

CARACTERIZAÇÃO COMPLETA DE LIGAÇÕES CRUZADAS DE DITRIPTOFANOGabriel T. Galdino^{1*}, Janaína N. dos Prazeres² e Ohara Augusto³

1. Estudante de IC do Instituto de Química da USP

2. Doutora Especialista de Laboratório do Instituto de Química da USP

3. Professora Doutora, IQ-USP – Departamento de Bioquímica / Orientadora

Resumo:

Recentemente, identificamos uma nova modificação oxidativa pós-tradução do Trp, as ligações cruzadas ditriptofano (Trp-Trp) formadas pela recombinação de radicais proteína-Trp*. Essas modificações foram primeiro identificadas na enzima superóxido dismutase 1 humana (hSOD1) como consequência do ataque do radical carbonato produzido durante a atividade peroxidásica da enzima. Foi demonstrado que essas ligações cruzadas dispararam a agregação da hSOD1, podendo eventualmente participar do mecanismo patogênico da esclerose lateral amiotrófica. Neste trabalho procuramos caracterizar essas ligações por espectrometria de massas, espectroscopia UV e de fluorescência e ressonância magnética nuclear de três peptídeos dimericos isolados da radiólise de soluções aquosas de VWG. Foram identificadas ligações cruzadas de ditriptofano do tipo C3-C3, C3-C2 e C3-C6.

Palavras-chave: Radiólise, oxidação e radicais livres.

Apoio financeiro: CNPq, FAPESP e IPEN.

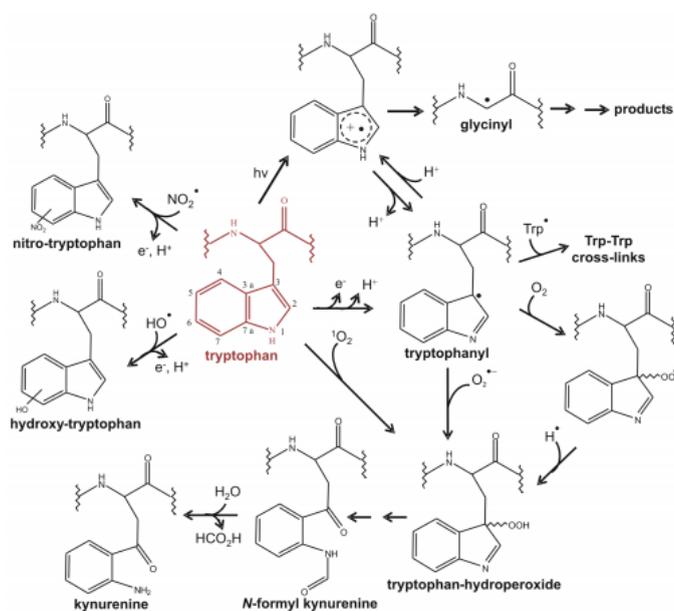
Introdução:

Figura 1. Alguns produtos da oxidação do triptofano

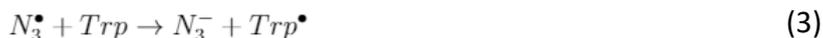
A oxidação de proteínas é uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico. A oxidação da maioria dos resíduos de proteínas não é reparável in vivo e pode afetar a estrutura e a função das proteínas. Em particular, as ligações cruzadas de proteínas decorrentes de modificações oxidativas são presumivelmente tóxicas para as células porque podem se acumular e induzir agregação de proteínas. No entanto, as maiorias dessas ligações cruzadas irreversíveis de proteínas permanecem parcialmente caracterizadas.

