



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

ANDERSON JADER ANTUNES BRIZOLA DOS SANTOS

**Espectrometria de massas combinada a agentes de ligação cruzada para a caracterização estrutural em solução da enzima Enoil-ACP-redutase de *Mycobacterium tuberculosis***

Porto Alegre

2014

ANDERSON JADER ANTUNES BRIZOLA DOS SANTOS

**Espectrometria de massas combinada a agentes de ligação cruzada para a caracterização estrutural em solução da enzima Enoil-ACP-redutase de *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Pablo Machado

Co-orientador:

Prof. Dr. Cristiano V. Bizarro

Porto Alegre

2014

ANDERSON JADER ANTUNES BRIZOLA DOS SANTOS

**Espectrometria de massas combinada a agentes de ligação cruzada para a caracterização estrutural em solução da enzima Enoil-ACP-redutase de *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau - UEM

---

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva - UCS

---

Profa. Dra. Maria Martha Campos - PUCRS

Porto Alegre

2014

Dedico esse trabalho aos meus pais,

José e Iara, a minhas irmãs

Letícia e Walleska, e

a minha avó Edla.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus orientadores prof. Dr. Pablo Machado e prof. Dr. Cristiano V. Bizarro pela oportunidade que me foi dada, pela confiança e apoio nessa pesquisa.

À equipe do centro de pesquisa em biologia funcional.

À CAPES pela bolsa de mestado.

Ao programa de pós-graduação em biologia celular e molecular

Agradeço a minha família por estarem sempre presente nas horas que precisei.

A todos que de alguma forma contribuíram a esse trabalho.

Muito Obrigado a todos!!!

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Mapa mundial representativo dos casos de TB, adaptado de (WHO, 2012).....	13
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do granuloma. No centro, estão localizados os macrófagos contendo o bacilo, e na periferia os linfócitos T Adaptado de PIETERS, 2008.....	14
<b>Figura 3.</b> Mecanismo do sistema FAS II.....	17
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de ativação da isoniazida.....	18
<b>Figura 5.</b> Representação do sistema de <i>electrospray</i> , adaptado de PALMA <i>et al.</i> ,2008.....	19
<b>Figura 6.</b> Estrutura geral de um peptídeo conforme a nomenclatura de Roepstorff-Fohlmann-Biemann, adaptado de PALMA <i>et al.</i> ,2008.....	21
<b>Figura 7.</b> Exemplos de <i>Cross-linkers</i> comerciais.....	23
<b>Figura 8.</b> Estratégia geral para mapeamento da estrutura tridimensional através de peptídeos modificados do tipo 1 (área exposta ao solvente), peptídeos do tipo 2 (determina interações proteína-proteína), adaptado ANTON <i>et al.</i> , 2003.....	25
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas dos peptídeos trípticos do Citocromo C, adaptado de ALANA, 2010.....	26
<b>Figura 10.</b> Classificação dos tipos de produtos da reação com um <i>cross-link</i> , tipo 0 <i>dead end</i> , tipo 1 intramolecular, tipo 2 intermolecular, adaptado de SINZ, 2003.....	27
<b>Figura 11.</b> Espectro de massa médio da Mio-dss.....	50
<b>Figura 12.</b> Espectro deconvoluído da MIO-DSS (1:5), íon de 17089.1 Da é referente a modificação do tipo intermolecular/intramolecular, no íon de 17107.0 Da é referente a modificação do tipo <i>dead-end</i> .....	51
<b>Figura 13.</b> Espectro de massa do íon <i>m/z</i> 815,62 .....	52

<b>Figura 14.</b> Espectro de massa/massa do íon 815 deconvoluído.....	52
<b>Figura 15.</b> Estrutura e relação $m/z$ (massa/carga) dos íons diagnósticos (AMADEU <i>et al.</i> 2010 GOZZO <i>et al.</i> 2009).....	54
<b>Figura 16.</b> Cromatograma dos peptídeos modificados.....	55
<b>Figura 17.</b> Cromatograma da Mioglobina sem DSS usando filtro de massa....	57
<b>Figura 18.</b> Cromatograma da Mio-DSS com banda de isolamento $m/z$ 2.....	58
<b>Figura 19.</b> Cromatograma da Mio-DSS com banda de isolamento $m/z$ 5.....	59
<b>Figura 20.</b> Cromatograma da Mioglobina sem DSS no modo SIM/SRM.....	60
<b>Figura 21.</b> Cromatograma da Mio-DSS no modo SIM/SRM (verde), cromatograma da Mio-DSS com filtro de massa com banda de isolamento $m/z$ de 5 (vermelho), cromatograma da Mio-DSS com filtro de massa com banda de isolamento $m/z$ de 2 (preto).....	61
<b>Figura 22.</b> Íon isolado no modo SIM da Mio-DSS.....	62
<b>Figura 23.</b> Íon de $m/z$ 1298,1945 obtido no modo SIM da proteína InhA.....	63
<b>Figura 24.</b> SDS-PAGE da InhA-DSS.....	64

