



ESTRATÉGIAS DE ENRIQUECIMENTO DE PEPTÍDEOS COM LIGAÇÃO CRUZADA PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

Palavras-Chave: Cross-linking, Enriquecimento, Interação proteína-proteína

Autores(as):

Renan Moretti, IQ – UNICAMP

Guilherme Reis-de-Oliveira (co-autor), IB – UNICAMP

Ms. Giovanna Lopes de Araujo (co-autora), IQ - UNICAMP

Prof. Dr. Fabio Cesar Gozzo (orientador), IQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As proteínas têm importante participação em diversos processos biológicos realizados por uma célula, portanto, identificar e entender como funcionam as interações proteína-proteína (PPI) é de grande importância, visto que diversas doenças são causadas por anomalias nas redes de interação entre proteínas^[1,2,3].

Uma das principais ferramentas utilizadas na elucidação estrutural e mapeamento de PPI's é a técnica de ligação cruzada (*cross-linking*, XL) acoplada a espectrometria de massas (XLMS)^[3-6]. Essa técnica se baseia na reação de complexos proteicos com um agente de ligação cruzada (ALC), uma molécula que contém dois sítios reativos capazes de conectar covalentemente resíduos de aminoácidos que estejam suficientemente próximos. Após a reação de *cross-linking*, temos a digestão das proteínas, seguido da cromatografia por troca iônica dos peptídeos e posterior análise das amostras por LC-MS, com os dados sendo tratados computacionalmente por softwares específicos.

A fim de reduzir certas limitações apresentadas pela técnica de XLMS, diversos tipos de ALC tem sido desenvolvidos^[3,6,7], por exemplo: 1) ALCs cliváveis, que facilitam a análise computacional através da clivagem dos peptídeos ligados em duas entidades lineares; 2) ALCs fotoativáveis, que melhoram a cobertura dos sítios de PPI, da reação inespecífica com os aminoácidos; 3) ALCs com defeito de massa, que facilita a análise computacional através da marcação com defeito de massa nos peptídeos reagidos; e 4) ALCs com grupo de afinidade, para enriquecimento de peptídeos modificados.

Em relação ao enriquecimento dos peptídeos em ligação cruzada, uma possibilidade está na presença de um grupo alcino no ALC, de forma que o mesmo possa realizar uma reação *click chemistry* com um grupo azida ligado a uma resina de biotina com uma ligação dissulfeto, para a posterior redução e liberação dos peptídeos^[8]. Alternativamente, o ALC também pode conter em sua estrutura um grupo fosfato ou ácido fosfônico, que permite os peptídeos reagidos formar complexo com o Fe³⁺ presente em colunas IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*). Uma vez que as IMACs já são amplamente utilizadas em plataformas de fosfoproteômica^[9], sua aplicação e implementação se torna mais simples do que quando comparado a outros métodos de ALC com grupo de afinidade.

Dessa forma, a presente pesquisa visa estabelecer uma plataforma de enriquecimento de peptídeos em ligação cruzada por meio da interação de um ALC contendo ácido fosfônico com o Fe^{3+} quelado em uma coluna IMAC. A estrutura do ALC está sendo desenvolvida e sua estrutura genérica pode ser visualizada na figura 1. Assim, essa primeira fase do projeto se concentrou na modificação de uma coluna HisTrap HP e o enriquecimento de uma amostra simples de um fosfonato.

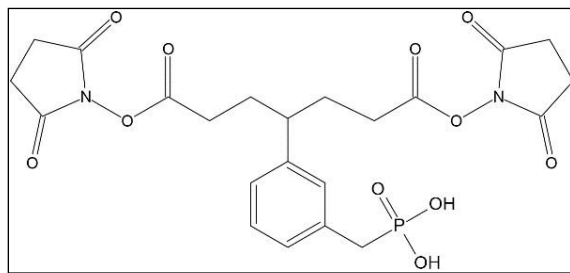


Figura 1. Estrutura genérica do ALC em desenvolvimento.

