tanto do controle (lisozima digerida) quanto do experimento (lisozima + DSS digerida). Mais uma vez é notável a excelente especificidade dos íons marcadores, visto que são muito poucos os íons no controle que geram os marcadores. Essa figura indica também que a utilização dos 3 íons simultaneamente é extremamente interessante, uma vez que aumenta a especificidade da técnica sem a perda de sensibilidade (em equipamentos tipo Q-Tof).

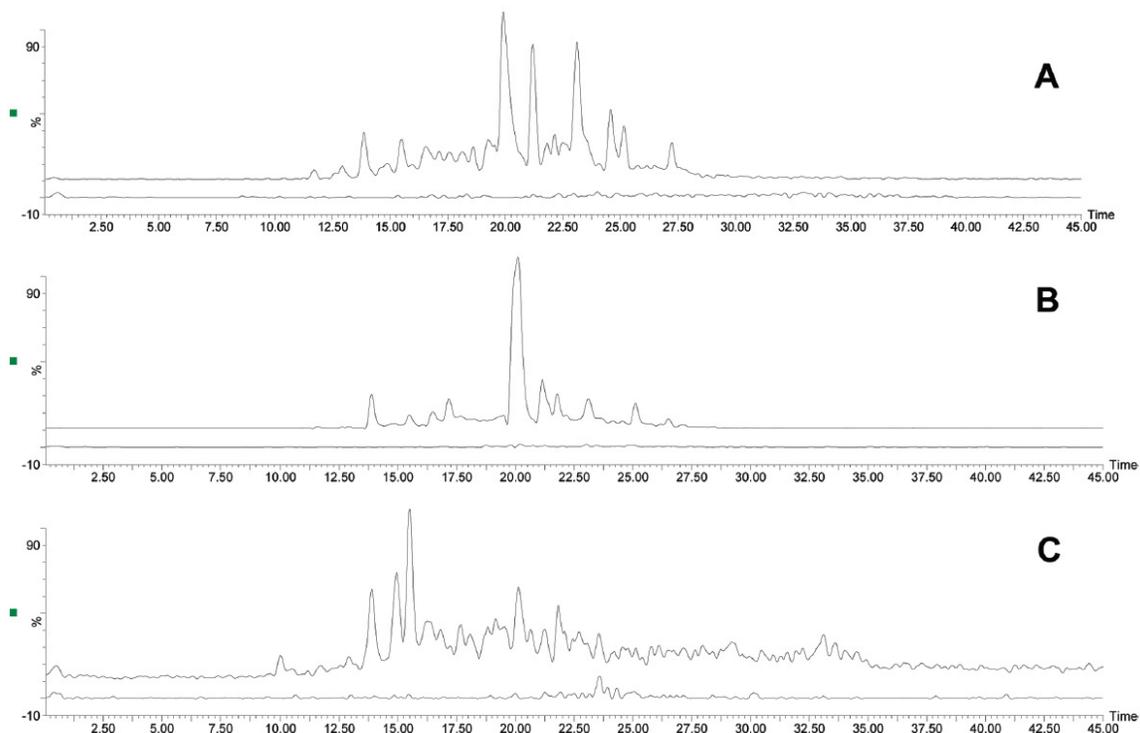


Figura 39. Cromatogramas com alta energia de colisão para a lisozima controle (sem DSS, traço inferior) e experimento (com DSS, traço superior), dos íons diagnósticos de m/z 222,1 (A); 239,1 (B) e 305,2 (C).

Para cada um dos picos cromatográficos acima nos quais havia a presença dos íons diagnósticos de m/z 222,1 e 239,1, os respectivos espectros de MS de baixa energia de colisão foram processados para identificação de peptídeos modificados com DSS. Esses espectros foram deconvoluídos e as m/z dos possíveis precursores monocarregados foram carregados no software xBobcat¹³⁹, que cria uma lista teórica de possíveis peptídeos modificados baseados somente em dados de MS. Os peptídeos atribuídos tiveram sua identificação manualmente confirmada por espectros de fragmentação. A Figura 40 apresenta um exemplo de identificação de um peptídeo do tipo *dead-end*; nesse caso, é interessante notar a presença dos íons 222,1 e 239,1 e a ausência do íon 305,2, fato esperado para peptídeos desse tipo.

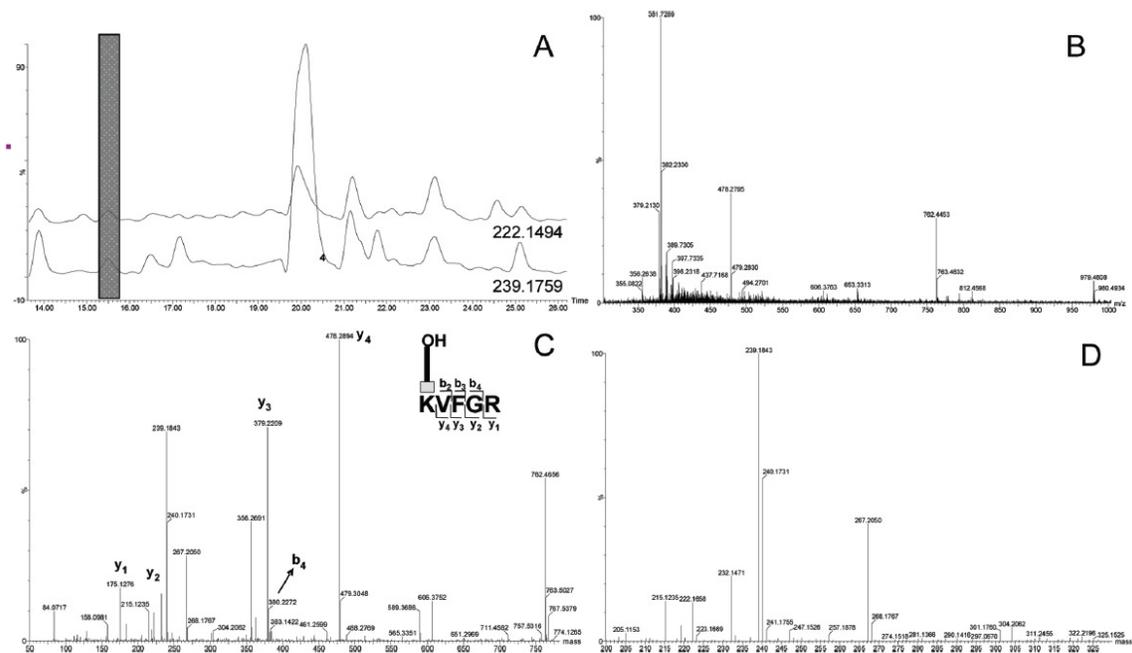


Figura 40. (A) Cromatogramas de alta energia de colisão de íons selecionados para as m/z 222,1494 e 239,1759 ($\pm 0,02$ Da), em vermelho e verde respectivamente. O retângulo destaca o pico cromatográfico referente ao espectro de MS (baixa energia de colisão) apresentado em (B). Em (C) temos o espectro de fragmentação anotado do íon de m/z 381,7, referente ao peptídeo N-terminal da lisozima modificado com DSS (*dead-end*). Em (D), ampliação do espectro (C), destacando a presença dos íons marcadores.

Com base na descoberta dos íons diagnósticos, foi possível construir um fluxograma capaz de auxiliar na identificação de peptídeos modificados por ALC (Figura 41). No caso do DSS, o primeiro passo é verificar a presença dos íons

fragmentos de m/z 222,1 e 239,2 no espectro de fragmentação. Se nenhum destes íons está presentes no espectro, não temos uma espécie modificada pelo ALC. Caso pelo menos um deles esteja presente, passamos a verificar o fragmento de m/z 305,1 para DSS. Se o espectro não apresenta o fragmento de m/z 305,2 devemos ter uma espécie do tipo *dead-end* (peptídeo ligado ao DSS por uma lisina). Caso o íon de m/z 305,1 esteja presente devemos ter uma espécie intramolecular ou intermolecular (em ambos os caso temos DSS ligado por duas lisinas). Caso seja possível observar no espectro de dissociação as m/z 147,1 e 175,1, referentes aos y_1 de lisina e arginina respectivamente, isso indicaria a presença de dois resíduos diferentes na porção C-terminal. Esse fato só seria possível se dois peptídeos diferentes estivessem conectados, ou seja, se essa fosse uma espécie intermolecular. Por outro lado, a presença de somente um desses íons seria inconclusiva, uma vez que poderia indicar tanto a presença de somente um C-terminal (e conseqüentemente uma espécie intramolecular) quanto dois C-terminais idênticos (peptídeo intermolecular).

A Figura 41 ilustra o fluxograma quando DSS é utilizado como ALC, mas ele pode ser aplicado quando outros ALC derivados de ésteres de NHS forem utilizados, como DSSeb ou DSG. Caso DSG seja utilizado, verificamos primeiramente a presença dos análogos aos fragmentos de m/z 222,1 e 239,1 de m/z 180,1 e 197,1; já com DSSeb, m/z 250,2 e 267,2. Se DSG ou DSSeb forem usados verificamos os fragmentos de m/z 263,2 ou 333,3, respectivamente, para fragmentos análogos ao m/z 305,2.

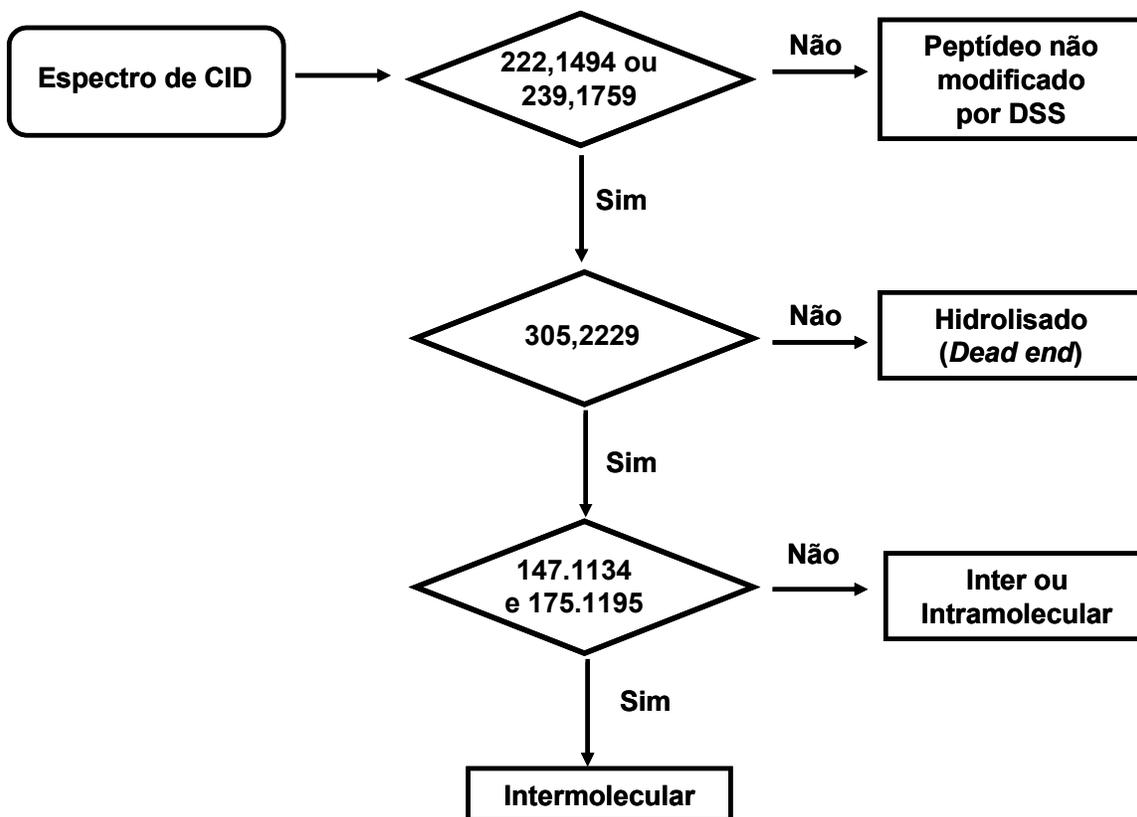


Figura 41. Fluxograma de interpretação de dados obtidos de um experimento de PIS para detecção de peptídeos contendo ALC derivados de diésteres de NHS (os valores de m/z presentes referem-se ao DSS, mas caso outro ALC seja utilizado, é só usar o m/z do ALC empregado).

Após empregar esse fluxograma, somente os espectros de dissociação dos íons precursores de interesse seriam analisados para verificar outras características que permitissem a identificação inequívoca dos peptídeos envolvidos no experimento de ligação cruzada.

O trabalho referente ao estudo de Varredura de Íon Precursor (PIS) para auxiliar na identificação de peptídeos modificados por ALC foi publicado no periódico *Analytical Chemistry*¹⁴⁰.

4.3. Estudo de Fragmentação de Espécies Intermoleculares por IRMPD e ECD

4.3.1. Formação de Espécies Intermoleculares para os Estudos de IRMPD e ECD

Diferente das espécies intermoleculares utilizadas anteriormente, nesta parte do trabalho estas espécies foram formadas pela reação entre dois peptídeos e o ALC, conforme ilustrado na Figura 42. Embora essa abordagem necessite de uma concentração muito maior de peptídeo e o rendimento da reação seja muito inferior, ela permite a formação de espécies intermoleculares grandes, capazes de apresentar um maior estado de carga. Neste caso os seguintes peptídeos foram utilizados Ac-ARAKGAEFAVYAGVR (P6); Ac-ARAKGAEFAVHAGVR (P7); Ac-ARAKGAEFAVSAGVR (P8); Ac-ARAYVALKA (P9) e Ac-ARAHVALKA (P10), todos com N-terminal acetilado, para evitar a reação nessa parte da molécula e com apenas um sítio reativo (lisina) frente aos ALCs. Os ALCs utilizados foram DSS, DSG e DSSeb. As espécies intermoleculares levadas em consideração neste estudo foram formadas entre os seguintes peptídeos P6-P7; P8-P9; P8-P10; P6-P8 e P7-P8, utilizando os três ALCs. Neste estudo foi avaliado o uso de métodos alternativos de dissociação para estudos de espécies intermoleculares, bem como a presença do N-terminal livre ou bloqueado (acetilado), a influência do estado de carga, a identidade do ALC e o na dissociação dessas espécies pelos métodos de IRMPD e ECD.

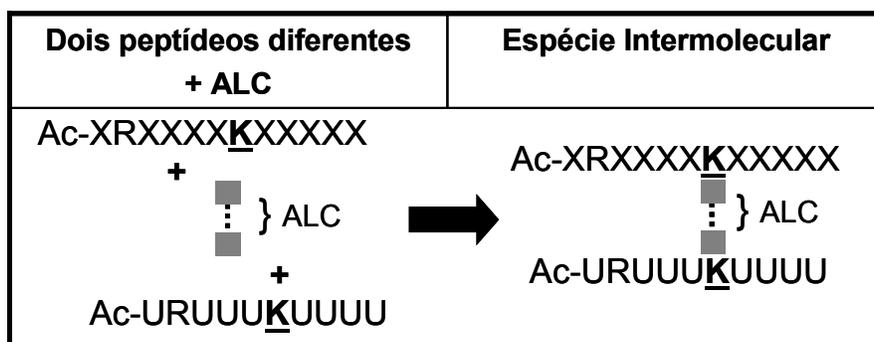


Figura 42. Formação de espécies intermoleculares a partir de dois peptídeos e ALC para estudos de IRMPD e ECD.

4.3.2. Fragmentação de Espécies Intermoleculares por IRMPD

O estado de carga mais elevado de cada peptídeo foi selecionado para experimentos de IRMPD. Para ilustrar as características observadas para todas as espécies intermoleculares estudadas temos na Figura 44A, B e C os espectros de IRMPD do estado de carga $[M+5H]^{5+}$ da espécie formado entre os peptídeos P6 e P7 utilizando os três ALCs: DSG (A, m/z 657,75), DSS (B, m/z 666,16) e DSSeb (C, m/z 671,77), da região de m/z 680 até 1150 (essa é a região mais povoada de cada espectro total, ilustrada aqui para facilitar a visualização das atribuições dos fragmentos formados). A fragmentação de P6-ALC-P7 (ALC = DSG, DSS ou DSSeb) por IRMPD mostra a formação de íons **b** e **y** convencionais, de ambas as cadeias, α e β (nos espectros temos a atribuição de cada fragmento bem como seu estado de carga). A primeira característica notada aqui é que a fragmentação ocorre exclusivamente em uma cadeia, enquanto a outra permanece intacta, e esse comportamento é observado para ambas as cadeias. Por exemplo, os íons fragmento **b**_{6 α} e **y**_{13 α} (para qualquer um dos ALCs), contêm o ALC e a cadeia β intacta em sua estrutura. De modo similar, os fragmentos **b**_{4 β} e **y**_{13 β} apresentam o ALC utilizado e a cadeia α intacta. A ausência de fragmentação paralela das cadeias faz com que grande parte dos íons fragmentos seja grande, pois contém ambas as cadeias em sua estrutura, e apresentem elevado estado de carga. Como previamente mostrado neste trabalho, esse fato vai contra a fragmentação de espécies intermoleculares utilizando CID, onde fragmentação paralela foi observada, especialmente quando ambas as cadeias possuem tamanhos semelhantes. Outra característica observada é a presença de fragmentos referentes às cadeias intactas: m/z 804,43 (2+) para a cadeia α e m/z 791,43 (2+) para cadeia β . Esta característica é mais acentuada no espectro da espécie P6-DSS-P7 (Figura 44B), embora também esteja presentes para P6-DSG-P7 e P6-PSSeb-P7 em intensidade menor.

