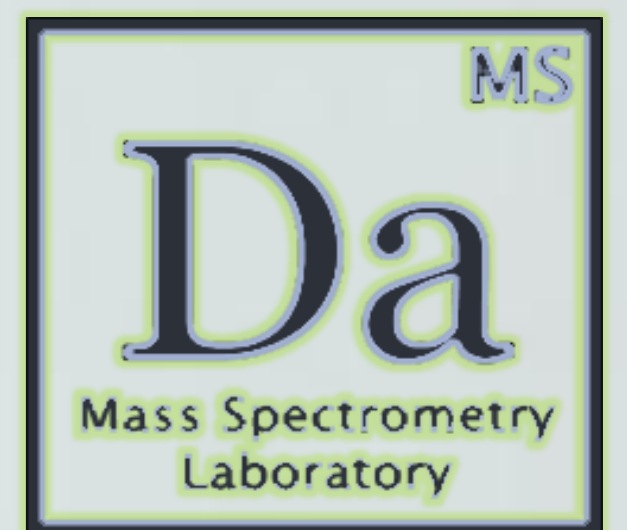


# IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS COM LIGAÇÃO CRUZADA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS



Agência Financiadora:



**Autores:** aluna Lívia Helena Moreira Passos e professor orientador Fábio Cesar Gozzo

**Palavras chaves:** Espectrometria de massas - Proteínas - Peptídeos

## Introdução

As proteínas são polímeros naturais, macromoléculas complexas. Devido a essa complexidade, as proteínas podem desenvolver diversas funções no organismo. Entender essas funções permite a ciência evoluir para o desenvolvimento de novas drogas e terapias para o tratamento de doenças. E para que possa existir o conhecimento estrutural das proteínas, um dos métodos atuais de precisão é a espectrometria de massas (mass spectrometry – MS).

Um dos principais métodos baseados em MS disponíveis para o estudo de proteínas é a ligação cruzada. A ligação cruzada (Cross-link, XL) é uma modificação química na qual as cadeias laterais de dois aminoácidos na superfície da proteína que estejam espacialmente próximos são ligadas através de um agente de ligação cruzada (ALC). Esses compostos reagem com as cadeias laterais dos aminoácidos de acordo com a sua especificidade, geralmente são usados ALC que reagem com os grupos amina de uma proteína, como mostrado na Figura 1.

Para um XL ser encontrado usando o método de MS é necessária, após a reação de XL com um ACL, a digestão da proteína com uma enzima para que entrem peptídeos com e sem modificações (XL) no instrumento de MS. Após essa digestão os peptídeos são injetados no sistema de cromatografia líquida (liquid chromatography – LC) /MS e então são procurados os íons precursores de XL, sendo eles de massa/carga **222, 239, 305**. [1] Essas massas/cargas foram selecionadas a partir do fato que não existem tais razões para peptídeos não modificados, ou seja, sem a presença de ALC.

Muitas proteínas são estudadas por seu comportamento conhecido, afim de se manter um grupo controle com maior precisão. Este é o caso da mioglobina, anidrase carbônica e citocromo C.