METODOLOGIA:

• Modificação da coluna IMAC

Inicialmente, foi necessário realizar a troca do metal quelado na coluna HisTrap HP de 5 mL, da GeHealthcare, alterando-a de Ni^{2+} para Fe^{3+} . Para isso, utilizou-se de um sistema de cromatografia líquida (ÄKTA pure), inicialmente passando pela coluna 5 volumes de coluna (CV, *column volumes*) de água Milli-Q, seguido de 10 CV do solvente de *stripping* (50 mM EDTA, 20 mM de NaH_2PO_4 e 500 mM de NaCl; pH = 7,4), 10 CV de ácido fórmico (AF) 20 mM, 10 CV de água, e, por fim, 4 CV de AF 20 mM.

O carregamento de íons Fe^{3+} na coluna foi feito por meio da injeção de 10 CV de solvente charging (25 mM de FeCl_3 ; pH = 2,3), seguido de 12 CV de AF 20 mM, retirando temporariamente a coluna do sistema. As linhas do sistema foram então lavadas com 10 mL de água, 10 mL de solvente stripping e mais 10 mL de água, reconectando a coluna ao final do processo.

• Preparo das amostras

De forma a avaliar a eficácia da coluna recém modificada na interação com um grupo de ácido fosfônico, foi preparada uma solução de 100 $\mu\text{g/mL}$ de benzil fosfonato (representado na Figura 2) diluindo-o em água Milli-Q.

A partir dessa amostra, foi determinado o comprimento de onda de máxima absorção na região do UV-Vis, para então monitorar a eluição do fosfonato durante o enriquecimento feito

pelo AKTA. Para isso, utilizou-se da técnica de PDA (*photo diode-array*) acoplada ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S Micro (Waters Co). Posteriormente, preparou-se uma nova solução de 100 $\mu\text{g/mL}$ de benzil fosfonato diluindo-o em solvente A (30% acetonitrila (v/v), 0.007% (v/v) ácido trifluoroacético, pH = 3,12), para que tal amostra seja injetada no AKTA.

• Injeção das amostras

Inicialmente, o sistema é lavado com 5 CV de solvente A, de forma a equilibrar a coluna. Após o equilíbrio, utilizando de um loop de 1 mL, a amostra é injetada no sistema, e os compostos retidos são lavados com 8 CV de solvente A. Em seguida, inicia-se um gradiente de solvente B (0,5% (v/v) de NH_4OH) de 0 a 45%, num fluxo de 1,5 mL/min por 15 CV, seguido de um aumento linear para 100% de solvente B, durante 3 CV, permanecendo em 100 % de B por mais 10 CV a um fluxo de 2,5 mL/min.

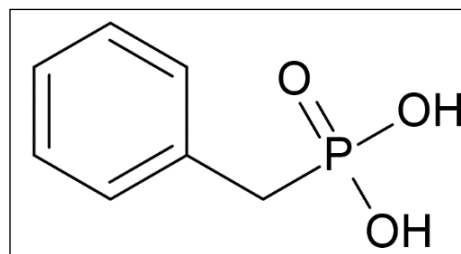


Figura 2. Estrutura do benzil fosfonato.

Após o gradiente, temos o reequilíbrio da coluna com 20 CV de solvente A. Por fim, a coluna é preenchida com etanol 20% e retirada do sistema para armazenamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

- **Troca do íon na resina IMAC**

A princípio, temos um indicador visual de que a substituição de metais foi feita de maneira correta, pois a resina da coluna apresenta uma coloração azul clara quando está carregada com Ni^{2+} , esbranquiçada quando está descarregada, e uma coloração amarelada quando carregada com Fe^{3+} , conforme demonstra a Figura 3. Portanto, é possível confirmar que houve de fato a substituição do Ni^{2+} pelo Fe^{3+} .

- **Absorção UV-Vis do fosfonato**

Conforme mencionado, a determinação da região de absorção do fosfonato foi realizada pela técnica de PDA, obtendo o espectro de absorção apresentado na Figura 4.



Figura 3. Mudança de coloração na resina IMAC. A = Resina com Ni^{2+} ; B = Resina sem íon; C = Resina com Fe^{3+} .