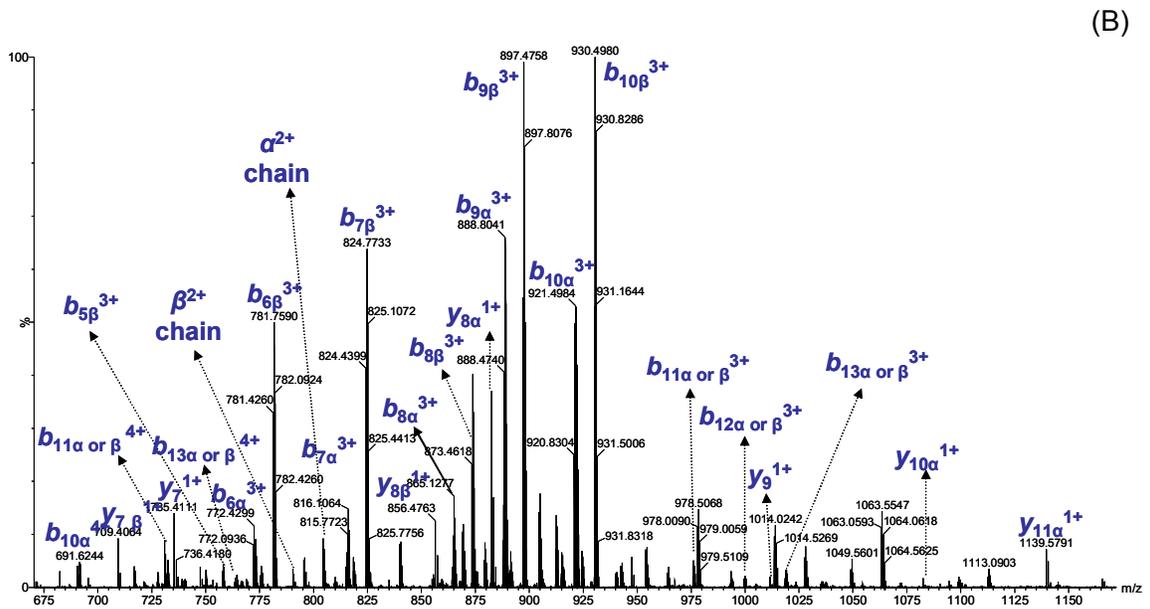
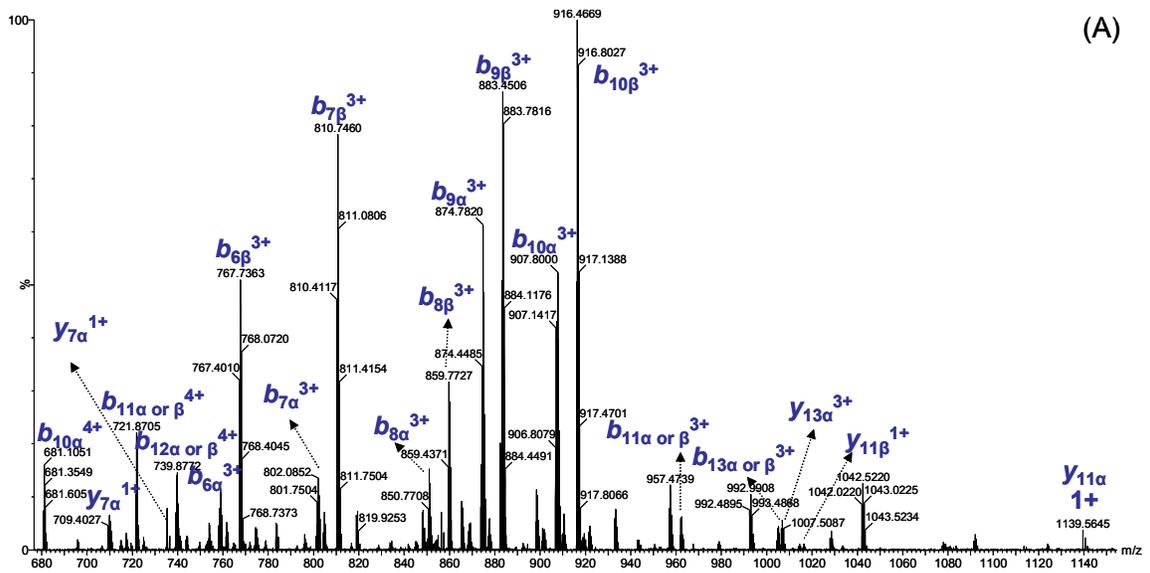


Figura 43. (Continua).

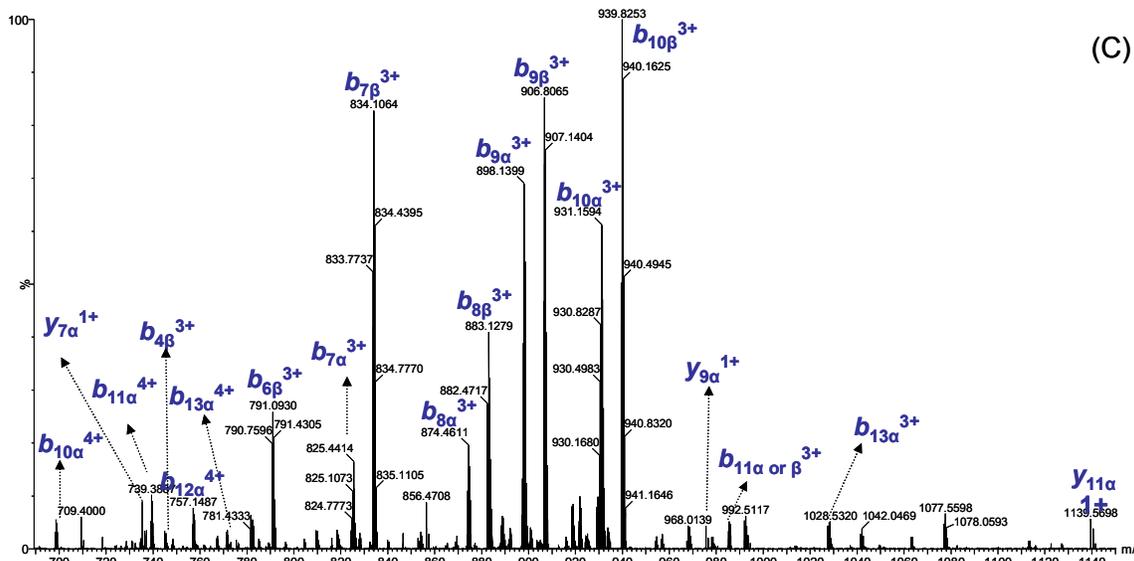


Figura 443. Espectro de IRMPD do estado de carga $[M+5H]^{5+}$ das espécies formadas entre os peptídeos P6 e P7 utilizando os três ALCs: DSG (A, m/z 657,75), DSS (B, m/z 666,16) e DSSeb (C, m/z 671,77), da região de m/z 680 até 1150.

A Figura 45 ilustra a cobertura obtida por IRMPD para o estado de carga $[M+5H]^{5+}$ da espécie P6-ALC-P7 utilizando DSG (linha tracejada), DSS (linha preta) e DSSeb (linha cinza). Com base nesta figura é possível notar que a identidade do ALC não influencia a fragmentação por IRMPD. Para este mesmo estado de carga, cobertura semelhante foi obtida para as demais espécies intermoleculares.

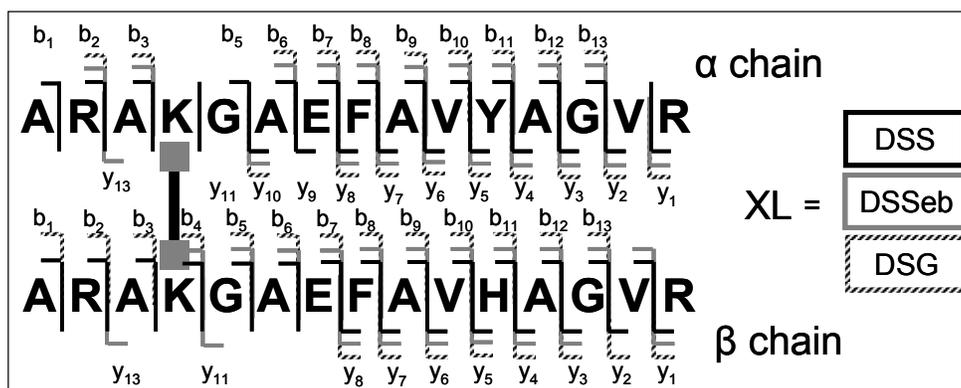


Figura 45. Cobertura obtida por IRMPD para o estado de carga $[M+5H]^{5+}$ da espécie P6-ALC-P7 utilizando DSG (linha tracejada), DSS (linha preta) e DSSeb (linha cinza).

Para os estudos de influência do estado de carga foi observado que os espectros da espécie P8-DSS-P10 (Figura 46) com três cargas (m/z 883,16) em A de m/z 175 a 975 e B de m/z 880 a 1190 e com quatro cargas (m/z 662,63). A cobertura obtida para essa espécie nos dois estados de carga esta presente na Figura 47 e, como pode ser observado, com exceção dos íons fragmentos $y_{14\alpha}$, $y_{5\beta}$, $y_{6\beta}$ e $y_{7\beta}$ de $[M+3H]^{3+}$ e $b_{11\alpha}$ e $b_{12\alpha}$ de $[M+4H]^{4+}$, todos os demais fragmentos estão presentes em ambos os espectros de IRMPD e esses dois estados de carga apresentam coberturas semelhantes. Fragmentos com duas cargas são dominantes para o precursor triplamente carregado, enquanto que a espécie com quatro cargas gera fragmentos com duas e três cargas com quantidades semelhantes. A mesma comparação, em relação a influência do estado de carga, foi realizada para as demais espécies intermoleculares e resultados idênticos foram obtidos.

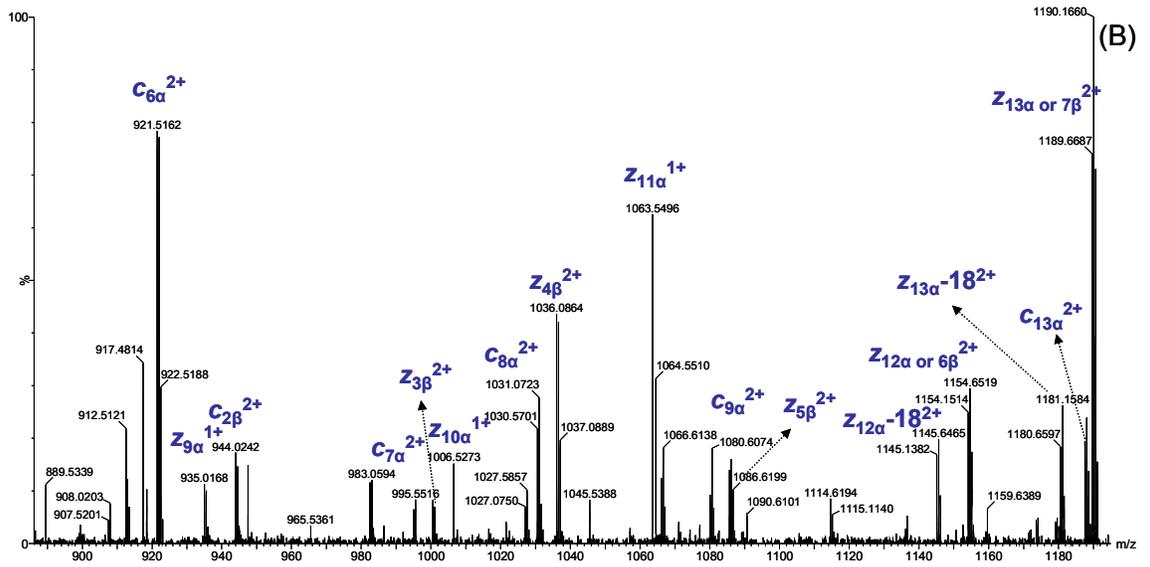
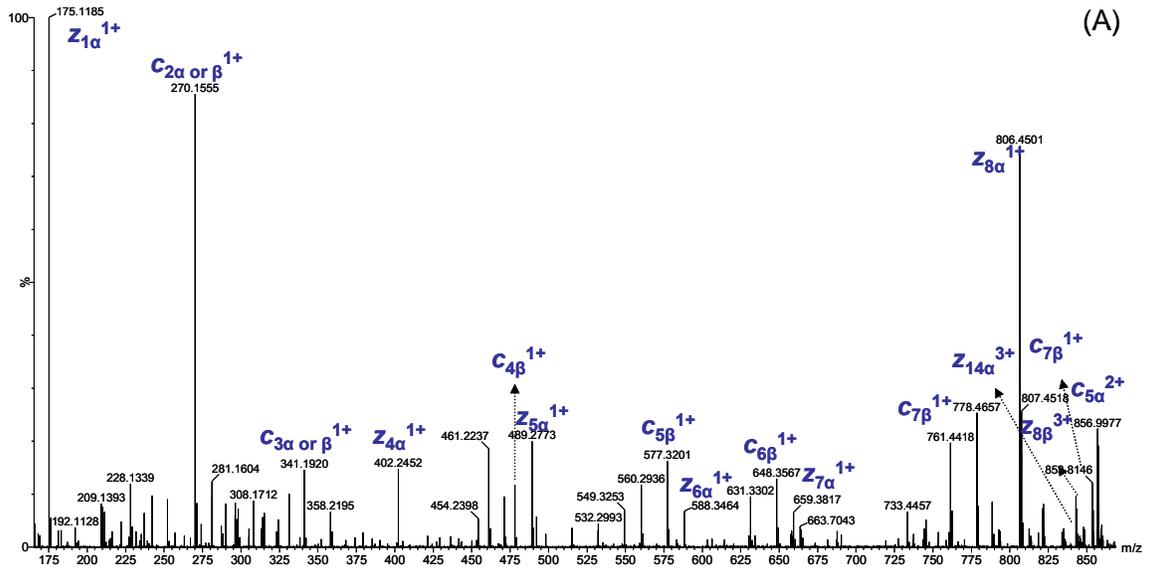


Figura 45. (Continua).

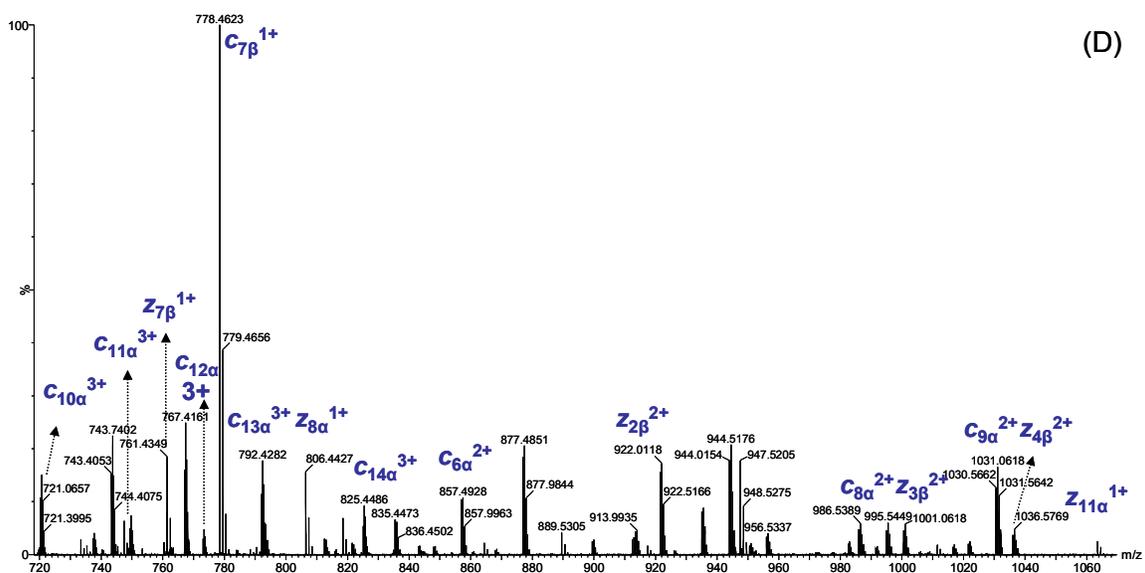
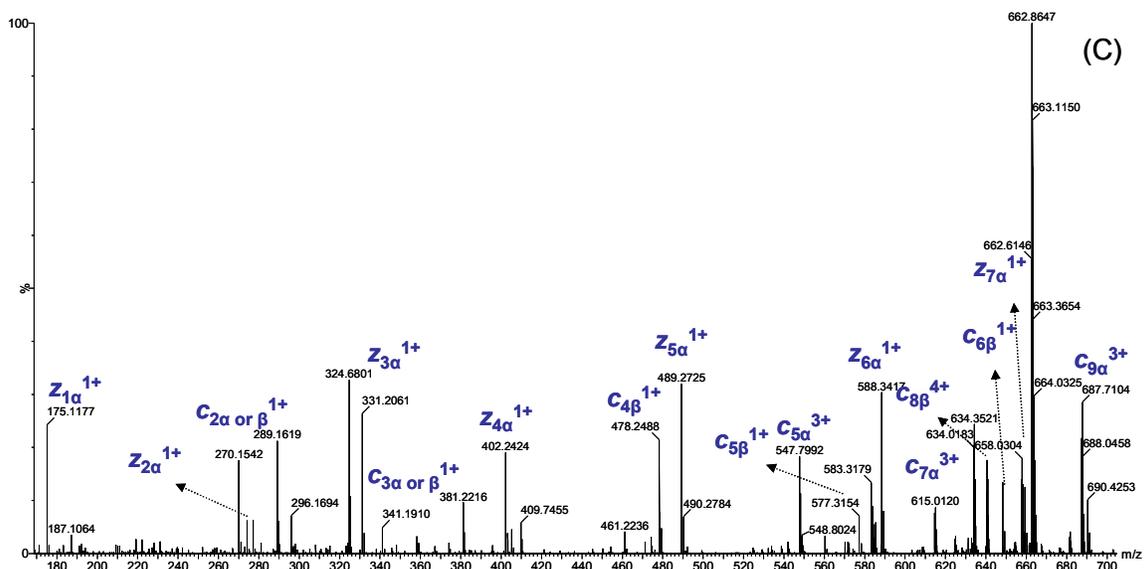


Figura 46. Espectros de IRMPD da espécie P8-DSS-P10 com três cargas (m/z 883,16) em (A) de m/z 175 a 975 e (B) de m/z 880 a 1190; e com quatro cargas (m/z 662,63) em (C) de m/z 175 a 710 e (D) de m/z 720 a 1070.