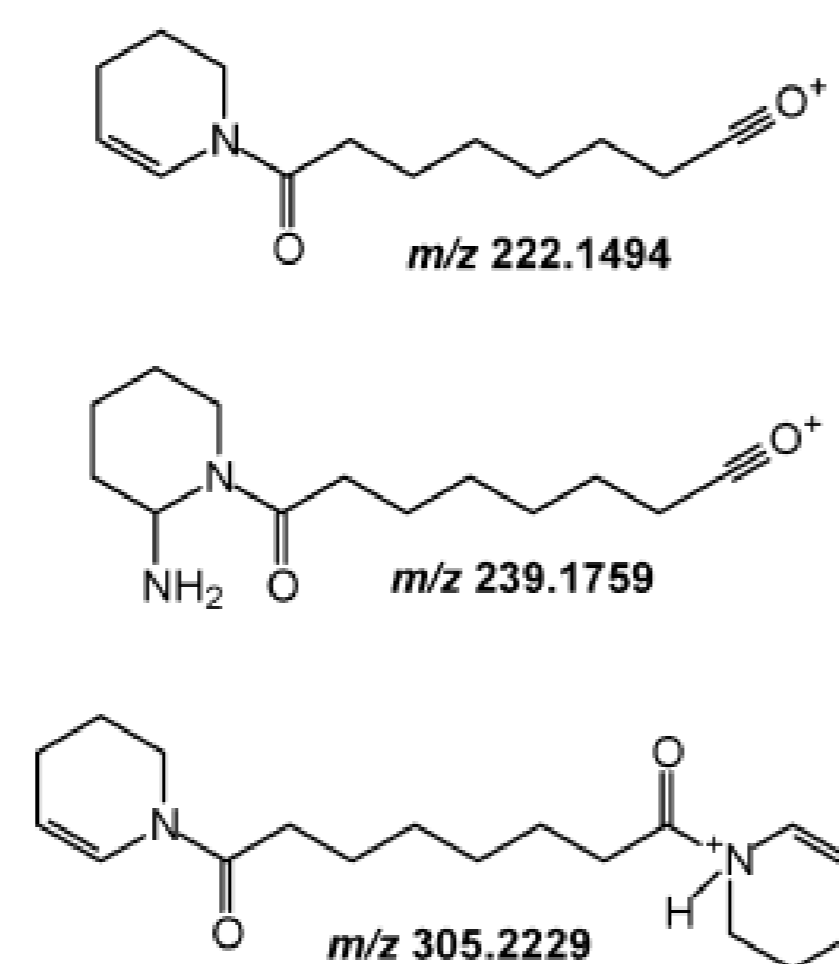
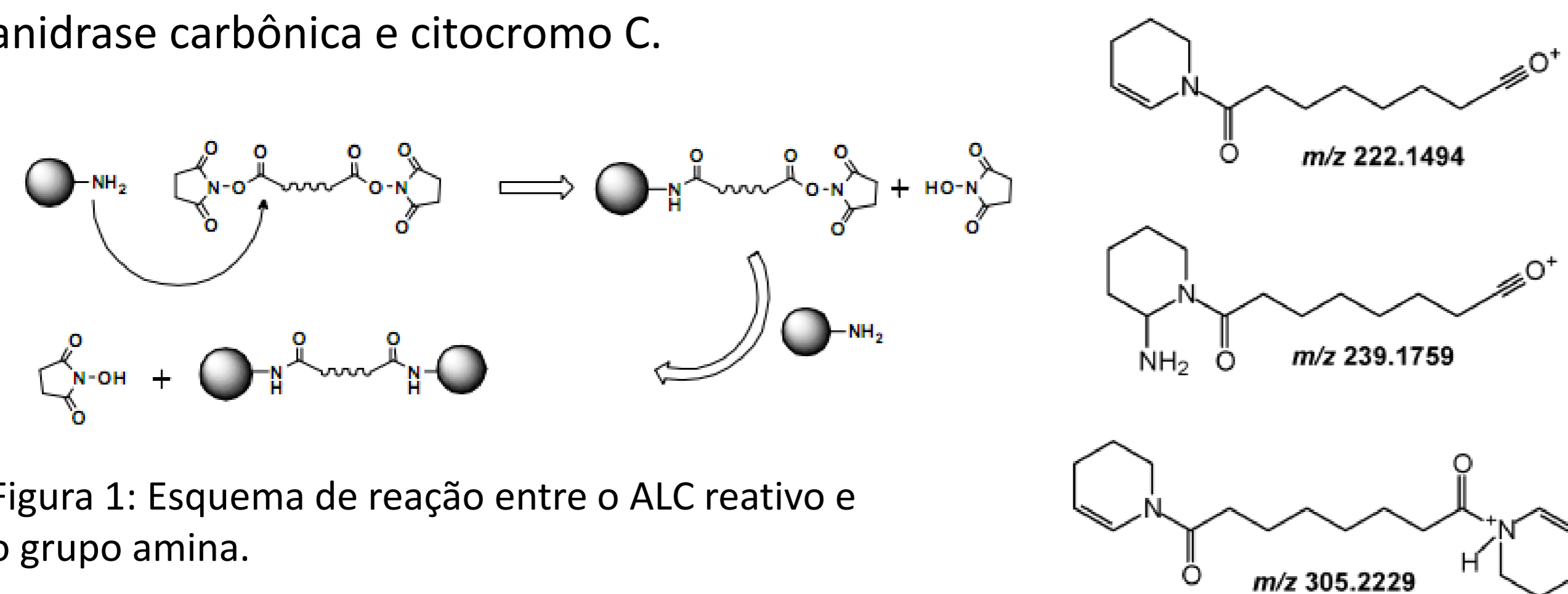