A caracterização dos produtos de oxidação de resíduos Trp de proteínas é possui dificultada por duas razões principais. Primeiro, o grupo indol dos resíduos Trp possui múltiplos locais para ataque de oxidantes e radicais, dando origem a muitos produtos oxidados (Figura 1). Em segundo lugar, a frequência do Trp em proteínas é baixa (aproximadamente 1%), comparada com a de outros resíduos aromáticos, como

Tyr (aproximadamente 3-4%). Os produtos de oxidação mais frequentemente caracterizados de resíduos de Trp de proteína tem sido proteína-triptofanila (proteína-Trp*) e produtos outros derivados ligados a proteínas, tais como hidroperóxido de triptofano (Trp-OOH), hidroxi-triptofano (Trp-OH), nitro-triptofano (Trp-NO₂) N-formil-kynurenine e kynurenine (Figura 1).

Até recentemente, as ligações cruzadas de ditriptofano (Trp-Trp), em particular, foram largamente ignoradas na literatura. Nós fomos os primeiros a caracterizar a formação de uma ligação cruzada Trp-Trp na enzima superóxido dismutase 1 humana (hSOD1) durante sua atividade de peroxidásica dependente de bicarbonato (1). Essa e outras publicações nossas foram pouco consideradas até recentemente, quando a mesma ligação foi identificada por outros autores em outras proteínas submetidas a agentes oxidantes (revisado em (2)).

Neste trabalho, sintetizamos peptídeos dimericos contendo ligações cruzadas de ditriptofano por meio da combinação de radicais VWG formados radiólise de soluções aquosas de peptídeos de sequência VWG na presença de NaN₃ e em atmosfera de N₂O (eq. 1-3) para caracterização completa por ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, infrared multiphoton dissociation, espectroscopia UV e de fluorescência.



Metodologia:

Radiólise

Soluções de VWG (0,4 e 0,8 mM) foram preparadas individualmente em tampão fosfato (100 mM), pH 7,0 contendo NaN_3 0,1 M, num volume final de 7,5 mL. Cada solução foi transferida para um frasco de cultura de tecidos com superfície de 25 cm² e deaeradas com N_2O . A irradiação destas amostras foi realizada em um acelerador de elétrons do tipo RDI-DYNAMITRON – modelo JOB 188, de energia 1,499 MeV na dose de 1 kGy (corrente do feixe 1,2 mA; taxa de dose 4,79 kGy/s e velocidade da bandeja igual a 4,8 m/min) localizado no Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares (IPEN).

LC-MS e MS/MS

Os métodos de separação foram primeiro estabelecidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) num equipamento Shimadzu Co. (Japão) acoplado a um espectrômetro ESI-q-ToF (Maxis, Bruker Daltonics) utilizando uma coluna Gemini 5µm C18 110Å 250 x 4,6nm (Phenomenex) com duas fases móveis: uma solução aquosa de ácido trifluor acético (0,1%) (fase A) e outra solução de acetonitrila com ácido trifluor acético (0,1%) (fase B), fluxo de 0,7 mL/min. O método estabelecido consiste em um método isocrático de 170min com 13% da fase B. Os picos correspondentes aos dímeros foram coletados, para análise de espectrofotometria UV, IRMPD e RMN.

Espectrofotometria UV e fluorescência

Todas as análises de espectrofotometria UV foram feitas em um espectrofotômetro UV-2550 (Shimadzu Co.) em uma cubeta com 200µL de solução das alíquotas coletadas que foram concentradas de modo a apresentarem uma mesma absorvância (0,5uA) no comprimento que corresponde ao seu máximo de absorção entre 250-350nm. Essas mesmas amostras foram analisadas em um fluorímetro sendo excitadas no máximo de absorção correspondente.

Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN foram realizados em equipamento Bruker AIII 800 MHz com crioassonda TCI com 4 canais (1H, 13C, 15N e 2H). As soluções dos dímeros foram preparadas para uma concentração aproximada de 1mM em D_2O (pico 2 e 3) ou DMSO deuterado (pico 1) como solvente. O espectro foi calibrado utilizando-se o deslocamento químico do sinal do próton de H_2O em cada solvente. O espectro foi processado usando **TopSpin**® v. 4.0 (Bruker).