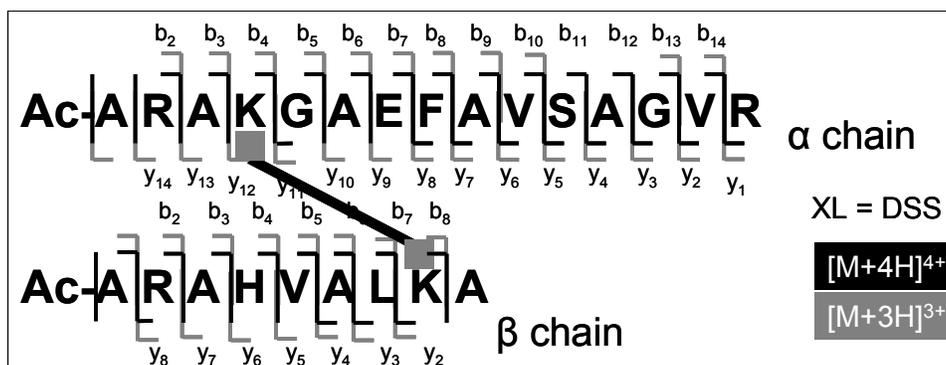


Figura 47. Cobertura obtida para P8-DSS-P10 com três (traços cinza) e quarto cargas (traços pretos).

Para verificar se N-terminal bloqueado ou livre influencia a dissociação por IRMPD, as espécies intermoleculares P6-DSS-P7, P6-DSS-P8 e P7-DSS-P8 foram digeridas com tripsina, tornando o N-terminal livre, e o maior estado de carga ($[M+4H]^{4+}$) foi submetido a experimentos de IRMPD. Na Figura 48 temos os espectros de IRMPD desses peptídeos bem como a cobertura obtida para cada um deles e, como verificado nesta figura, é notado que o padrão de fragmentação para as espécies intermoleculares, com N-terminal livre, ou não, influencia de modo significativo a fragmentação por IRMPD.

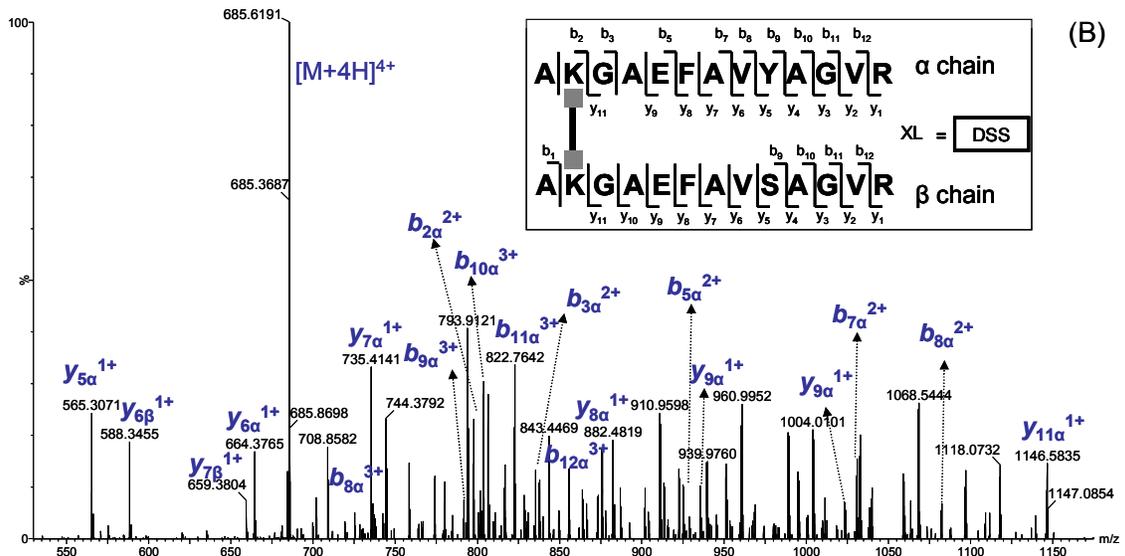
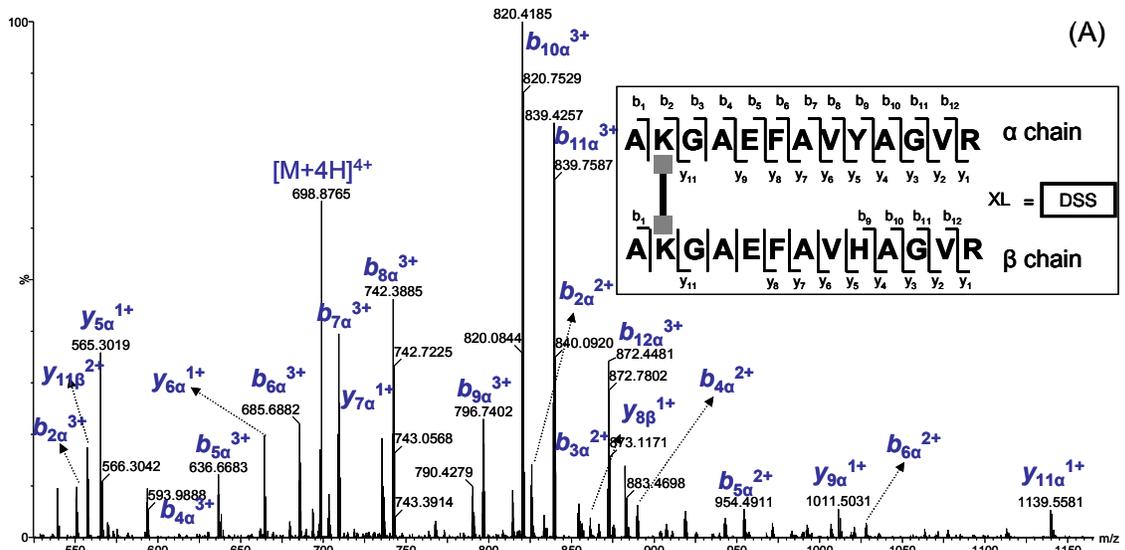


Figura 47. (Continua).

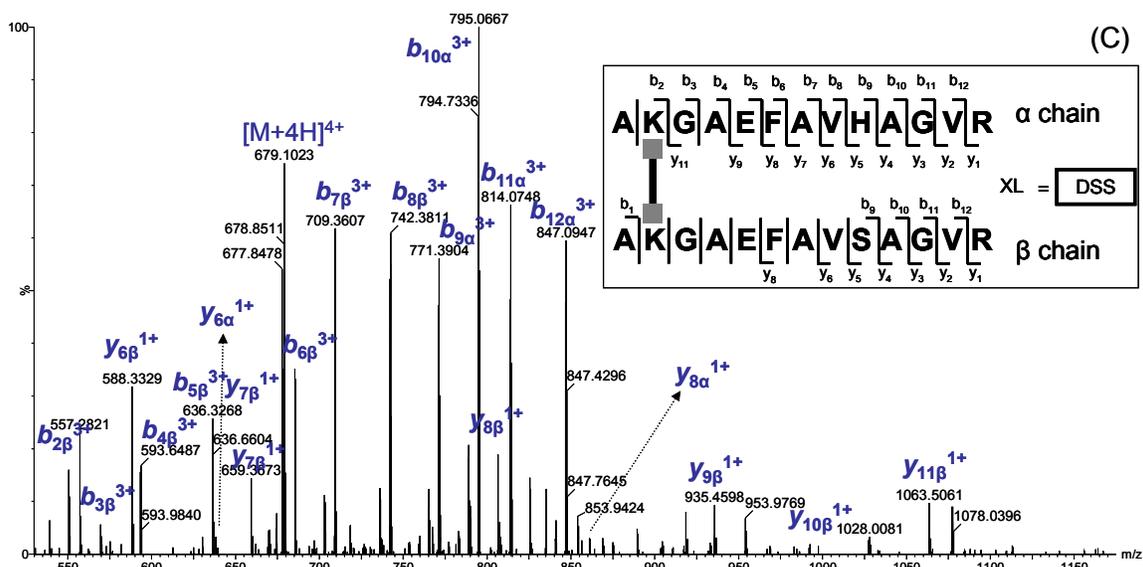


Figura 48. Espectro de IRMPD e coberturas obtidas para estado de carga $[M+4H]^{4+}$ das espécies com N-terminal livre das espécies P6-DSS-P7 (A), P6-DSS-P8 (B) e P7-DSS-P8 (C).

4.3.3. Fragmentação de Espécies Intermoleculares por ECD

Assim como para IRMPD, o maior estado de carga de cada espécie intermolecular foi submetido a experimentos de ECD. De modo geral, ECD apresenta uma baixa eficiência de dissociação, fornecendo fragmentos com intensidade muito menor do que o precursor, fato descrito na literatura e comumente observado em ECD de proteínas^{105,141,142}. Desse modo, em espectros de ECD, com exceção do íon precursor, o íon mais intenso normalmente corresponde ao íon referente à captura de um elétron pelo precursor multicarregado, levando a formação da espécie $[M+nH]^{(n-1)+}$, sendo também comumente presente, mas com intensidade inferior um íon referente a captura de dois elétrons, gerando a espécie $[M+nH]^{(n-2)+}$. Na Figura 49 temos os espectros de ECD dos precursores com cinco cargas das seguintes espécies intermoleculares P6-DSG-P7 (A), P6-DSS-P7 (B) e P6-DSSeb-P7 (C) (m/z 658,15; 666,55 e 671,71, respectivamente) e, em todos os casos, o íon mais intenso é o precursor, seguido pela espécie $[M+nH]^{(n-1)+}$.

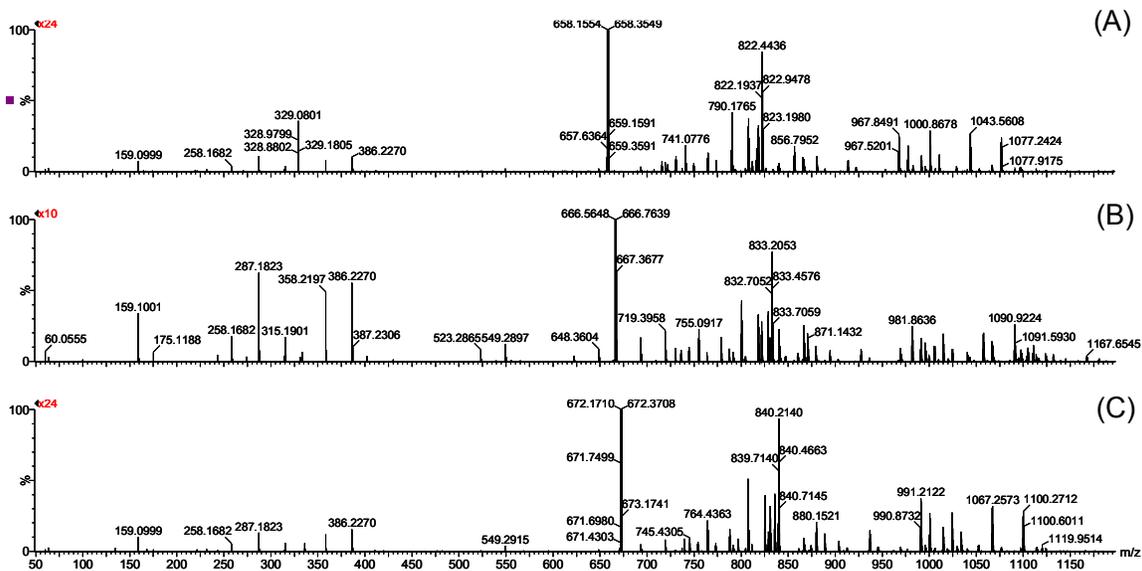


Figura 49. Espectros de ECD dos precursores com cinco cargas das espécies intermoleculares P6-DSG-P7 (A), P6-DSS-P7 (B) e P6-DSSeb-P7 (C). Em todos os casos, o íon mais intenso é o precursor, seguido pela espécie $[M+nH]^{(n-1)+}$.

Para facilitar a visualização da atribuição realizada em todas as espécies temos na Figura as expansões do espectro atribuído de ECD para a espécie P6-DSS-P7: de m/z 150 a 660 (A), 670 a 790 (B) e 1000 a 1610 (C). Como esperado, temos apenas a presença de íons fragmentos **c** e **z**, além de íons correspondentes às cadeias α (m/z 1607,9; 1+) e β (m/z 1581,9; 1+ e m/z 791,5; 2+). Verificamos um grande número de íons fragmentos, sendo que praticamente todos foram atribuídos; muitos deles estão presentes em diferentes estados de carga, que varia de 1+ até 4+. Como presente na Figura 49, todos os espectros de ECD são muito similares, apresentando o mesmo padrão de fragmentação e atribuição para as outras espécies estudadas.

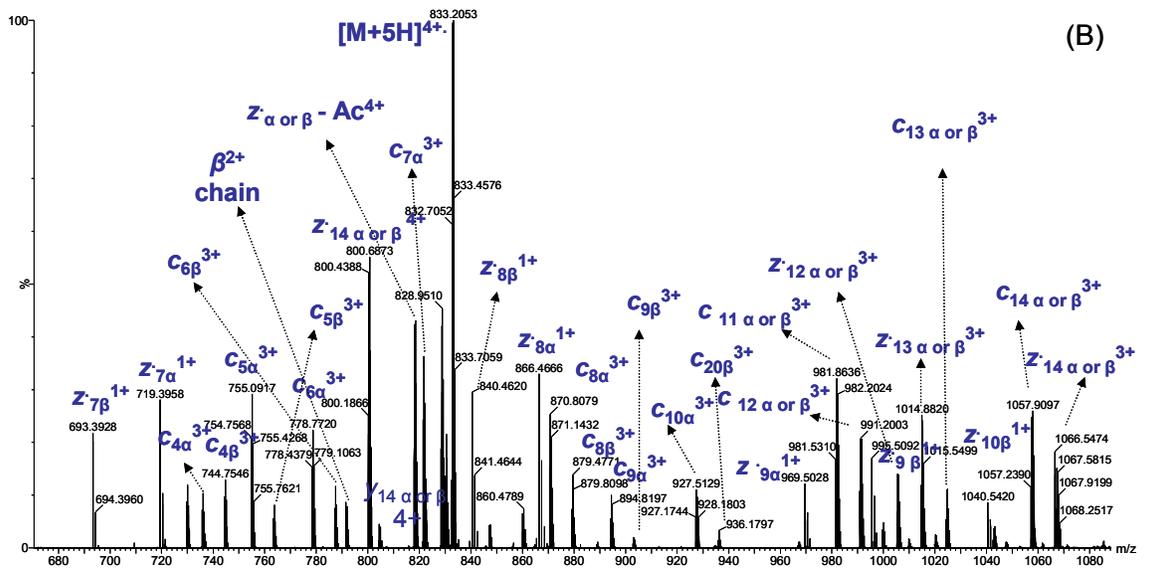
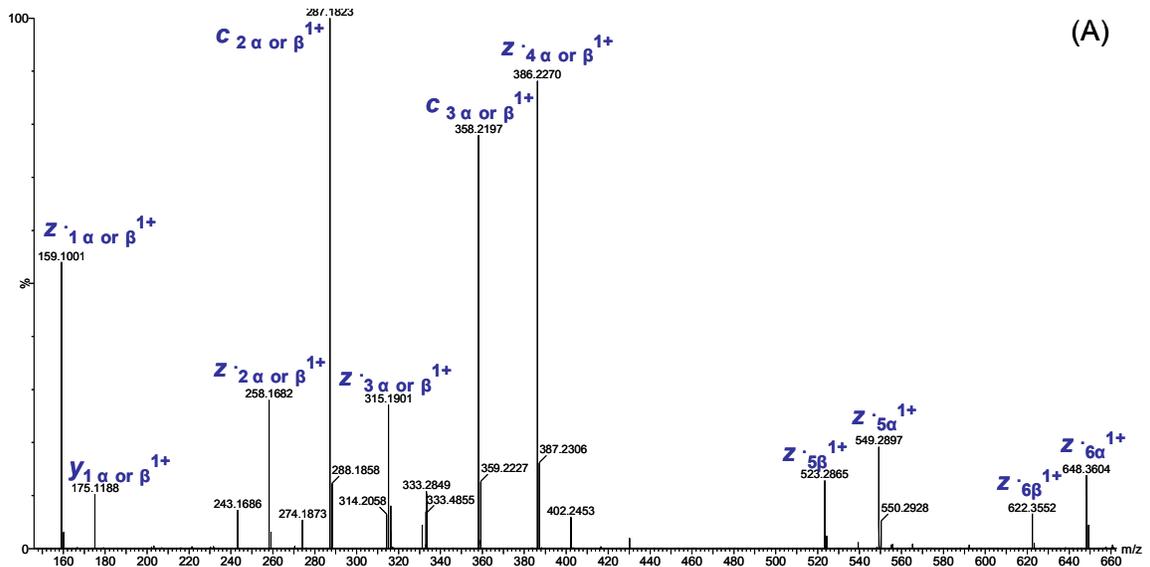


Figura 49. (Continua).