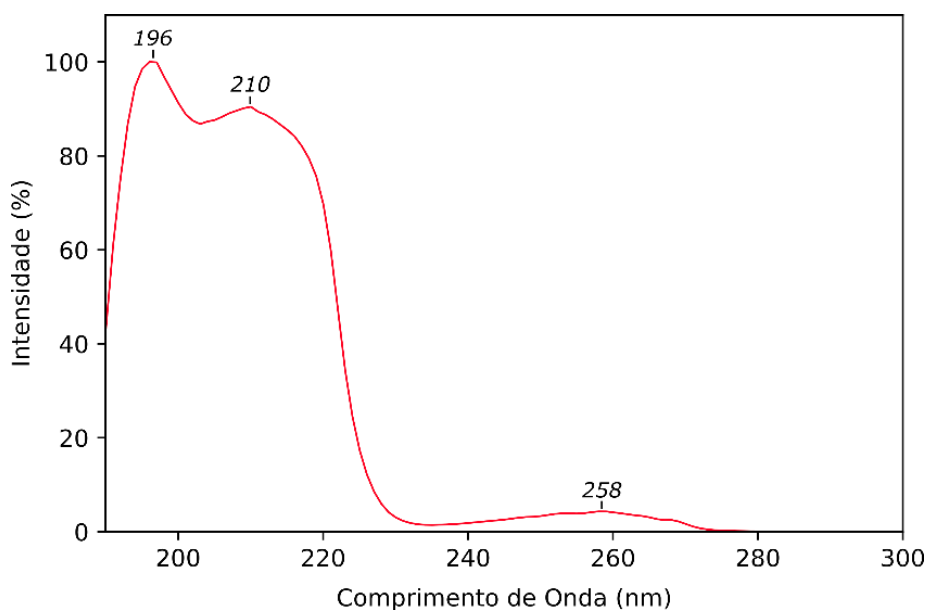


Figura 4. Curva de absorção para o fosfonato.

Podemos notar 3 bandas de absorção, no caso em: 196 nm; 210 nm; e 258 nm. Sabemos que as ligações peptídicas absorvem na região de 214 nm, e diversos outros compostos (incluindo alguns solventes) podem absorver em torno de 198 nm. As bases nucleicas absorvem na região de 254 nm, porém, dado o preparo de amostras para um experimento de cross-linking, a quantidade de DNA e RNA restante na amostra pode ser desprezada, conforme resultados anteriores do nosso grupo. Sendo assim, a região de 258 nm seria a mais promissora no monitoramento seletivo do grupo fosfonato que estará presente no ALC a ser sintetizado, no entanto, sua absorção é muito baixa, sendo cerca de 4% da absorção que o composto apresenta em 210 nm.

- **Enriquecimento de fosfonato**

A análise da solução de fosfonato realizada no AKTA resultou no seguinte cromatograma, apresentado na Figura 5.

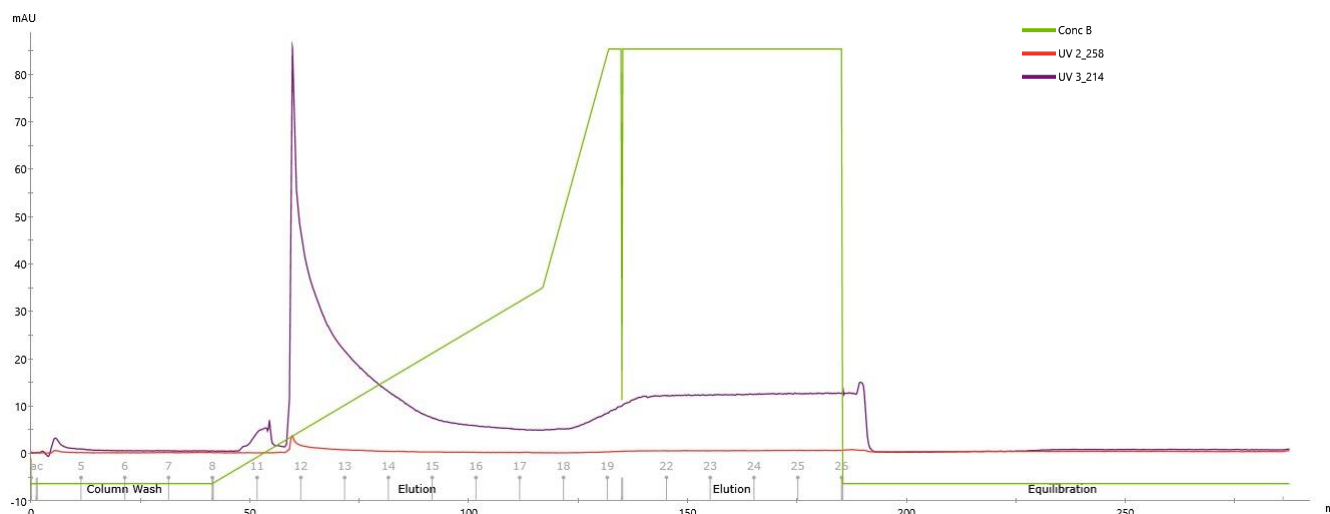


Figura 5. Cromatograma referente a solução de fosfonato. Fonte: Acervo pessoal.