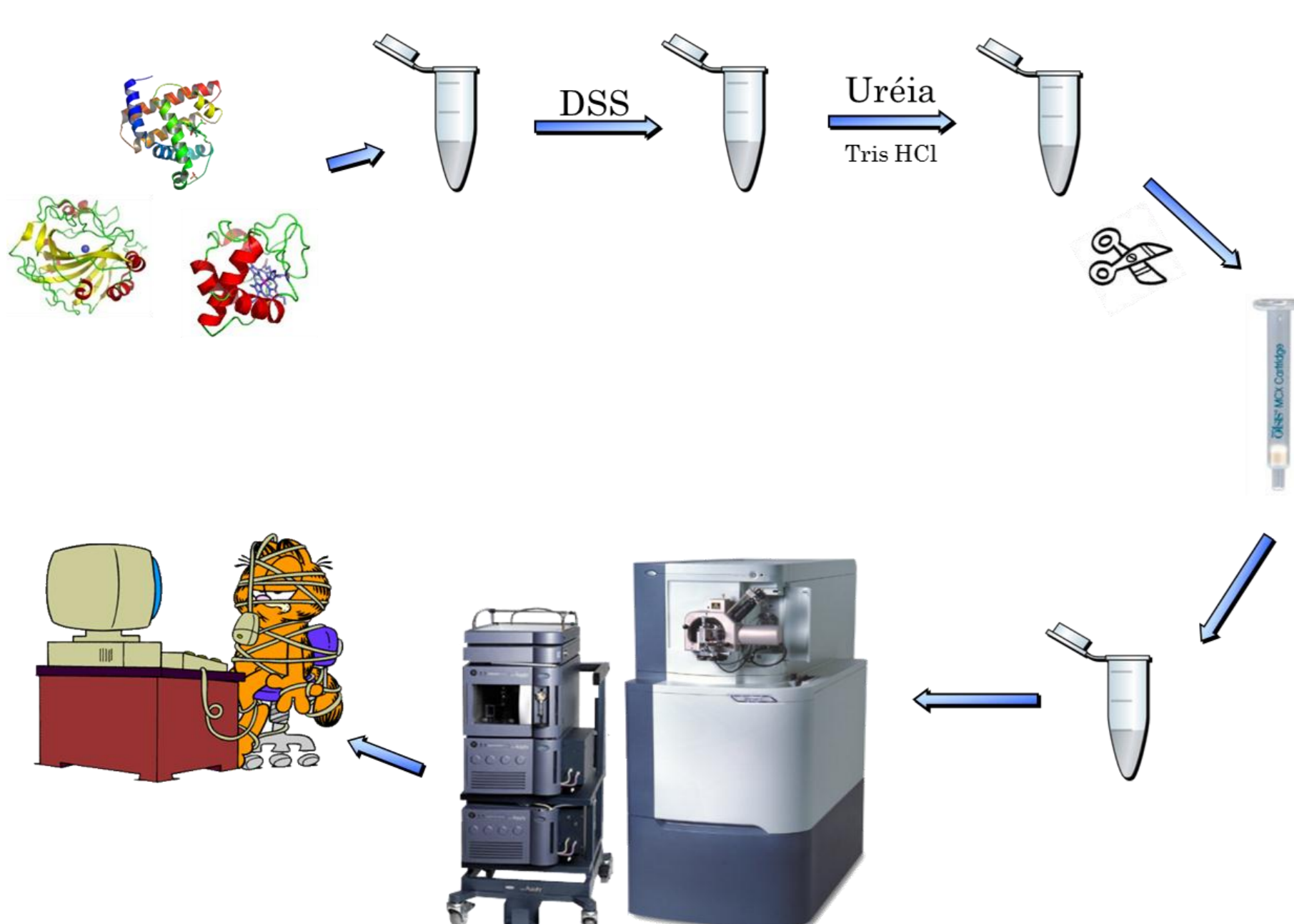