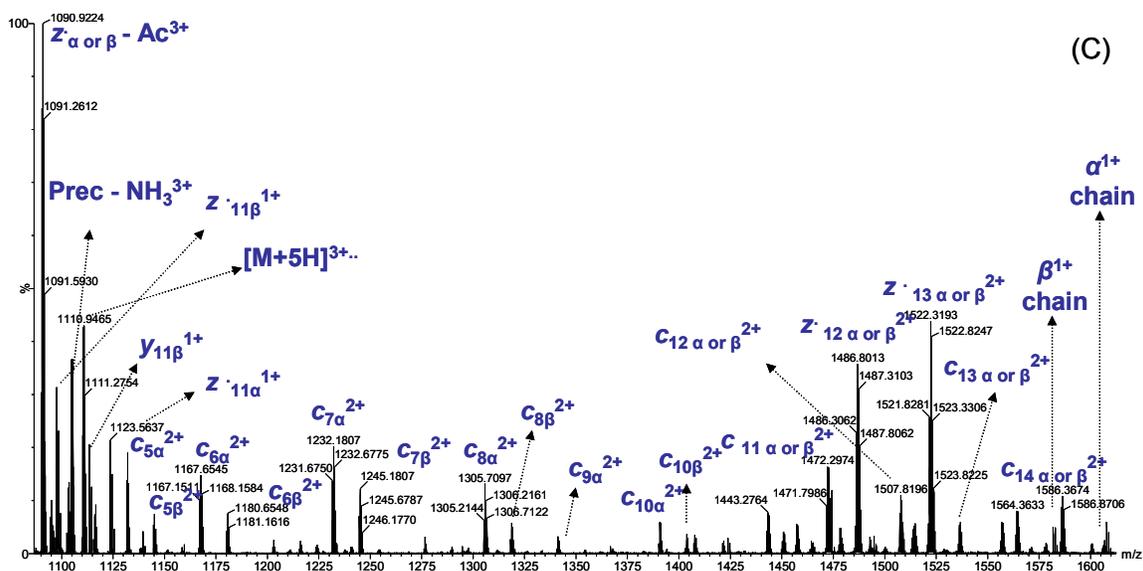


Figura 49. Espectro atribuído de ECD para a espécie P6-DSS-P7: de m/z 150 a 660 (A), 670 a 790 (B) e 1000 a 1610 (C).

A cobertura obtida, de praticamente 100%, para o precursor com cinco cargas, baseada em íons c e z da espécie formada entre P6 e P7, com os três ALC: DSG (linha tracejada), DSS (linha preta) e DSSeb (linha cinza) está ilustrada na Figura 50 e, assim como em IRMPD e CID, a identidade dos ALCs utilizados neste estudo não influencia na dissociação de espécies intermoleculares. Cabe salientar que os ALCs possuem estruturas semelhantes, diferenciando-se apenas pelo tamanho da cadeia alifática.

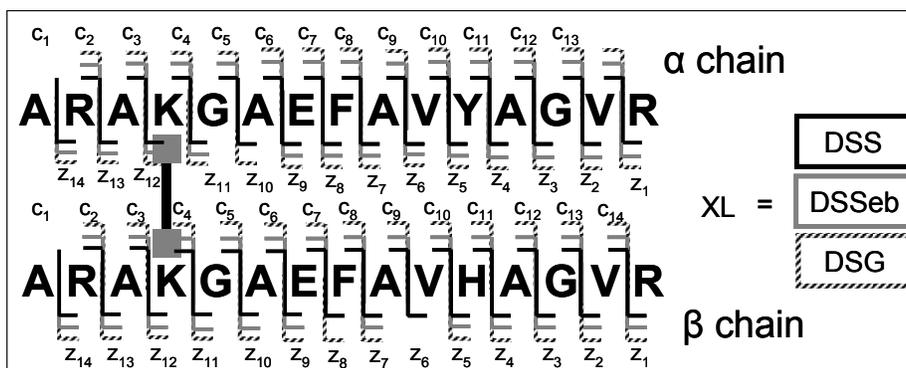


Figura 50. Cobertura obtida para o precursor com cinco cargas, da espécie formada entre P6 e P7, com os três ALC: DSG (linha tracejada), DSS (linha preta) e DSSeb (linha cinza).

Assim como no caso de IRMPD, como pode ser verificado nos espectros atribuídos e as respectivas coberturas obtidas presentes na Figura 51 para as espécies P6-DSS-P7 (A), P6-DSS-P8 (B) e P7-DSS-P8 (C), o fato do N-terminal aparecer bloqueado ou não, não influencia na dissociação dessas espécies.

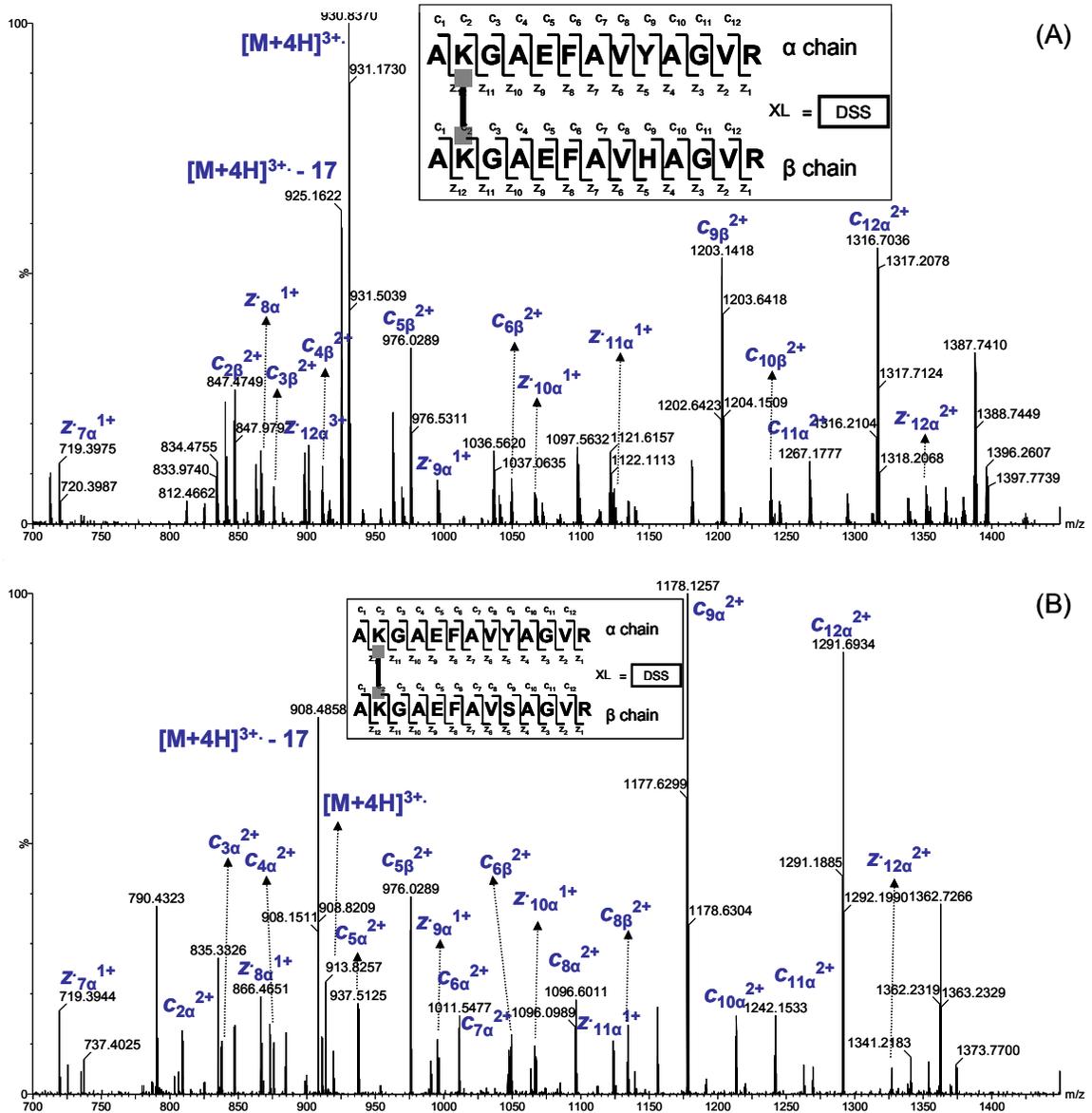


Figura 51. (Continua).

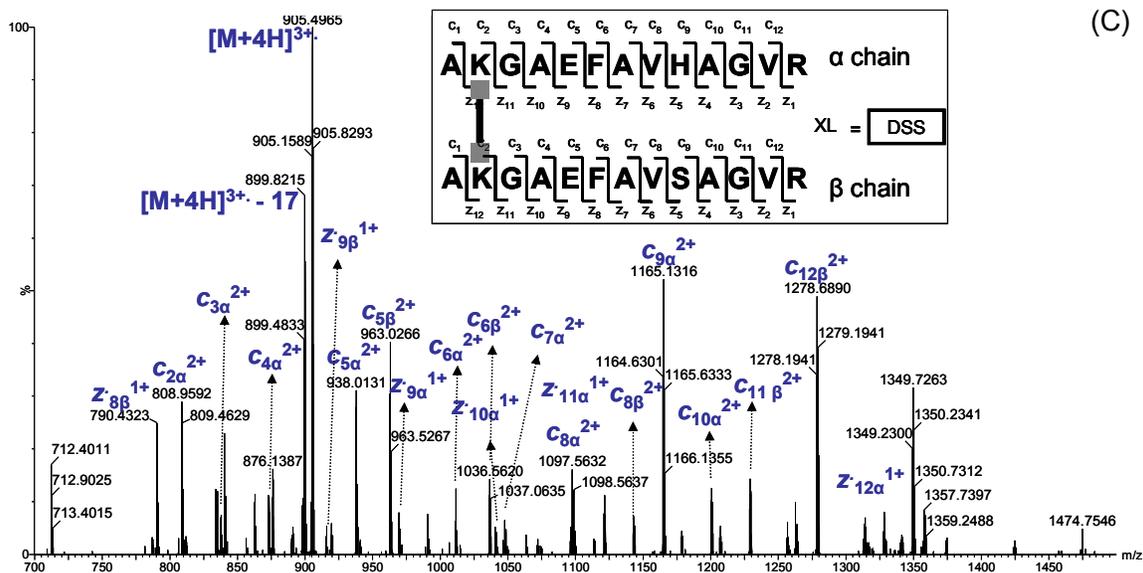


Figura 51. Espectros atribuídos e as respectivas coberturas para as espécies P6-DSS-P7 (A), P6-DSS-P8 (B) e P7-DSS-P8 (C) com N-terminal livre.

Diferente de IRMPD, o estado de carga mostrou grande influência na dissociação por ECD. Este fato é verificado em todas as espécies e esta ilustrado nos espectros (Figura 52) e nas coberturas (Figura 53) obtida para a espécie P8-DSSeb-P10 com três (A, m/z 892,5; traços cinza) e quatro (B, m/z 669,6; traços pretos) cargas. Como mostrado nos espectros, o estado de carga +4 apresentou um número muito maior de fragmentos, que aparecem normalmente com duas e três cargas, enquanto que para o precursor com três cargas gerou um número inferior de fragmentos, quase sempre monocarregados. Assim como no caso do precursor com cinco cargas, a cobertura obtida para a espécie com quatro cargas foi de praticamente 100% enquanto que com três cargas uma cobertura muito inferior foi observada, especialmente para a série de íons $Z'_{3\beta}$ a $Z'_{6\beta}$ e de $C_{8\alpha}$ to $C_{14\alpha}$.

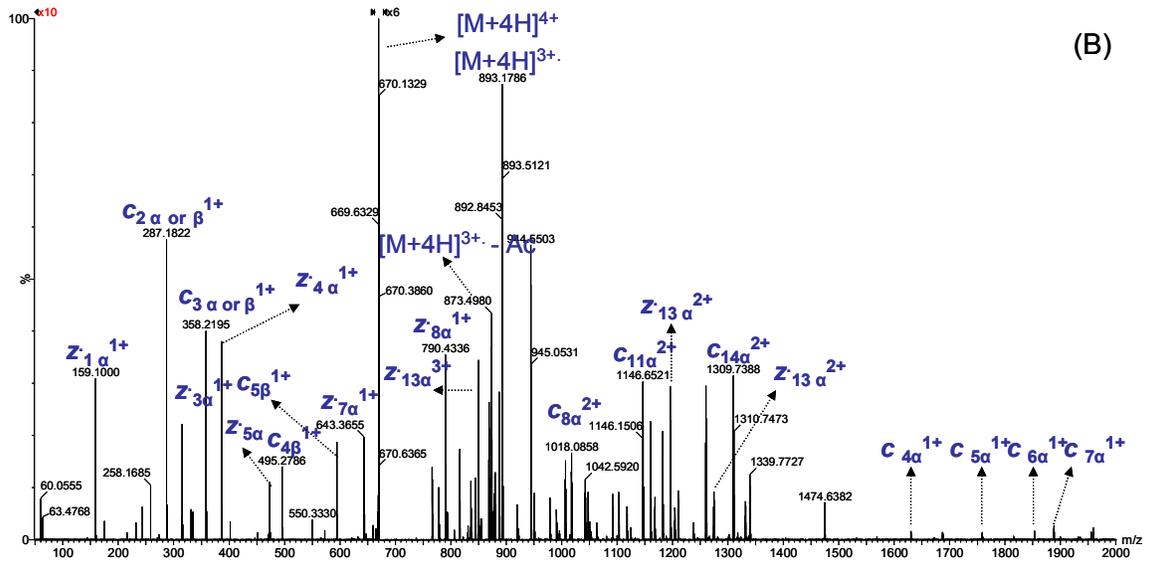
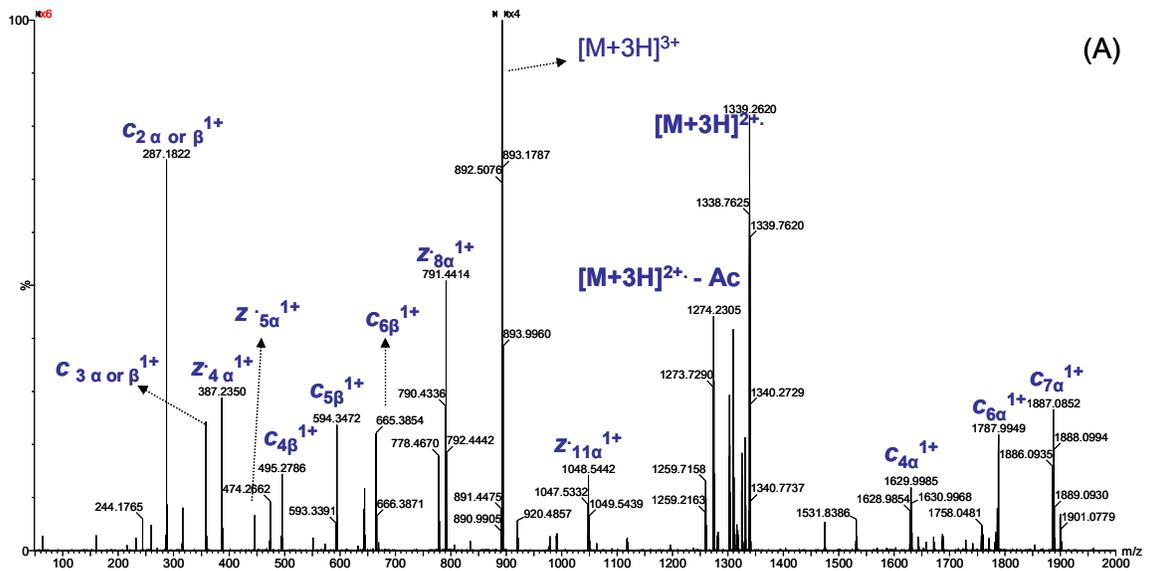


Figura 52. Espectros anotados de ECD da espécie P8-DSSeb-P10 com três (A, m/z 892,5) e quatro (B, m/z 669,6) cargas.

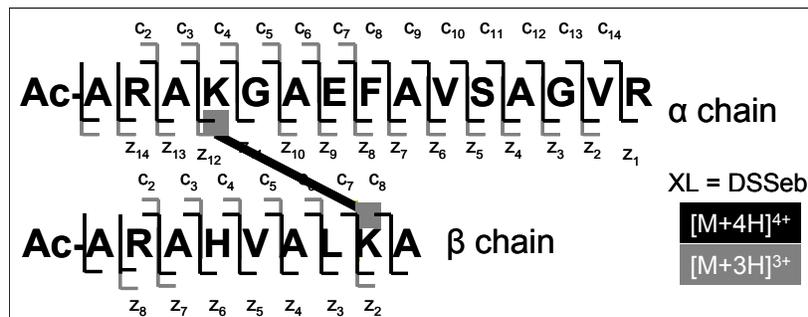


Figura 53. Cobertura obtida para P8-DSSeb-P10 com três (traços cinza) e quarto cargas (traços pretos).

De modo geral tanto IRMPD quanto ECD apresentaram uma ótima cobertura das sequências das espécies intermoleculares estudadas quando comparado com CID, dando destaque para ECD de precursores com estado de carga +4 ou maior sendo, nesses casos, capaz de gerar fragmentos referentes a praticamente todos os possíveis íons **c** e **z**. Ambas as técnicas de dissociação mostraram-se robustas, de modo que as coberturas obtidas foram praticamente as mesmas, independente se o N-terminal apresenta-se bloqueado ou não, ou ainda quando utilizando diferentes ALCs. Como anteriormente mencionado, não foi observado fragmentação paralela nas cadeias, e íons referentes às cadeias α e β mostraram-se presente em ambas as técnicas.

ECD apresentou-se mais sensível aos diferentes estados de carga, de modo que íons precursores triplamente carregados não forneceram cobertura de sequência tão boa quanto os estados de carga mais elevados. Cabe salientar que em estudos proteômicos convencionais, que utilizam tripsina como enzima, cada peptídeo gerado deve apresentar dois sítios básicos de protonação: o N-terminal e o C-terminal (lisina ou arginina), fornecendo peptídeos com estados de carga 2+ ou 3+; por outro lado, em estudos de ligação cruzada de proteínas, as espécies intermoleculares devem apresentar quatro sítios de protonação: dois N-terminais e dois C-terminais, o que deve acarretar em íons precursores com maior estado de carga (4+ ou maior). Desse modo o uso das técnicas de fragmentação ECD ou ETD deve facilitar a identificação de espécies intermoleculares, as de maior interesse em experimentos de ligação cruzada de proteínas, trazendo uma grande vantagem para esse campo de estudo. Embora os estudos realizados neste trabalho fizeram uso de ECD, a técnica de ETD deve apresentar as mesmas características observadas aqui, trazendo como vantagem o uso de uma tecnologia presente em instrumentos mais acessíveis do que FT-ICR.

O estudo referente à fragmentação de espécies intermoleculares por IRMPD e ECD foi recentemente aceito para publicação no periódico *Journal of Mass Spectrometry*¹⁴³.