Podemos notar um sinal bastante intenso no UV-Vis em torno de 60 mL. O sinal em 60 mL, apresenta uma alta absorção em 214 nm e uma pequena banda em 258 nm, que corresponde a cerca de 4% da absorção em 214 nm. Uma vez que tal banda representaria a eluição do fosfonato, coletou-se as frações 12, 13 e 14 para injetá-las no espectrômetro de massas Xevo TQ-S Micro.

A análise por espectrometria de massas foi realizada por injeção direta, alterando a ionização em modo positivo e negativo, e filtrando no primeiro quadrupolo as massas cargas (m/z) 171 e 173 para os modos negativo e positivo, respectivamente. Os íons filtrados foram fragmentados na câmara de colisão a uma energia de 15 V, com os fragmentos gerados sofrendo uma varredura no terceiro quadrupolo. Conforme o esperado, a análise no modo positivo detectou o íon de m/z 173, com um fragmento referente ao íon tropílio, e a de modo negativo detectou o íon de m/z 171, porém sem nenhum outro fragmento característico ou de fácil interpretação. Dessa forma, podemos afirmar que a banda que contém as frações 12 a 14 representam a eluição do fosfonato, algo que é coerente também com a intensidade de absorção em cada comprimento de onda, visto que a absorção em 258 nm foi cerca de 4% da absorção em 214 nm.

CONCLUSÕES:

Conforme foi possível demonstrar pelos experimentos realizados, a substituição de Ni^{2+} por Fe^{3+} em uma coluna HisTrap HP se mostrou bastante promissora para realizar o enriquecimento de compostos contendo fosfato ou fosfonato em sua estrutura. Dessa forma o grupo pretende, como perspectiva futura, analisar a eficácia dessa plataforma de enriquecimento com um spike do benzil fosfonato em uma matriz complexa de lisado de *E.Coli*, seguindo para análises com o ALC proposto assim que o mesmo estiver disponível.

BIBLIOGRAFIA

1. Braun, Pascal, and Anne-Claude Gingras. "History of protein–protein interactions: From egg-white to complex networks." *Proteomics* 12.10 (2012): 1478-1498.
2. Rao, V. Srinivasa, et al. "Protein-protein interaction detection: methods and analysis." *International journal of proteomics* 2014 (2014).
3. Yu, Clinton, and Lan Huang. "Cross-linking mass spectrometry (XL-MS): An emerging technology for interactomics and structural biology." *Analytical chemistry* 90.1 (2018): 144.
4. Kao, Athit, et al. "Development of a novel cross-linking strategy for fast and accurate identification of cross-linked peptides of protein complexes." *Molecular & Cellular Proteomics* 10.1 (2011).
5. O'Reilly, Francis J., and Juri Rappsilber. "Cross-linking mass spectrometry: methods and applications in structural, molecular and systems biology." *Nature structural & molecular biology* 25.11 (2018): 1000 1008.
6. Keller, Andrew, Juan D. Chavez, and James E. Bruce. "Increased sensitivity with automated validation of XL-MS cleavable peptide crosslinks." *Bioinformatics* 35.5 (2019): 895-897.
7. Pereira, Michelle BM, et al. "αB-crystallin interacts with and prevents stress-activated proteolysis of focal adhesion kinase by calpain in cardiomyocytes." *Nature Communications* 5.1 (2014): 5159.
8. Stadlmeier, Michael, et al. "A Click-Chemistry-Based Enrichable Crosslinker for Structural and Protein Interaction Analysis by Mass Spectrometry." *ChemBioChem* 21.1-2 (2020): 103-107.
9. Ruprecht, Benjamin, et al. "Comprehensive and reproducible phosphopeptide enrichment using iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) columns." *Molecular & Cellular Proteomics* 14.1 (2015): 205-215.