Resultados e Discussão:

A Figura 2A mostra o cromatograma LC (280nm) obtido para a amostra de VWG 0,8mM após irradiação.. Foram identificados três picos majoritários enumerados de 1 a 3 correspondentes a dímeros de m/z 719 $[M+H]^+$ e 360 $[M+H]^{2+}$. Os dímeros não apresentam diferenças no padrão de fragmentação por MS/MS e seus fragmentos confirmam a presença da ligação de ditriptofano nos três casos (dados não mostrados).

A estruturas propostas após a elucidação por RMN estão apresentadas na Figura 2C. As ligações cruzadas de ditriptofano identificadas foram do tipo C3-C3 (pico 1), C3-C6 (pico 2) e C3-N1 (pico 3). Tais estruturas são consistentes com cálculos de densidade de spin para o radical triptofanila apresentados por *Walden et al.*, (3) como : C3=0.48, N1=0.23, C4=0.19 e C6=0.15.

Os espectros UV do monômero e dos dímeros são mostrados na Figura 2B. É possível observar que os espectros dos dímeros têm seus máximos deslocados para comprimentos de onda maiores (300nm para pico 1 e 284 nm para os picos 2 e 3) e, também, que há uma perda no rendimento da fluorescência de ~ 12x (dados não mostrados). Tais diferenças condizem com a alteração nas duplas ligações do anel indol nos três casos, sendo que a ligação C3-C2 passa a ser uma ligação simples e a ligação N1-C2 passa a ser uma ligação dupla em pelo menos um dos anéis indol dos dímeros (no caso do pico 1 essa mudança ocorre nos dois anéis, resultando em maior deslocamento). Os espectros aqui apresentados são semelhantes aos reportados por *Sormacheva et al* (4).