4.4. Estudo de Mobilidade Iônica de Peptídeos Modificados por ALC

4.4.1. Separação de Espécies Isoméricas do Tipo *Dead-end*

Os experimentos de separação de isômeros de espécies do tipo *dead-end* foram conduzidos no instrumento Synapt HDMS, utilizando ESI como fonte de ionização. Como relatado previamente, trata-se de um instrumento do tipo Q-Tof modificado, com uma cela capaz de realizar separação por mobilidade iônica entre os analisados quadrupolo e ToF, conforme ilustrado na Figura 54.

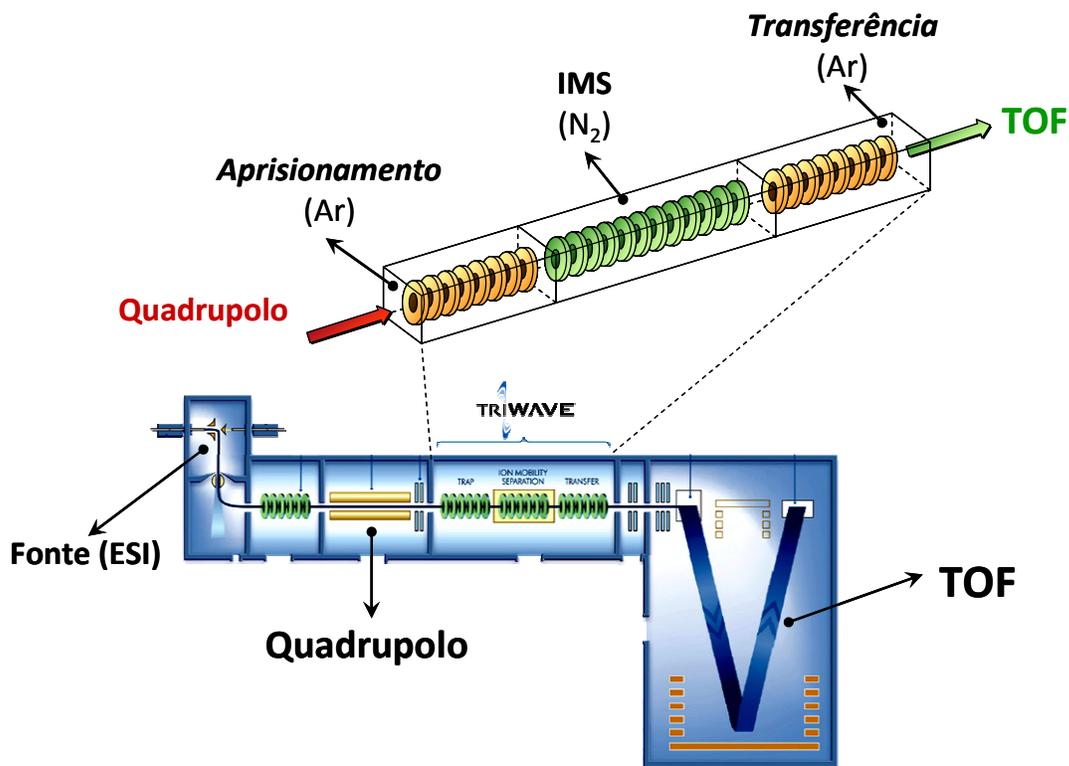


Figura 54. Esquema do instrumento Synapt HDMS utilizado nos experimentos de separação por mobilidade iônica de isômeros do tipo *dead-end*. Na ampliação é mostrada a cela de mobilidade iônica (IMS), localizada entre o quadrupolo e o ToF. Logo após o quadrupolo temos a cela responsável pelo aprisionamento, seguida pela cela de IMS e posteriormente a cela de transferência. Tanto a cela de aprisionamento quanto a cela de transferência possibilitam a fragmentação de íons (ambas são preenchidas com Ar, enquanto que a cela de IMS é preenchida com N₂).

Para realização dos experimentos de mobilidade iônica de isômeros do tipo *dead-end* os produtos de reação dos peptídeos Ac-RKR₁VWSEKGNMAR (P1), Ac-ARYTKDLSQRAFKGMR (P4), Ac-ARAKGAEFAVKAGVR (P11) e AGAKGAERLVKAGVR (PX) após a reação com DSS foram infundidos diretamente no instrumento Synapt HDMS. Com exceção de PX, todos os demais peptídeos apresentam o N-terminal acetilado e duas lisinas em sua sequência, de modo que a reação com o peptídeo deve ocorrer em um desses dois resíduos, gerando então os dois isômeros. No caso de PX, além das duas lisinas, temos o N-terminal como sítio reativo, e três isômeros são esperados. Para cada uma das amostras o quadrupolo foi utilizado para seleção das *m/z* referentes às espécies *dead-end* triplamente carregadas de cada peptídeo, a separação ocorreu na cela de mobilidade (IMS) e a energia de colisão da cela de transferência foi gradualmente aumentada até obter uma fragmentação satisfatória dos precursores de interesse. Essa metodologia permite realizar a separação de espécies isoméricas (de mesma *m/z*) na cela de IMS, seguida por posterior fragmentação na cela de transferência, fazendo com que os fragmentos de cada isômero apresentem o mesmo tempo de chegada (ATD – *arrival time distribution*) de seus respectivos precursores (que foram previamente separados).

Para distinguir entre os diferentes isômeros, após a aquisição com fragmentação na cela de transferência, um espectro de íons produtos obtido após o acumulo do ATD total foi gerado; a corrente iônica de íons fragmentos referentes aos íons contendo ou não a modificação por DSS, ou seja do tipo y_n/y_{n+156} (156 Da refere-se à modificação proporcionada pelo DSS hidrolisado), foram traçados e o ATD separado de cada um destes fragmentos (y_n ou y_{n+156}) representam os isômeros com modificação na primeira lisina (y_n) ou na segunda lisina (y_{n+156}). Se a modificação ocorreu na primeira lisina, devemos ter uma série inicial de íons y que não contém a modificação e, por outro lado, quando a modificação ocorre na segunda lisina, os íons y iniciais, que contém a última lisina em sua estrutura devem aparecer modificados por + 156 Da. Desse modo, quando ocorre separação por IMS, mesmo quando não é possível observar uma

clara separação entre os diferentes isômeros, quando acumulamos as extremidades do ATD total obtemos dois espectros de íons produtos distintos, um de cada isômero.

Para ilustrar o procedimento empregado temos na Figura 55 o estudo referente ao peptídeo P11. Na Figura 55A temos o ATD total, onde é possível verificar a presença de dois picos não resolvidos na linha base. Quando acumulamos as extremidades deste ATD, regiões 1 e 2 da Figura 55A, temos os espectros de íons produtos presentes em C e D, respectivamente. Analisando estes espectros é possível verificar que estes são provenientes de espécies diferentes e, como pode ser visto pelas atribuições realizadas para cada um deles, o espectro presente na Figura 55C (região 1) refere-se ao isômero com modificação na segunda lisina, enquanto que na Figura 55D (referente a região 2), temos o espectro do isômero com modificação na primeira lisina. De acordo com as sequências dos isômeros, ambos apresentam até o íon y_4 fragmentos de mesma m/z ; no entanto, a partir do íon y_5 (quando série de íons y atinge a primeira lisina) o isômero com modificação na última lisina (região 1) apresentou a m/z referente a este fragmento acrescido de 156 Da (íons contendo a modificação estão anotados com um *). Para esta espécie, o mesmo descolamento de massa está presente na série de íons y_5 até y_8 (ilustrados neste espectro como y_5^* , y_6^* , y_7^* e y_8^*). Já quando temos o espectro referente à modificação na primeira lisina (Figura 55D) vemos a série de íons y_5 até y_9 sem o deslocamento de massa referente à modificação causada por DSS, indicando que a reação com DSS ocorreu na primeira lisina. Quando extraímos os ATDs dos íons y_5 , de m/z 530,3; e y_5^* , de m/z 686,4 (Figura 55B), verificamos claramente a presença dos dois isômeros.

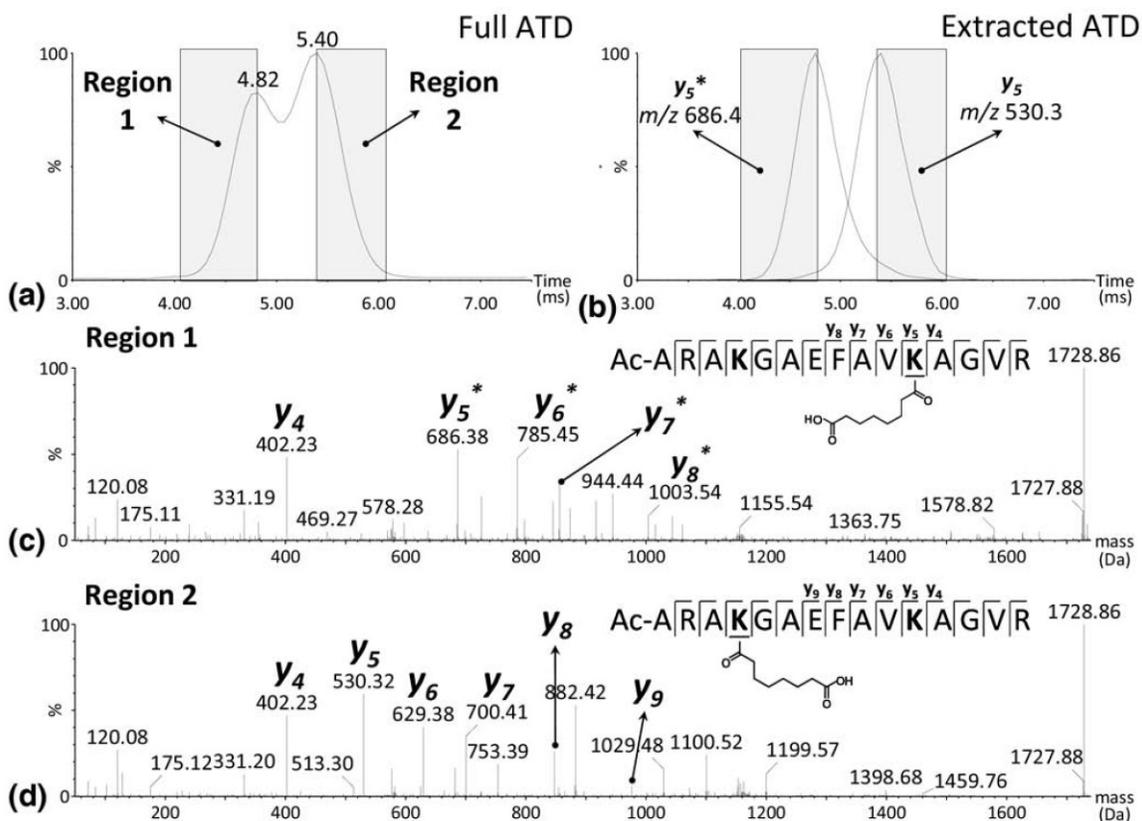


Figura 55. Distribuição por tempo de chegada (ATD) e espectros de íons produtos dos isômeros *dead-end* do peptídeo P11. (A) ATD total, em cinza temos as regiões acumuladas para fornecer os espectros de íons produtos presentes (C) e (D). Em (B) temos os ATDs extraídos dos íons fragmentos y_5 (não modificados, reação com DSS ocorreu na primeira lisina) e y_5^* (modificado, indicando que a reação ocorreu na segunda lisina). Em (C) temos o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na segunda lisina; e em (D) o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na primeira lisina.

O procedimento de traçar a corrente iônica de íons fragmentos específicos para cada isômero permitiu a separação da mistura isomérica mesmo quando o ATD total apresenta um único pico largo. Por exemplo, no caso de P1 (Figura 56A) o ATD total apresenta um único pico, mas, quando acumulamos as extremidades (regiões 1 e 2), os espectros de fragmentação obtidos (Figura 56C e D, respectivamente) nos mostram a presença dos dois isômeros e, quando traçamos a corrente iônica de fragmentos específicos para cada isômero, obtemos dois picos, com ATDs diferentes, referentes a cada um destes isômeros (Figura 56B): a espécie com modificação na primeira lisina apresenta uma mobilidade maior, identificada pela corrente iônica do íon fragmento y_6 , específico para este isômero, de m/z 676,3; já a espécie com

modificação na segunda lisina apresentou um maior mobilidade, identificada, pelo íon y_6^* , m/z 832,4.

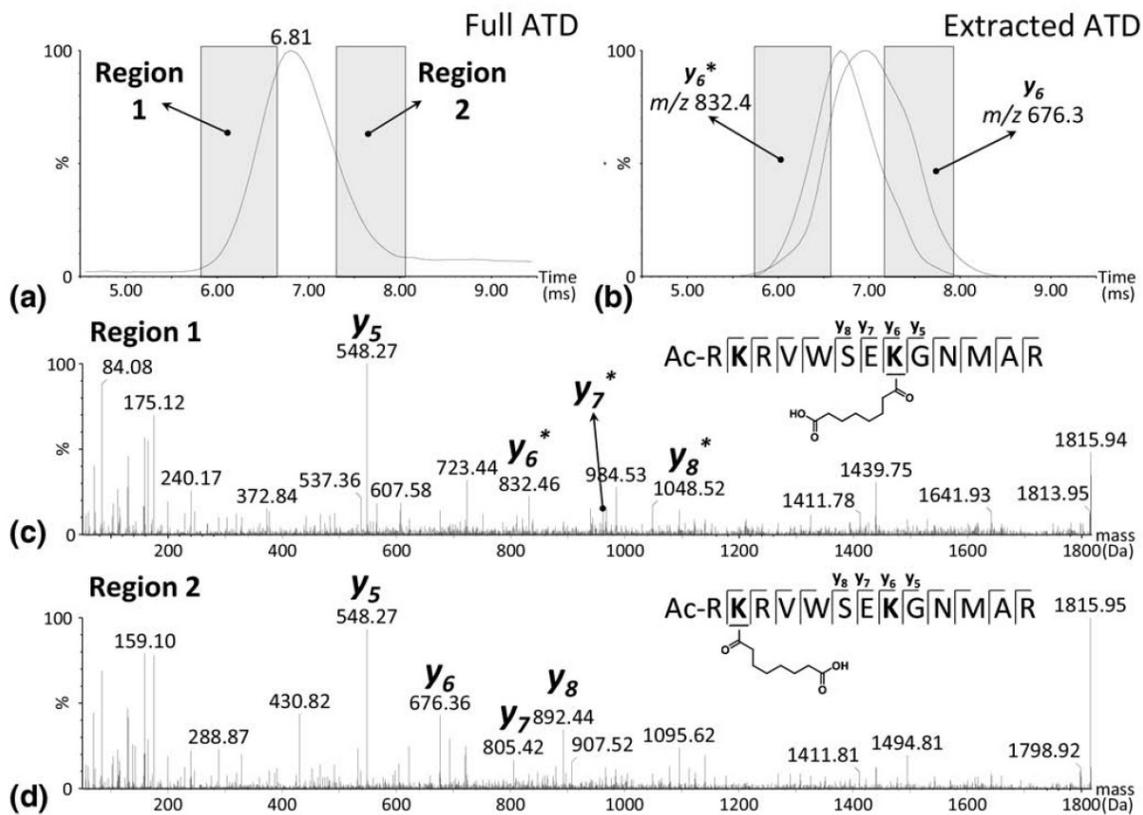


Figura 56. Distribuição por tempo de chegada (ATD) e espectros de íons produtos dos isômeros *dead-end* do peptídeo P1. (A) ATD total, em cinza temos as regiões acumuladas para fornecer os espectros de íons produtos presentes (C) e (D). Em (B) temos os ATDs extraídos dos íons fragmentos y_6 (não modificados, reação com DSS ocorreu na primeira lisina) e y_6^* (modificado, indicando que a reação ocorreu na segunda lisina). Em (C) temos o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na segunda lisina; e em (D) o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na primeira lisina.

O mesmo comportamento observado para P1 foi verificado para P4, ou seja, mesmo apresentando apenas um único pico, após traçar a corrente iônica de íons fragmentos específicos para cada isômero foi possível verificar a separação da mistura. O menor grau de separação entre os isômeros de P1 e P4 podem ser explicados pois, para ambos os peptídeos, os isômeros de *dead-end* devem assumir estrutura terciárias com seções de choque próximas, o que impossibilita uma separação tão boa quanto a observada para P11. No entanto, uma vez que sabemos quais íons fragmentos são característicos de cada

isômero podemos traçar as correntes iônicas desses fragmentos, e obter os ATDs referentes a cada isômero. O último peptídeo estudado, PX, apresentou o maior desafio, pois, após a reação com DSS, temos três isômeros: um que reagiu no N-terminal e outros dois que reagiram em cada uma das lisinas. A Figura 57A apresenta o ATD total deste peptídeo e, como pode ser visto, um único pico está presente. O acúmulo da região 1 gera o espectro de íons fragmentos ilustrado em Figura 57C e o íon y_5^* (m/z 686,4; que contém a modificação) indica o isômero onde a modificação ocorreu na última lisina. Já quando acumulamos a região 2 verificamos íons dos dois isômeros restantes, de modo que distinguir a separação entre os isômeros que reagiram no N-terminal ou na primeira lisina (Figura 57D), isso indica que esses dois isômeros apresentam conformações muito semelhantes, enquanto o isômero em que o DSS reagiu na última lisina deve assumir uma conformação com seção de choque diferente dos outros dois (Figura 57B).

Uma vez que a análise por mobilidade é capaz de revelar qual lisina está modificada pelo DSS, estes experimentos foram aplicados no estudo da reatividade intrínseca de lisinas: a reação de ligação cruzada entre os peptídeos e o ALC foi realizada em três diferentes pHs, para avaliar se o pH influencia na reatividade das diferentes lisinas. Até o momento as análises foram realizadas para os isômeros obtidos após a reação com pH 7,0; além destes, outros dois pHs foram avaliados: pHs 6,0 e 8,0. Como exemplo representativo temos os dados de mobilidade do peptídeo P1 ilustrado na Figura 58. Nesta figura temos os ATDs referentes às correntes iônicas dos íons y_6 , proveniente do isômero onde a modificação ocorreu na primeira lisina e y_6^* , onde a modificação ocorreu na segunda lisina, nas três condições (três diferentes pHs). Com base nos ATDs destes dois íons, quando mantemos fixa a intensidade do íon y_6 , verificamos que há uma diminuição, em relação a ela, do íon y_6^* conforme há um aumento do pH. O mesmo estudo foi realizado para os demais peptídeos e diferentes resultados foram obtidos para cada um deles, ou seja, o pH influencia sim a reatividade de cada lisina, para cada peptídeo mas, em cada um deles, o aumento ou diminuição do pH altera de modo particular a reatividade das lisinas.