Figura 3: Estruturas da Mioglobina, Anidrase Carbônica e Citocromo C.

## Metodologia e Resultados:



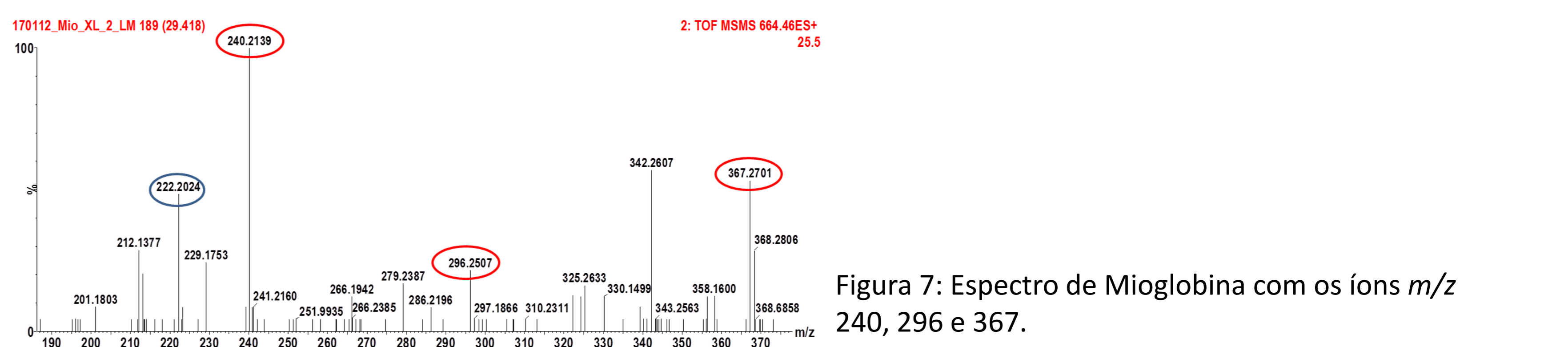
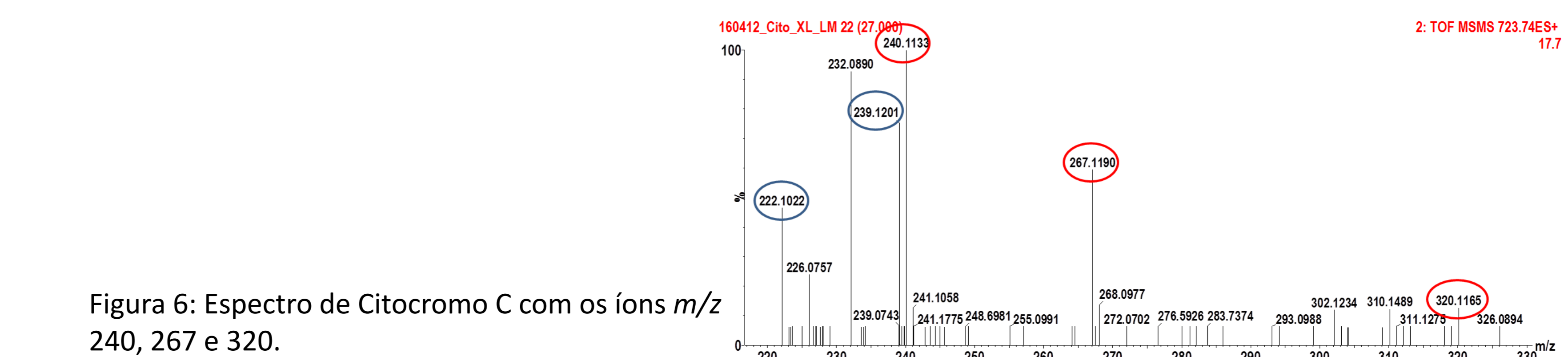