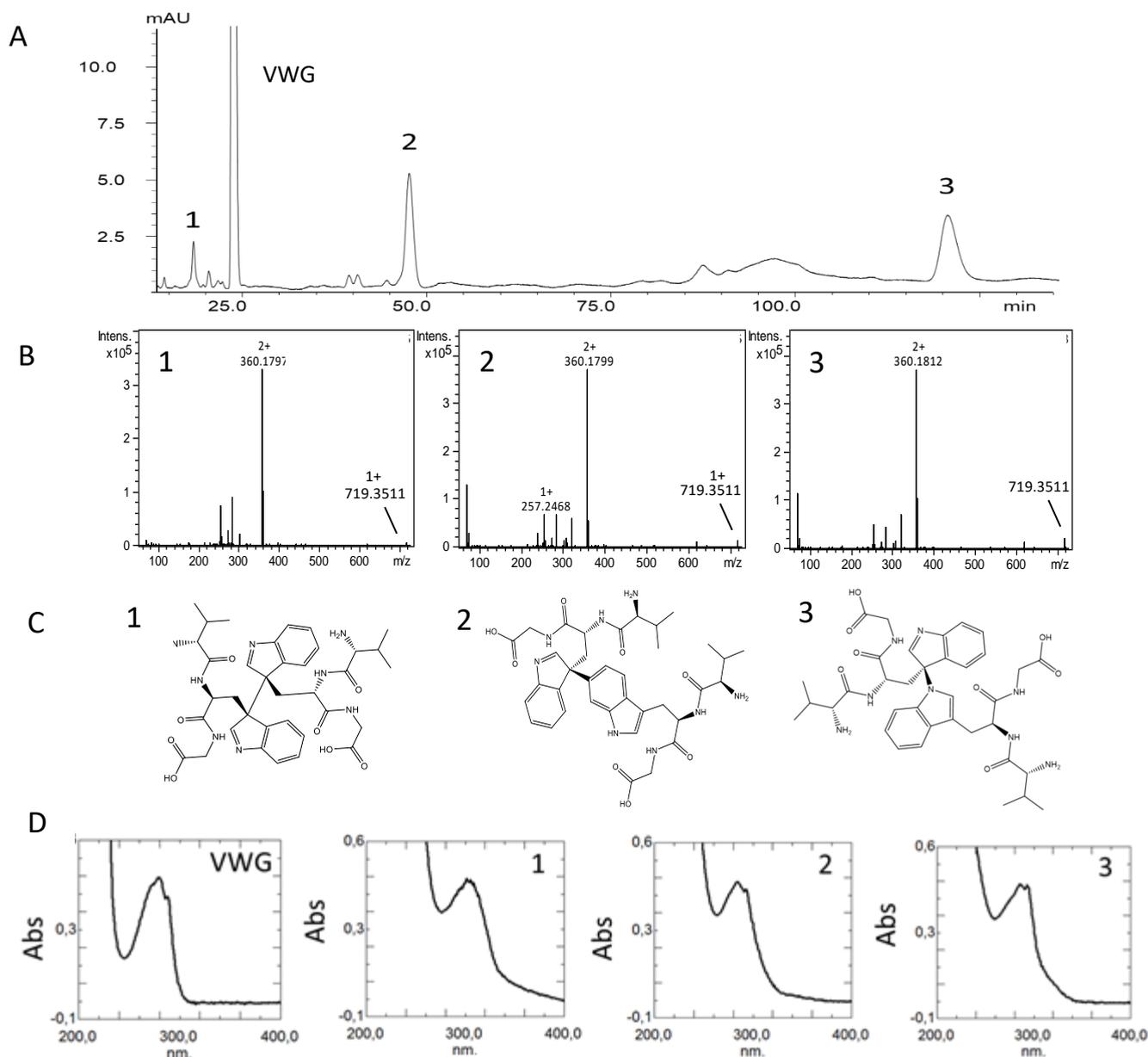


Figura 2. A. LC (280 nm) em coluna Gemini, com volume de injeção de 50 μ L da amostra de VWG 0,4mM e NaN_3 0,1M irradiado com 1 kGy .**B.** Análises MS dos picos de 1-3, identificados como dímeros (VWG)₂ (m/z 719 [$M+H^+$] e m/z 360 [$M+H^+$]²⁺). Não foram identificados produtos secundários de massa diferente do dímero. **C.** Estrutura propostas para os dímeros correspondentes aos picos de 1-3 elucidadas por RMN. **D.** Espectro de absorvância UV do monômero (Abs. máx. 280nm) e dos picos 1 (Abs. máx. 300nm) 2 (Abs. máx. 284nm) e 3 (Abs. máx. 283nm).

Conclusões:

A caracterização completa de três possíveis dímeros de ditriptofano descrita acima é a primeira caracterização desses dímeros formados por reações radiculares no melhor do nosso conhecimento. No momento, procuramos estabelecer se vários dímeros são também formados em proteínas mesmo com os impedimentos conformacionais presentes nessas biomoléculas. Também, falta esclarecer as razões para que o dímero C3-N1 apresente um tempo de retenção menor que o monômero em uma coluna de fase reversa, visto que em sua estrutura há uma perda da ligação N-H em ambos os anéis, o que impossibilita que faça uma das ligações de hidrogênio com a água na região do indol e isso resultaria em um aumento de hidrofobicidade. Tal perda de ligações N-H também ocorre na estrutura do pico 3 que possui um tempo de retenção de cerca de 150min nas mesmas condições e tal tempo condiz com essa justificativa. Cálculos conformacionais e estudos com espectro de infravermelho estão sendo feitos de modo a entender o que leva o dímero C3-N1 ter tal característica.

Referências bibliográficas

2. Paviani, V.; Galdino, G. T.; dos Prazeres J. N.; Queiroz, R.F.; Augusto, O. J. Braz. Chem Soc. 2018. In press; <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170239>;
1. Medinas, D. B.; Gozzo, F. C.; Santos, L. F. A.; Iglesias, A. H.; Augusto, O.; Free Radical Biol. Med. 2010, 49, 1046.
3. Walden, S. E.; Wheeler, R. A.; J. Phys. Chem. 1996, 100, 1530.
4. Sormacheva, E. D.; Sherin, P. S.; Tsentalovich, Y. P.; Free Radical Biol. Med. 2017, 113, 372.