Foi verificado que a reatividade das lisinas é dependente da sequência dos peptídeos analisados, de modo que não foi possível generalizar a influência do pH na reatividade de lisinas frente ao DSS localizadas em diferentes posições na sequência peptídica.

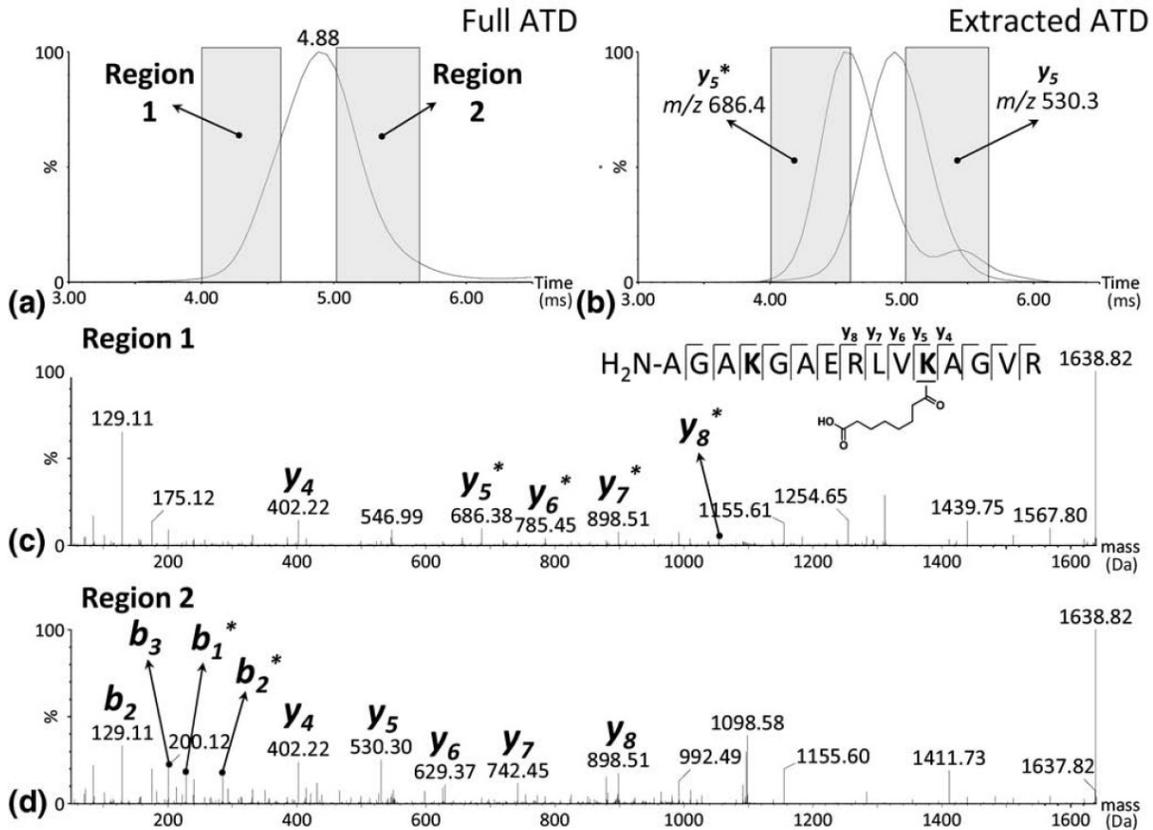


Figura 57. Distribuição por tempo de chegada (ATD) e espectros de íons produtos dos isômeros *dead-end* do peptídeo PX. (A) ATD total, em cinza temos as regiões acumuladas para fornecer os espectros de íons produtos presentes (C) e (D). Em (B) temos os ATDs extraídos dos íons fragmentos y_5 (não modificados, reação com DSS ocorreu no N-terminal ou na primeira lisina) e y_5^* (modificado, indicando que a reação ocorreu na segunda lisina). Em (C) temos o espectro de íons produtos anotado do isômero onde a modificação ocorreu na segunda lisina; e em (D) o espectro de íons produtos anotado dos isômeros onde a modificação ocorreu no N-terminal ou na primeira lisina, de modo que não foi possível observar separação entre esse dois isômeros.

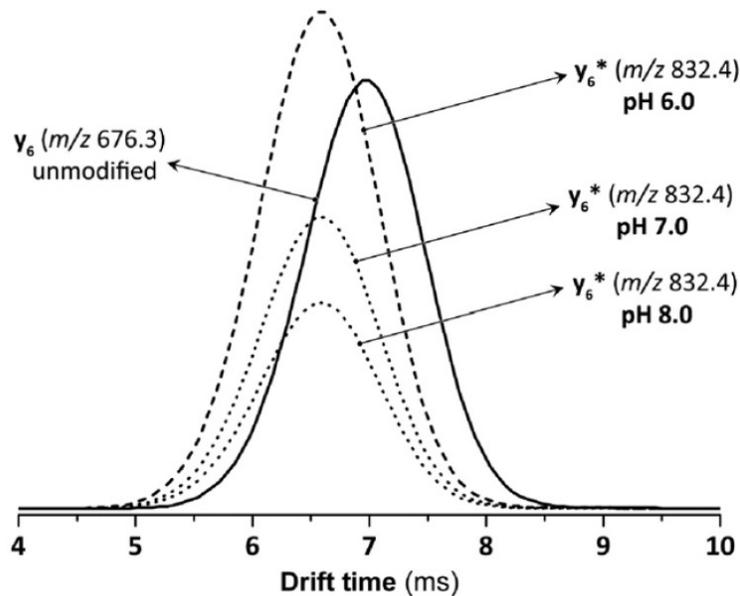


Figura 58. ATDs referentes às correntes iônicas dos íons y_6 , proveniente do isômero onde a modificação ocorreu na primeira lisina e y_6^* , onde a modificação ocorreu na segunda lisina, nas três condições (três diferentes pHs). Com base nos ATDs destes dois íons, quando mantemos fixa a intensidade do íon y_6 , verificamos que há uma diminuição, em relação a ela, do íon y_6^* conforme há um aumento do pH.

O trabalho referente ao estudo de mobilidade iônica de espécies do tipo *dead-end* presente em experimentos de ligação cruzada de proteínas foi publicado no periódico *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*¹⁴⁴.

4.4.2. Uso de Mobilidade Iônica para Separação Entre Peptídeos Modificados por ALCs e Peptídeos Lineares

Como relatado na introdução, esta parte do trabalho foi realizada na Universidade de Edimburgo, Escócia, sob orientação dos profs. Juri Rappsilber, que possui ampla experiência na área de ligação cruzada de proteínas e espectrometria de massas e Perdita Barran, que têm a espectrometria de mobilidade iônica como foco principal de seu grupo de pesquisa.

O foco principal foi verificar a possibilidade de separação entre peptídeos modificados por ALCs e peptídeos lineares, através do uso de mobilidade iônica. A primeira parte desta etapa foi realizada com dois peptídeos modelos, de modo que as diferentes espécies modificadas por ALC fossem obtidas, utilizando um instrumento construído pelo grupo de pesquisa da Profa. Barran, dotado de uma cela de mobilidade convencional (similar a presente na Figura 10) antes do quadrupolo de um instrumento do tipo Q-Tof. Uma descrição detalhada deste equipamento é feita na referência 123. Posteriormente, realizamos experimentos envolvendo misturas mais complexas, composta por diversos peptídeos modificados e não modificados; esta última etapa foi realizada pela empresa Waters Co., em Manchester, Inglaterra, devido a colaboração entre esse grupo e o laboratório da Profa. Perdita Barran.

Tendo como base os peptídeos LR16 e TR20 as espécies lineares, *dead-end* (mono e dihidrolisadas), intramolecular e intermolecular (apenas para LR16) foram obtidas e analisadas por IMMS. A Figura representa a abordagem utilizada para obtenção das espécies de interesse (o ALC BS3 possui a mesma cadeia espaçadora do DSS).

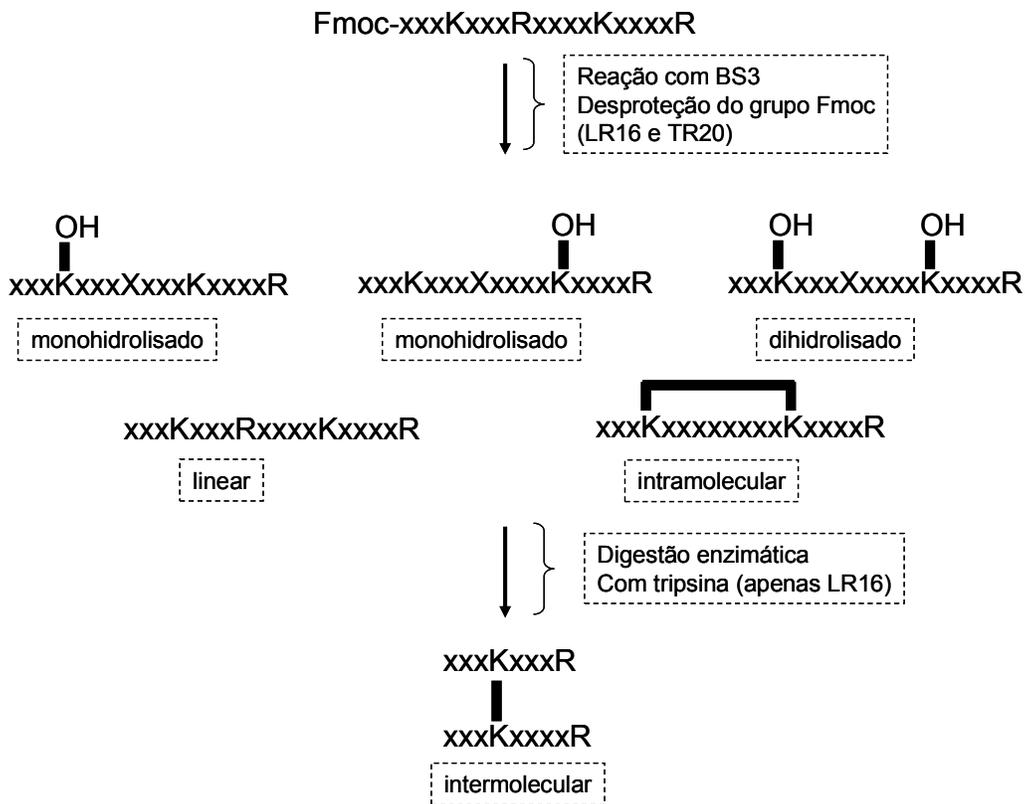


Figura 59. Obtenção de espécies modificadas e lineares para os peptídeos LR16 e TR20. O ALC BS3 possui a mesma cadeia espaçadora do DSS.

A seção de choque de cada espécie, para todos os estados de carga observados, foi calculada com base na equação de mobilidade utilizando os parâmetros experimentais empregados (temperatura em 300 K) e He como gás (pressão em 3,2 torr).

$$\Omega = \frac{3q}{6N} \left(\frac{2\pi}{k_b T} \right)^{1/2} \left(\frac{m+M}{mM} \right)^{1/2} \frac{1}{K}$$

e

$$K = \frac{d}{t_d E}$$

Todos os estados de carga observados para as espécies de ambos os peptídeos foram levadas em consideração. Para o peptídeo TR20, observamos

todas as espécies com duas e três cargas: linear (m/z 1077 e 719, com duas e três cargas); monohidrolisado (m/z 1155 e 770, com duas e três cargas); dihidrolisado (m/z 1233 e 823, com duas e três cargas) e intramolecular (m/z 1146 e 764, com duas e três cargas). Para o peptídeo LR16 todas as espécies foram observadas com duas, três e quatro cargas: linear (m/z 928, 619 e 464, com duas, três e quatro cargas); monohidrolisado (m/z 1007, 671 e 504, com duas, três e quatro cargas), dihidrolisado (m/z 1085, 724 e 543, com duas, três e quatro cargas), intramolecular (m/z 998, 666 e 499, com duas, três e quatro cargas) e intermolecular (m/z 1007, 671 e 504, com duas, três e quatro cargas). Para todas as espécies, foram realizados experimentos em triplicata. Os resultados das seções de choque (CCS) obtidos para todas as espécies geradas a partir do peptídeo TR20 estão na Tabela 2 e para o peptídeo LR16 na Tabela 3, em Å².

Tabela 2. Seção de choque para as espécies modificadas por BS3 do peptídeo TR20 (em Å²).

	Linear		Monohidrol.		Dihidrol.		Intra	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
2	408	9,5	429	4,6	432	9,0	449	3,0
3	479	8,7	453	15,4	511	9,7	509	4,9

Tabela 3. Seção de choque para as espécies modificadas por BS3 do peptídeo LR16 (em Å²).

	Linear		Monohidrol.		Dihidrol.		Intra		Inter	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
2	392	16,2	406	1,5	412	1	419	7	419	1
3	396	8,2	409	17,9	415	12,1	452	17,3	397	6,4
4	461	4,4	457	1,5	483	0,6	491	10,7	495	5,5

Com base nos dados das tabelas 1 e 2 foram construídos os gráficos da Figura 59A e B, respectivamente.

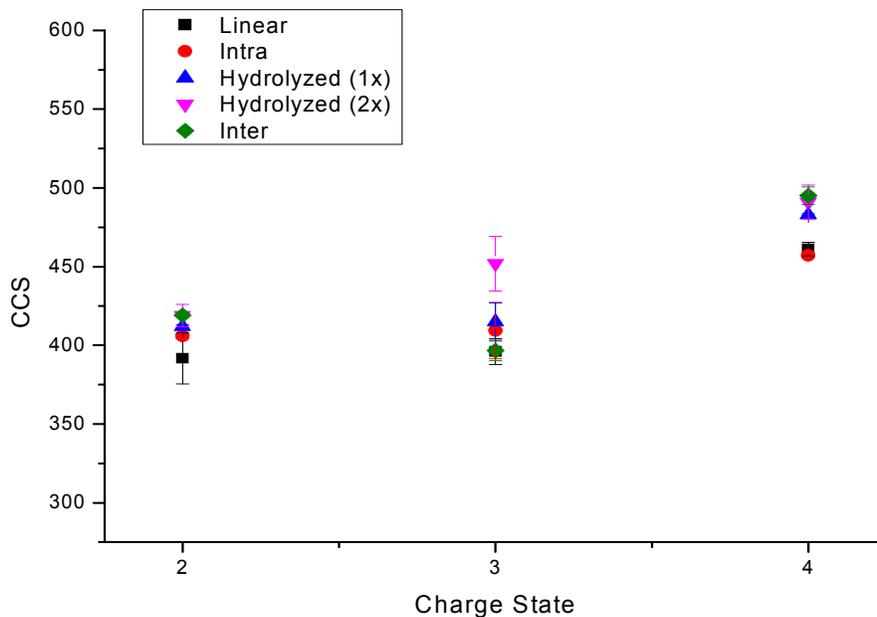
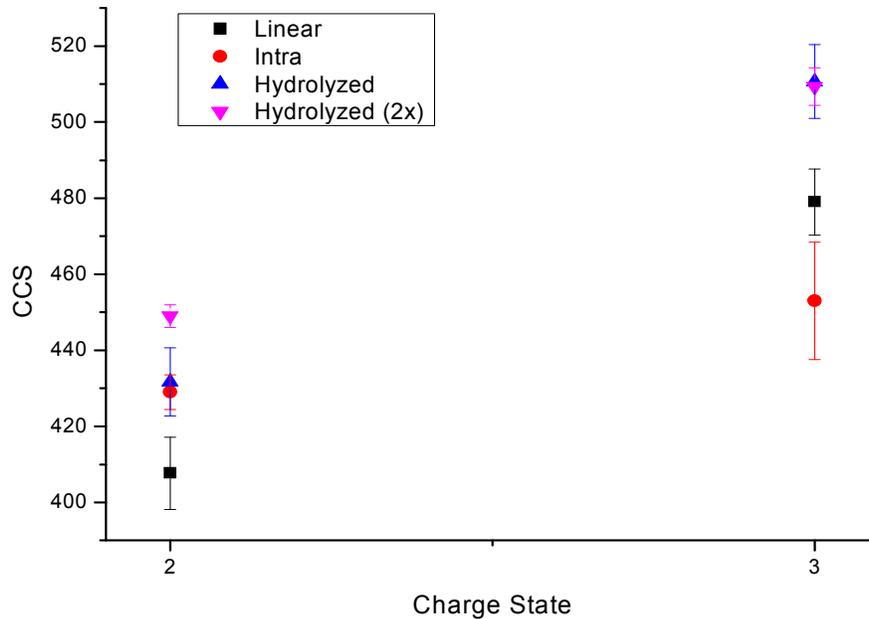


Figura 60. Gráficos de seções de choque (CCS) obtidas para cada um dos estados de carga das espécies provenientes dos peptídeos TR20 (A) e LR16 (B). As espécies estão atribuídas por diferentes cores em cada gráfico.

Com base nos dados mostrados nas tabelas e gráficos acima, para os peptídeos TR20 e LR16, diferentes espécies, com mesmo estado de carga, apresentam seções de choque semelhantes. Desse modo, para um mesmo estado de carga, e ao contrário do que se esperava, parece não ser possível separar, com base nas seções de choque, as diferentes espécies modificadas

po ALC de peptídeos lineares. No entanto, analisando os dados obtidos e a equação de mobilidade, o estado de carga influencia a seção de choque. Desse modo, podemos utilizar o estado de carga para diferenciar peptídeos contendo ALC, em especial as espécies intermoleculares, de peptídeos lineares. Devemos lembrar agora que as espécies intermoleculares devem apresentar pelo menos quatro sítios básicos: dois N-terminais e dois resíduos básicos no C-terminal (quando utilizado tripsina como enzima); já peptídeos lineares convencionais, devem apresentar apenas dois sítios básicos (um N-terminal e um C-terminal). Vale salientar aqui que as espécies lineares analisadas para esses peptídeos não se tratam de peptídeos convencionais, comumente encontrados em experimentos de ligação cruzada, uma vez que possuem sítios de clivagem na sequência (deveriam ter sido clivados pela tripsina). Além disso, as espécies intermoleculares são as de maior interesse em experimentos de ligação cruzada, uma vez que fornecem informação estrutural de peptídeos que podem estar distantes na sequência primária de uma proteína, mas próximos na estrutura terciária ou ainda, podem ser provenientes de duas proteínas diferentes.