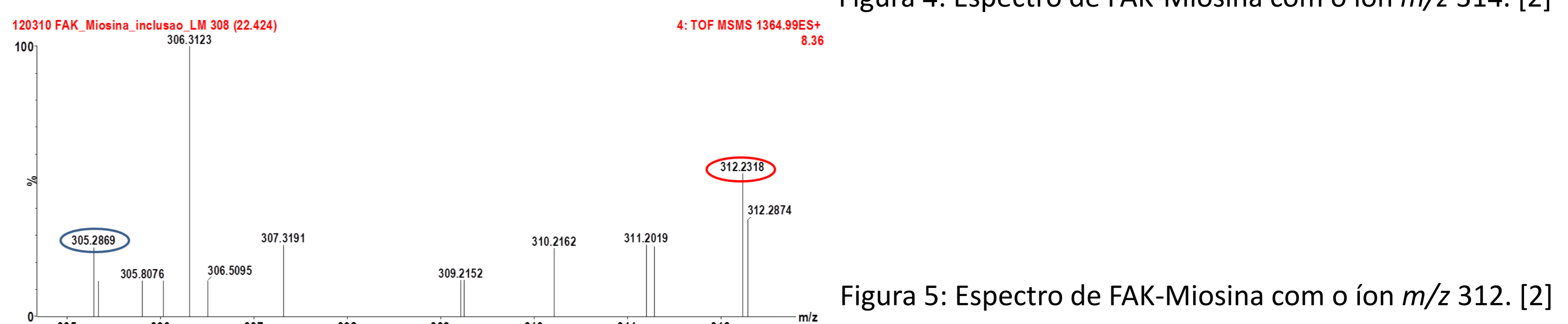
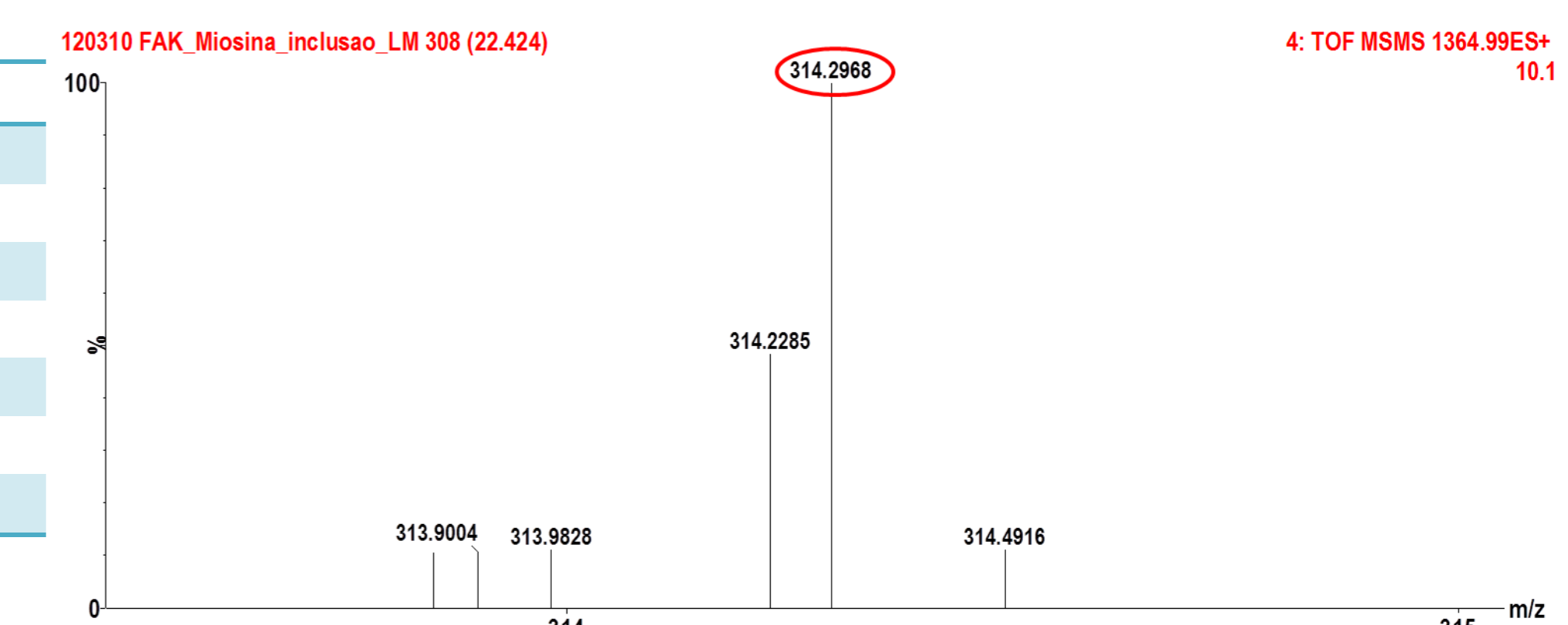
Foram utilizados materiais das três proteínas citadas acima, dados ainda não publicados e também dados já publicados [2] do grupo Dalton.