Como relatado anteriormente e verificado também nas análises por LC-IMMS, realizadas no instrumento Synapt G2, acoplado à cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC), espécies intermoleculares, oriundas de experimentos de ligação cruzada possuem seção de choque similar a espécies lineares (para uma m/z similar e mesmo estado de carga). Desse modo, passamos a utilizar o estado de carga com intuito de enriquecer espécies intermoleculares, que são as de maior interesse em experimentos de ligação cruzada, em amostras complexas. Essa abordagem deve ser de extrema importância em experimentos de ligação cruzada envolvendo proteínas, em especial quando temos complexos protéicos e misturas muito complexas.

Para os experimentos de LC-IMMS três amostras foram consideradas: digesto triptico de *E. coli* (chamada de Ecoli), amostra contendo o produto da reação entre 20 peptídeos, gerando mais de 200 espécies intermoleculares (amostra denominada XL) e, finalmente, a mistura na proporção molar de 5:1 de *E.coli* com a amostra XL (denominado Ecoli:XL). Esta ultima amostra tem como

objetivo simular experimentos reais de ligação cruzada de proteínas; trata-se de uma amostra extremamente complexa e as espécies intermoleculares estão em quantidade muito inferior à maioria dos peptídeos de *E. coli*.

É importante salientar que em um experimento do tipo LC-IMMS temos como resultado um gráfico em quatro dimensões: m/z (proveniente do MS), mobilidade (proveniente do IM), tempo de retenção (proveniente do LC) e intensidade. Para facilitar a visualização dos dados gerados, representamos na Figura 60 apenas a mobilidade iônica VS. m/z das amostras XL (A), Ecoli (B) e Ecoli:XL (C). A coloração verde, amarela e vermelha representa a escala de intensidades dos íons (vermelho mais intenso verde, menos).

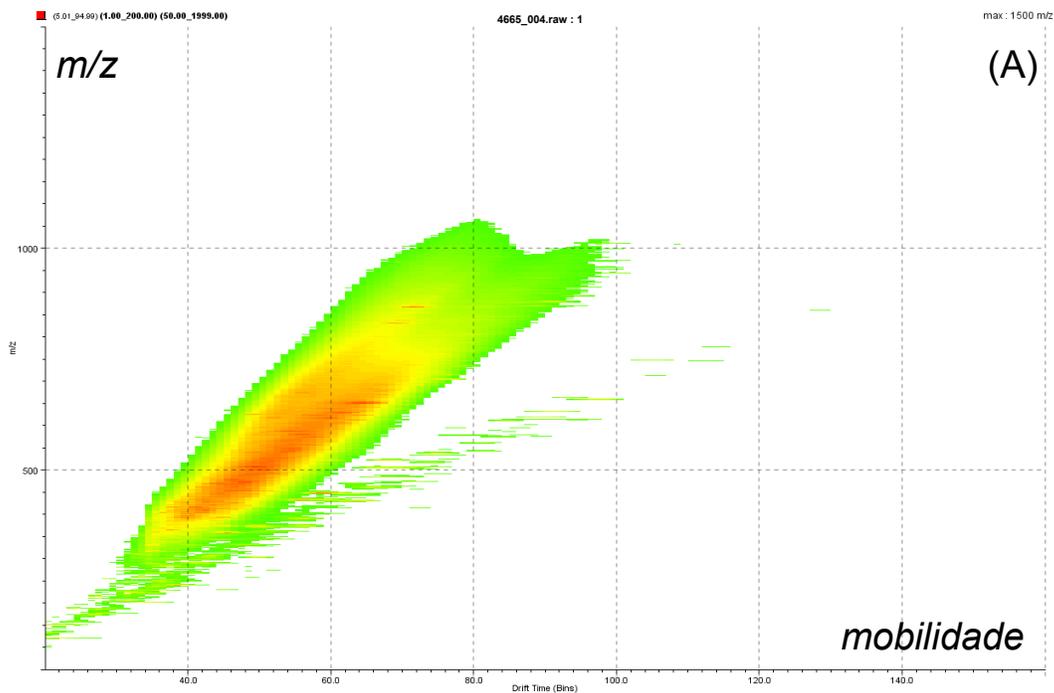


Figura 61. (Continua).

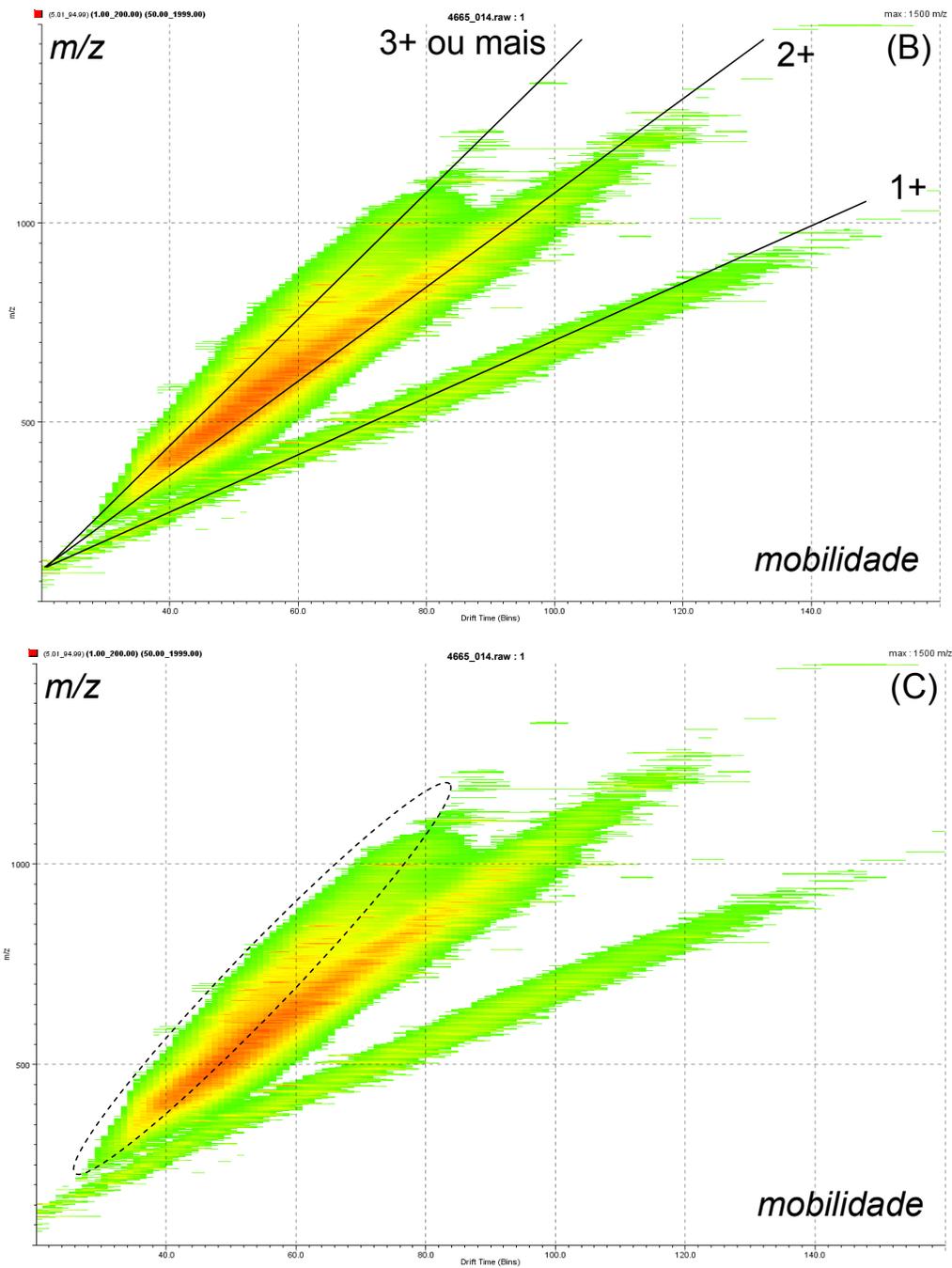


Figura 60. Gráficos de mobilidade iônica VS. m/z das amostras XL, rica em espécies intermoleculares (A), E. coli, digesto triptico de um extrato de *E. coli* (B) e a mistura E. coli:XL (C). Para a amostra E. coli foram adicionados manualmente linhas para ilustrar a presença de nuvens referentes a espécies monocarregadas (1+), dicarregadas (2+) e com três ou mais cargas (3+ ou mais).

Analisando os gráficos da Figura 60 notamos a presença de, pelo menos, três nuvens muito bem definidas (linhas manualmente inseridas na Figura 60B, para ilustração). Quando extraímos os espectros de massas de cada uma dessas nuvens verificamos que, em cada uma delas, íons com estados de carga específicos estão presentes. Como já relatado brevemente, o estado de carga influencia na mobilidade dos íons e, íons com m/z similares, mas em diferentes estados de carga, possuem mobilidades diferentes. Esse fato é facilmente verificado nos gráficos da Figura 60, onde íons com mesmo estados de carga agrupam-se em nuvens. Devemos lembrar agora que, em experimentos de ligação cruzada, temos uma grande maioria de peptídeos lineares que, caso tripsina tenha sido utilizada como enzima para digestão, devem possuir dois sítios de carga; já as espécies intermoleculares, devem possuir quatro. Desse modo, podemos utilizar o estado de carga dos íons para enriquecer o número de peptídeos intermoleculares presentes em amostras provenientes de experimentos de ligação cruzada de proteínas; o instrumento Synapt G2 permite que apenas íons presentes em determinada nuvem sejam selecionados para análises de fragmentação e todos os demais íons não são enxergados pelo instrumento. Desse modo, para a amostra Ecoli:XL podemos fazer com que o instrumento leve em consideração para análise apenas íons em maiores estados de carga (representada por linhas pontilhadas na Figura 60C). Isso faz com que haja uma redução do número de íons em, aproximadamente, 60%, aumentando muito a chance de que espécies intermoleculares sejam selecionadas para experimentos de fragmentação e posterior identificação dessas espécies. Em outras palavras, o uso da mobilidade iônica funciona como um enriquecimento de espécies mais carregadas por cromatografia de troca iônica, com a grande vantagem de que essa separação ocorre dentro do espectrômetro de massas, diminuindo o manuseio e perda de amostra.

É importante salientar que esses resultados foram obtidos em um instrumento comercial e, diferente da maioria dos estudos de mobilidade, onde instrumentos *home made* são empregados, outras pessoas poderão reproduzir e empregar os fatos aqui verificados.

Em relação ao uso de mobilidade iônica em experimentos de ligação cruzada de proteínas duas conclusões foram obtidas:

1. Peptídeos modificados por ALC e peptídeos lineares, com m/z similares e mesmo estados de carga possuem mobilidade iônica (seção de choque) similares, e não podem ser separados.

2. No entanto, com o uso do Synapt G2 e experimentos de LC-IMMS podemos utilizar o estado de carga para enriquecer amostras provenientes de experimentos de ligação cruzada. Devemos lembrar que espécies intermoleculares, as de maior interesse, possuem um mínimo de quatro sítios de protonação e devem aparecer em elevados estados de carga.

Os resultados obtidos neste estágio no exterior foram apresentados no congresso “Analytical Research Fórum 2010”, da Sociedade Real de Química, que ocorreu na Universidade de Loughborough, em Loughborough, Reino Unido, no período de 26 a 28 de julho de 2010 com o título de “Ion mobility mass spectrometry of crosslinked peptides”. Além disso, um manuscrito referente ao trabalho está sendo redigido em conjunto com os professores Rappsilber e Barran.

5. CONCLUSÕES

Os estudos detalhados de fragmentação de peptídeos contendo agentes de ligação cruzada (ALC), tanto das espécies intra quanto intermoleculares, utilizando dissociação induzida por colisão (CID), dissociação multifotônica por infravermelho (IRMPD) ou dissociação por captura de elétrons (ECD), permitiram o estabelecimento de um padrão de fragmentação que auxiliou na interpretação de seus espectros de fragmentação. O conhecimento adquirido permite posterior aplicação deste padrão de dissociação em sistemas reais, envolvendo proteínas e complexos protéicos.

Experimentos de varredura de íon precursor (PIS), tendo como alvo os íons diagnósticos observados nesse estudo, permitem uma identificação sensível e seletiva de espécies modificadas por ALCs. Esse procedimento passou a ser empregado de modo rotineiro em análises provenientes de experimentos de ligação cruzada realizados em nosso laboratório, o que demonstra a grande importância deste estudo.

As técnicas modernas de dissociação, como IRMPD e ECD, apresentam grandes vantagens para o estudo de espécies de alta massa e múltiplas cargas, dois fatores presentes em espécies intermoleculares que, de modo geral, são as que geram maior número de informação em experimentos de ligação cruzada.

Experimentos de mobilidade iônica permitiram a obtenção de informações adicionais sobre a estrutura dos peptídeos e, em casos pontuais, foi capaz de separar isômeros.

Embora peptídeos modificados por ALC e peptídeos lineares apresentaram seções de choque próximas, foi possível utilizar o estado de carga para o enriquecimento de espécies intermoleculares, que aparecem em estados de carga elevado.

De modo geral, o uso combinado de todas essas técnicas deve trazer grandes benefícios aos experimentos de ligação cruzada acoplada a espectrometria de massas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Nelson D. L.; Cox M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition. Cambridge, W. H. Freeman, **2004**.
- ² Pauling, L.; Corey, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 282–285, **1951**.
- ³ Linderstrøm-Lang, K.; Schellman, J. A. *Protein structure and enzymatic activity*. The Enzymes, 2nd ed., 443–510, Academic Press, New York, **1959**.
- ⁴ Sali, A.; Glaeser, R.; Earnest, T.; Baumeister, W. *Nature*, 422, 216-225, **2003**.
- ⁵ Alber, F.; Föster, F.; Korkin, D.; Topf, M.; Sali, A. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 443-477, **2008**.
- ⁶ Puglise, J. D. *Nature*, 450, 1171-1172, **2007**.
- ⁷ Montelione, G. T.; Zheng, D.; Huang, Y. J.; Gunsalus K. C.; Szyperski, T. *Nature Structural Biology*, 7, 982–985, **2000**.
- ⁸ Acharya, K. R.; Lloyd, M. D. *Trends Pharmacol. Sci.*, 26, 10–14, **2005**.
- ⁹ Yamashita M.; Fenn J. B. *J. Phys. Chem.*, 84, 4451-4459, **1984**.
- ¹⁰ Karas M.; Bachmann D.; Bahr U.; Hillenkamp F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 78, 53-68, **1987**.
- ¹¹ Fenn J. B.; Mann M.; Meng C. K.; Wong S. F.; Whitehouse C. F. *Science*, 246, 64-71, **1989**.
- ¹² Kinter M.; Sherman N. E. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, New York, John Wiley & Sons, **2000**.
- ¹³ Benesch J. L. P.; Ruotolo B. T.; Simmons D. A.; Robinson C. V. *Chem. Rev.* 107, 3544-356, **2007**.
- ¹⁴ Loo J. A. *Mass Spectrom. Rev.* 16, 1-23, **1997**.
- ¹⁵ Heck A. J. R.; van den Heuvel R. H. H. *Mass. Spectrom. Rev.* 23, 368-389, **2004**.
- ¹⁶ Ganem B.; Li Y. T.; Henion J. D. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 7818-7819, **1991**.
- ¹⁷ Heuvel R. H. H.; Duijn E.; Mazon H.; Synowsky S. A.; Lorenzen K.; Versluis C.; Brouns S. J. J.; Langridge D.; Oost J.; Hoyes J.; Heck A. J. R. *Anal. Chem.* 78, 7473-7483, **2006**.
- ¹⁸ Lorenzen K.; Olia A. S.; Uetrecht C.; Cingolani G.; Heck A. J. R. *J. Mol. Biol.*, 379, 385-396, **2008**.
- ¹⁹ Uetrecht C.; Versluis C.; Watts N. R.; Roos W. H.; Wuite G. J. L.; Wingfield P. T.; Stevens A. C.; Heck A. J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 9216-9220, **2008**.
- ²⁰ Rose R. J.; Verger D.; Daviter T.; Remaut H.; Paci E.; Waksman G.; Ashcroft A. E.; Radford S. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 12873-12878, **2008**.
- ²¹ Mazon H.; Gábor K.; Leys D.; Heck A. J. R.; Oost J.; Heuvel R. H. H. *J. Biol. Chem.*, 282, 11281-11290, **2007**.
- ²² Pinske M. W. H.; Maier C. S.; Kim J. I.; Oh B. H.; Heck A. J. R. *J. Mass Spectrom.*, 38, 315-320, **2003**.
- ²³ Duijn E.; Bakkes P. J.; Heeren R. M. A.; Heuvel R. H. H.; Heerikhuizen H.; Vies S. M.; Heck A. J. R. *Nature Meth.* 2, 371-376, **2005**.

- ²⁴ Zhang Z.; Zheng Y.; Mazon H.; Milgron E.; Kitagawa N.; Trier E. K.; Heck A. J. R.; Kane P. M.; Wilkens S. *J. Biol. Chem.*, **283**, 35983-35995, **2008**.
- ²⁵ Synowsky S. A.; Heuvel R. H. H.; Mohammed S.; Pijnappel W. W. M. P.; Heck A. J. R. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 1581-1592, **2006**.
- ²⁶ Hoofnagle A. N.; Resing K. A.; Ahn N. G. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 1-25, **2003**.
- ²⁷ Yan X.; Watson J.; Ho P. S.; Deinzer M. L. *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 10-23, **2004**.
- ²⁸ Busenlehner L. S.; Armstrong R. N. *Arch. Biochemistry Biophys.*, **433**, 34-46, **2005**.
- ²⁹ McLafferty F. W.; Guan Z.; Haupts U.; Wood T. D.; Kelleher N. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4732-4740, **1998**.
- ³⁰ Carulla N.; Caddy G. L.; Hall D. R.; Zurdo J.; Gairí M.; Feliz M.; Giralt E.; Robinson C. V.; Dobson C. M. *Nature*, **436**, 554-558, **2005**.
- ³¹ Wang F.; Li W.; Emmett M. R.; Hendrickson C. L.; Marshal A. G.; Zhang Y. L.; Wu L.; Zhang Z. Y. *Biochemistry*, **37**, 15289-15299, **1998**.
- ³² Eyles S. J.; Speir J. P.; Kruppa G. H.; Gierasch L. M.; Kaltashov I. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 495-500, **2000**.
- ³³ Mandell J. G.; Falick A. M.; Komives E. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14705-14710, **1998**.
- ³⁴ Guan, J.Q.; Chance, M.R. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine (Meyers, R.A., ed.)* 549–568, Wiley-VCH, **2004**.
- ³⁵ Takamoto, K.; Chance, M. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine (Myers, R.A., ed)* 569–578, Wiley-VCH, **2004**.
- ³⁶ Garrison W. M. *Chem. Rev.* **87**, 381-398, **1987**.
- ³⁷ Kamal J. K. A.; Chance M. R., *Protein Sci.* **17**, 79-94, **2008**.
- ³⁸ Zheng X.; Wintrode P. L.; Chance M. R, *Structure* **16**, 38-51, **2008**.
- ³⁹ Maleknia S. D.; Downard K. M., *Eur. J. Biochem.* **268**, 5578-5588, **2001**.
- ⁴⁰ Chance M. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 614-621, **2001**.
- ⁴¹ Wong, S. S. *Chemistry of Protein Conjugation And Cross-Linking*. CRC Press, Florida, United States, **1993**.
- ⁴² Steen H.; Jensen O. N. *Mass Spectrom. Rev.* **21**, 163-182, **2002**.
- ⁴³ Sinz, A. *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 663–682, **2006**.
- ⁴⁴ Staros J. V. *Biochemistry*, **21**, 3950-3955, **1982**.
- ⁴⁵ Young M. M.; Tang N.; Hempel J. C.; Oshiro C. M.; Taylor E. W.; Kuntz I. D.; Gibson B. W.; Dollinger G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5802-5806, **2000**.
- ⁴⁶ Hung B. X.; Kim H. Y.; Dass C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 1237-1247, **2004**.
- ⁴⁷ Dihazi G. H.; Sinz A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2005-2014, **2003**.
- ⁴⁸ Lee Y. J.; Lackner L. L.; Nunnari J. M.; Phinney B. S. *J. Proteome Res.* **6**, 3908-3917, **2007**.
- ⁴⁹ 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. *EMBO J.* **29**, 717–726, **2010**.

- ⁵⁰ Rappsilber J.; Siniossoglou S.; Hurt E. C.; Mann M. *Anal. Chem.* **72**, 267-275, **2000**.
- ⁵¹ El-Shafey A.; Tolic N.; Young M. M.; Sale K.; Smith R. D.; Kery V. *Protein Sci.* **15**, 429-440, **2006**.
- ⁵² Kitatsuji C.; Kurogochi M.; Nishimura S. I.; Ishimori K.; Wakasugi K. *J. Mol. Biol.*, **368**, 150-160, **2007**.
- ⁵³ Carven G. J.; Stern L. J. *Biochemistry* **44**, 13625-13637, **2005**.
- ⁵⁴ Bhat S.; Sorci-Thomas M. G.; Alexander E. T.; Samuel M. P.; Thomas M. J. *J. Biol. Chem.* **280**, 33015-33025, **2005**.
- ⁵⁵ Huang B. X.; Kim H. Y. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1045-1053, **2006**.
- ⁵⁶ Gertz M.; Seelert H.; Dencher N. A.; Poetsch A. *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 566-574, **2007**.
- ⁵⁷ Suchanek M.; Radzikowska A.; Thiele C. *Nat. Methods* **2**, 261-268, **2005**.
- ⁵⁸ Taverner T.; Hall N. E.; O'Hair R. A. J.; Simpson R. J. *J. Biol. Chem.* **277**, 46487-46492, **2002**.
- ⁵⁹ Chang Z.; Kuchar J.; Hausinger R. P. *J. Biol. Chem.* **279**, 15305-15313, **2004**.
- ⁶⁰ Back J. W.; Sanz M. A.; Jong L.; Koning L. J.; Nijtmans L. G. J.; Koster C. G.; Grivell L. A.; Spek H.; Muijsers A. O. *Protein Sci.* **11**, 2471-2478, **2002**.
- ⁶¹ Maiolica A.; Cittaro D.; Borsotti D.; Sennels L.; Ciferri C.; Tarricone C.; Musacchio A.; Rappsilber J. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 2200-2211, **2007**.
- ⁶² Ahrman E.; Lambert W.; Aquilina J. A.; Robinson C. V.; Emanuelsson C. S. *Protein Sci.* **16**, 1464-1478, **2007**.
- ⁶³ Azim-Zadeh O.; Hillebrecht A.; Linne U.; Marahiel M. A.; Klebe G.; Lingelbach K.; Nyalwidhe J. *J. Biol. Chem.* **282**, 21609-21617, **2007**.
- ⁶⁴ Pimenova T.; Nazabal A.; Roschitzki B.; Seebacher J.; Rinner O.; Zenobi R. *J. Mass Spectrom.* **43**, 185-195, **2008**.
- ⁶⁵ Gabant G.; Augier J.; Armengaud J. *J. Mass Spectrom.* **43**, 360-370, **2008**.
- ⁶⁶ Baker D. L.; Seyfried N. T.; Li H.; Orlando R.; Terns R. M.; Terns M. P. *Biochemistry* **47**, 1500-1510, **2008**.
- ⁶⁷ Singh, P.; Panchaud, A.; Goodlett, D. R. *Anal. Chem.* **82**, 2636-2642, **2010**.
- ⁶⁸ Sinz, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 660-662, **2007**.
- ⁶⁹ Collins, C. J.; Schilling, B.; Young, M. M.; Dollinger, G.; Guy, R. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 4023-4026, **2003**.
- ⁷⁰ Schmidt, A.; Kalkhof, S.; Ihling, C.; Cooper, D. M. F.; Sinz, A. *Eur. J. Mass Spectrom.* **11**, 525-534, **2005**.
- ⁷¹ Alley, S. C.; Ishmael, F. T.; Jones, A. D.; Benkovic, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6126-6127, **2000**.
- ⁷² Trester-Zedlitz, M.; Kamada, K.; Burley, S. K.; Fenyö, D.; Chait, B.T.; Muir, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2416-2425, **2003**.
- ⁷³ 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. *Prot. Sci.* **11**, 2471-2478, **2002**.
- ⁷⁴ , J. J.; Young, M. M.; Takemoto, L. J. *Molecul. Vision.* **10**, 857-866, **2004**.
- ⁷⁵ Tang, X.; Munske, G. R.; Siems, W. F.; Bruce, J. E. *Anal. Chem.* **77**, 311-318, **2005**.

- ⁷⁶ Chen, X.; Chen, Y. H.; Anderson, V. E. *Anal. Biochem.* **273**, 192–203, **1999**.
- ⁷⁷ Taverner, T.; Hall, N. E.; O'Hair, R. A. J.; Simpson, R. J. *J. Biol. Chem.* **277**, 46487–46492, **2002**.
- ⁷⁸ Back, J. W.; Notenboom, V.; de Koning, L. J.; Muijsers, A. O.; Sixma, T. K.; de Koster, C. G.; de Jong, L. *Anal. Chem.* **74**, 4417–4422, **2002**.
- ⁷⁹ Schnölzer, M.; Jedrzejewski, P.; Lehmann, W. D. *Electrophoresis*, **17**, 945–953, **1996**.
- ⁸⁰ Huang, B. X.; Kim, H. Y.; Dass, C. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1237–1247, **2004**.
- ⁸¹ Tabb, D. L.; Smith, L. L.; Brechi, L. A.; Vysocki, V. H.; Lin, D.; Yates, J. R.; *Anal. Chem.*, **75**, 1155–1153, **2003**.
- ⁸² Schlosser A.; Wolf, D.L. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1382–1390, **2000**.
- ⁸³ Polce, M.J.; Ren, D.; Wesdemiotis, C. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1391–1398, **2000**.
- ⁸⁴ Dongre, A. R.; Jones, J. L.; Somogyi, A.; Wysocki, V. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 8365–8374, **1996**.
- ⁸⁵ Mann, M.; Meng, C. K.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **61**, 1702–1708, **1989**.
- ⁸⁶ Roepstorff, P.; Fohlman, J. *J. Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601–602, **1984**.
- ⁸⁷ Petrotchenko, E. V.; Olkhovik, V. K.; Borchers, C. H. *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1167–1179, **2005**.
- ⁸⁸ Pearson, K. M.; Pannell, L. K.; Fales, H. M. *Rapid. Comm. Mass Spectrom.* **16**, 149–159, **2002**.
- ⁸⁹ Jacobsen, R. B.; Sale, K. L.; Ayson, M. J.; Novak, P.; Hong, J.; Lane, P.; Wood, N. L.; Kruppa, G. H.; Young, M. M.; Schoeniger, J. S. *Protein Sci.*, **15**, 1303–1317, **2006**.
- ⁹⁰ Chu, F.; Maynard, J. C.; Chiosis, G.; Nicchitta, C. V.; Burlingame, A. L. *Protein Sci.*, **15**, 1260–1269, **2006**.
- ⁹¹ Schilling, B.; Row, R. H.; Gibson, B. W.; Guo, X.; Young, M. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 834–850, **2003**.
- ⁹² Woodin, R. L.; Bomse, D. S.; Beauchamp, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3248–3250, **1978**.
- ⁹³ Little, D. P.; Speir, J. P.; Senko, M. W.; O'Connor, P. B.; McLafferty, F. W. *Anal. Chem.* **66**, 2809–2815, **1994**.
- ⁹⁴ Laskin, J.; Futrell, J. H. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 135–167, **2005**.
- ⁹⁵ McLuckey, S. A.; Goeringer, D. E. *J. Mass Spectrom.* **32**, 461–474, **1997**.
- ⁹⁶ Peiris, D. M.; Riveros, J. M.; Eyler, J. R. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **159**, 169–183, **1996**.
- ⁹⁷ Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Griffey, R. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 945–951, **2001**.
- ⁹⁸ Bomse, D. S.; Berman, D. W.; Beauchamp, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3967–3971, **1981**.
- ⁹⁹ Baykut, G.; Watson, C. H.; Weller, R. R.; Eyler, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 8036–8042, **1985**.

- ¹⁰⁰ Li, L. J.; Masselon, C. D.; Anderson, G. A.; Pasa-Tolic, L.; Lee, S.W.; Shen, Y. F.; Zhao, R.; Lipton, M. S.; Conrads, T. P.; Tolic, N.; Smith, R. D. *Anal. Chem.* **73**, 3312–3322, **2001**.
- ¹⁰¹ Null, A. P.; Muddiman, D. C.; *J. Mass Spectrom.* **36**, 589–606, **2001**.
- ¹⁰² McLafferty, F. W. *Acc. Chem. Res.* **27**, 379–386, **1994**.
- ¹⁰³ McLafferty, F. W.; Guan, Z. Q.; Haupts, U.; Wood, T. D.; Kelleher, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4732–4740, **1998**.
- ¹⁰⁴ Novak, P.; Haskins, W. E.; Ayson, M. J.; Jacobsen, R. B.; Shoeniger, J. S.; Leavell, M. D.; Young, M. M.; Kruppa, G. H. *Anal. Chem.* **77**, 5101–5106, **2005**.
- ¹⁰⁵ Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3265–3266, **1998**.
- ¹⁰⁶ Kelleher, N. L.; Lin, H. Y.; Valaskovic, G. A.; Aaserud, D. J.; Fridriksson, E. K.; McLafferty, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 806–812, **1999**.
- ¹⁰⁷ McLafferty, F. W.; Fridriksson, E. K.; Horn, D. M.; Lewis, M. A.; Zubarev, R. A. *Science* **284**, 1289–1290, **1999**.
- ¹⁰⁸ Bakhtiar, R.; Guan, Z. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1047–1059, **2006**.
- ¹⁰⁹ Turecek, F.; McLafferty, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 2525–2528, **1984**.
- ¹¹⁰ Horn, D. M.; Ge, Y.; McLafferty, F. W. *Anal. Chem.* **72**, 4778–4784, **2000**.
- ¹¹¹ Guan, Z.; Yates, N. A.; Bakhtiar, R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 605–613, **2003**.
- ¹¹² Coon, J. J.; Ueberheide, B.; Syka, J. E. P.; Dryhurst, D. D.; Ausio, J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 9463–9468, **2005**.
- ¹¹³ Syka, J. E. P.; Coon, J. J.; Schroeder, M. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 9528–9533, **2004**.
- ¹¹⁴ Cohen, M. J.; Karasek, F. W. *J. Chromatogr. Science* **8**, 330–337, **1970**.
- ¹¹⁵ Karasek, F. W.; Kim, S. H.; Hill, H. H. *Anal. Chem.* **48**, 1133–1137, **1976**.
- ¹¹⁶ Karasek, F. W. *Anal. Chem.*, **46**, 710A–720A, **1974**.
- ¹¹⁷ Eiceman, G. A. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **22**, 17–36, **1991**.
- ¹¹⁸ McDaniel, E. W.; Martin, D. W.; Barnes, W. S. *Rev. Sc. Instr.*, **33**, 2–7, **1962**.
- ¹¹⁹ Giles, K.; Pringle, S. D.; Worthington, K. R.; Little, D.; Wildgoose, J. L.; Bateman, R. H. *Rapid Comm. Mass Spec.* **18**, 24012414, **2004**.
- ¹²⁰ Thalassinos, K.; Slade, SE; Jennings, KR; Scrivens, JH; Giles, K; Wildgoose, J; Hoyes, J.; Bateman, R. H.; Bowers, M. T.; *Int. J. Mass Spec.* **236**, 55–63, **2004**.
- ¹²¹ 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.; *Int. J. Mass Spec.* **261**, 1–12, **2007**.
- ¹²² Rappsilber, J; Ishihama, Y; Mann, M; *Anal. Chem.* **75**, 663–670, **2003**.
- ¹²³ McCullough, B. C.; Kalapothakis, J.; Eastwood, H.; Kemper, P.; MacMillan, D.; Taylor, K.; Dorin, J.; Barran, P. E. *Anal. Chem.* **80**, 6336–6344, **2008**.
- ¹²⁴ Gaucher S. P.; Hadi M. Z.; Young M. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 395–405, **2006**.
- ¹²⁵ Seebacher, J.; Mallick, P.; Zhang, N.; Eddes, J. S.; Aebersold, R.; Gelb, M. H. *J. Proteome Res.* **5**, 2270–2282, **2006**.
- ¹²⁶ Iglesias, A. H.; Santos, L. F. A.; Gozzo, F. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 557–566, **2009**.

-
- ¹²⁷ Huddleston M. J.; Annan R. S.; Bean M. F.; Carr S. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 710-717, **1993**.
- ¹²⁸ Neubauer G.; Mann M. *Anal. Chem.* **71**, 235-242, **1999**.
- ¹²⁹ Williamson B. L.; Marchese J.; Morrice N. A. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 337-346, **2006**.
- ¹³⁰ Bolgar M. S.; Gaskell S. J. *Anal. Chem.*, **68**, 2325-2330, **1996**.
- ¹³¹ Carr S. A.; Huddleston M. J.; Bean M. F. *Protein Sci.*, **2**, 183-196, **1993**.
- ¹³² Huddleston M. J.; Bean M. F.; Carr S. A. *Anal. Chem.*, **65**, 877-884, **1993**.
- ¹³³ Haynes P. A.; Aebersold R. *Anal. Chem.*, **72**, 5402-5410, **2000**.
- ¹³⁴ Bateman R. H.; Carruthers R.; Hoyes J. B.; Jones C.; Langridge J. I.; Millar A.; Vissers J. P. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 792-803, **2002**.
- ¹³⁵ Steen H.; Kuster B.; Fernandez M.; Pandey A.; Mann M. *Anal. Chem.* **73**, 1440-1448, **2001**.
- ¹³⁶ Paradela A.; Albar J. P. *J. Proteome Res.* **7**, 1809-1818, **2008**.
- ¹³⁷ Rappsilber J.; Friesen W. J.; Paushkin S.; Dreyfuss G.; Mann M. *Anal. Chem.* **75**, 3107-3114, **2003**.
- ¹³⁸ Frolov A.; Hoffmann P.; Hoffmann R. *J. Mass Spectrom.* **41**, 1459-1469, **2006**.
- ¹³⁹ Rinner O.; Seebacher J.; Walzthoeni T.; Mueller L.; Beck M.; Schmidt A.; Mueller M.; Aebersold R. *Nature Meth.* **5**, 315-318, **2008**.
- ¹⁴⁰ Iglesias, A. H.; Santos, L. F. A.; Gozzo, F. C. *Anal. Chem.* **82**, 909-916, **2010**.
- ¹⁴¹ Zubarev, R. A.; Horn, D. M.; Fridriksson, E. K.; Kelleher, N. L.; Kruger, N. A.; Lewis, M. A.; Carpenter, B. K.; McLafferty F. W. *Anal. Chem.* **72**, 563-568, **2000**.
- ¹⁴² Polfer, N. C.; Haselmann, K. F.; Zubarev, R. A.; Langridge-Smith, P. R. R. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **16**, 936-944, **2002**.
- ¹⁴³ Santos, L. F. A.; Eberlin, M. N.; Gozzo, F. C. *J. Mass Spectrom.* Aceito para publicação, **2011**.
- ¹⁴⁴ Santos, L. F. A.; Iglesias, A. H.; Pilau, E. J.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 2062-2069, **2010**.