Para facilitar a digestão, a proteína foi desnaturada em solução de ureia (8M), Tris HCl (50mM, pH 7.6) e DDT (5mM) após ter sido reagida com ACL (DSS em DMF com 50x de excesso molar).

A amostra foi diluída com uma solução de bicarbonato de amônia (50mM) até que a ureia ficasse com uma concentração de 0.5 M. Logo depois a amostra foi digerida com tripsina (em tampão fosfato – 1/20x em massa).

Íons marcadores de XL encontrados	
m/z 240	
m/z 267	
m/z 296	
m/z 312	
m/z 314	
m/z 320	
m/z 367	

Tabela 1: Íons marcadores de XL encontrados.



## Conclusões:

Os dados totais das análises de MS foram utilizados em um software de identificação de proteínas (Mascot, Matrix Science Ltd.) e os valores dos íons b2 procurados no espectro. A partir dessa comparação foi possível concluir que os potenciais íons marcadores encontrados no estudo atual não correspondem a íons b2 e podem assim ser considerados possíveis íons marcadores de ligação cruzada.

Com a anidrase carbônica não foi possível obter espectros razoáveis para o experimento como foi feito com a mioglobina e citocromo. Esse foi um projeto que complementa um artigo [1] a fim de auxiliar o trabalho do grupo do laboratório Dalton (IQ – UNICAMP) na procura de agentes de XL em proteínas.

Finalmente, os íons m/z **240, 267, 296, 312, 314, 320 e 367** foram identificados como marcadores das espécies de XL, permitindo uma maior confiabilidade na atribuição dos espectros dessas espécies.

## Referências:

- [1] Amadeu H. Iglesias, Luiz Fernando A. Santos, and Fábio C. Gozzo, "Identification of Cross-Linked Peptides by High-Resolution Precursor Ion Scan", Analytical Chemistry, Vol. 82, No. 3, February 1, 2010.
- [2] Fioramonte, M., Tese de Mestrado IQ – UNICAMP, 2012.