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Propriedades de grupos mais comuns utilizado em <i>Cross-linking</i> (ANTON <i>et al.</i> 2003).....	23
<b>Tabela 2.</b> Lista de íons precursores e íons fragmentos.....	53
<b>Tabela 3.</b> Lista dos íons diagnósticos da mioglobina-DSS 1:5.....	55
<b>Tabela 4.</b> Lista dos íons diagnósticos da mioglobina-DSS 1:10.....	56
<b>Tabela 5.</b> Lista dos íons diagnósticos da mioglobina-DSS 1:50.....	56
<b>Tabela 6.</b> Lista de peptídeos selecionados da Mioglobina sem DSS.....	57
<b>Tabela 7.</b> Lista de peptídeos modificados da Mio-DSS.....	58
<b>Tabela 8.</b> Lista das transições da Mioglobina sem DSS.....	59
<b>Tabela 9.</b> Lista das transições da Mio-DSS.....	60



## Lista de Abreviaturas e Siglas

**TB**, Tuberculose;

**MTB**, *Mycobacterium tuberculosis*;

**INH**, Isoniazida;

**InhA**, Enoil-ACP-redutase;

**mAGP**, Do inglês *mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex*;

**FAS**, Sistema de síntese de ácidos graxos;

**K**, Lisina;

**M**, Metionina;

**Y**, Tirosina;

**NADH**, Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido;

**KatG**, Catalase peroxidase;

**IQG607**, Pentaciano(isoniazida)ferrato(II);

**RMN**, Ressonância magnética nuclear;

**MS**, Espectrometria de massa;

**ESI**, Ionização por electrospray;

**MALDI**, Ionização e dessorção a laser assistida por matriz;

**SIM/SRM**, Do inglês *selected ion monitoring/ selected reaction monitoring*;

**RF**, Radiofrequência;

**CID**, Dissociação induzida por colisão;

**EDTA**, Ácido etilenodiamino tetra-acético;

**NHS**, *N*-hidroxisuccinimida;

**SDS-PAGE**, Do inglês *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis*;

**DSS**, Disuccinimidil suberato;

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.2 Tuberculose .....	13
1.2 Enoil-ACP-redutase (InhA) .....	16
1.3 Espectrometria de massa .....	18
1.4 Estudos de dinâmica por espectroscopia de massa.....	21
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>30</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>4. MANUSCRITO</b> .....	<b>31</b>
<b>5. OUTROS RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1 Impletamentação da técnica de agentes de ligação cruzada baseada em espectrometria de massa para caracterização estrutural de proteínas, utilizando a Mioglobina como proteína modelo .....	51
5.1.1 Abordagem por <i>top-down</i> .....	51
5.1.2 Abordagem por <i>bottom-up</i> .....	55
5.2 Expressão e Purificação da Enoil-ACP-redutase.....	64
5.3 Caracterização das alterações estruturais da InhA com o uso de agentes de ligação cruzada. ....	64
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>67</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
<b>8. ANEXO</b> .....	<b>73</b>
8.1 Participações em outros trabalhos .....	73

## RESUMO

A tuberculose (TB), doença causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), é considerada um problema global de saúde pública. As infecções causadas pela micobactéria são, em geral, difíceis de tratar devido principalmente ao surgimento de cepas resistentes à maioria dos fármacos disponíveis e à co-infecção com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Nesse contexto, a caracterização de alvos moleculares para a proposição de novas estruturas químicas candidatas a fármacos anti-TB mostra-se de importância sumária. A enzima enoil-ACP-redutase (InhA) de MTB faz parte do sistema FAS II da micobactéria a qual regula o alongamento da cadeia dos ácidos graxos fornecendo os precursores que irão compor a parede celular do bacilo (ácidos micólicos). Como o sistema FAS II não está presente em mamíferos esse fato torna essa enzima um importante alvo macromolecular para o desenvolvimento de novos fármacos com toxicidade seletiva. O desenvolvimento de técnicas analíticas para estudar proteínas em solução utilizando a espectrometria de massas combinada com agentes de ligação cruzada vem possibilitando a caracterização estrutural de proteínas conduzindo a informações sobre suas estruturas primárias, terciárias e quaternárias. No presente trabalho foi implementado a técnica de *cross-linking* combinada a espectrometria de massas para a caracterização em solução da enzima InhA de MTB.

**Palavras-chave:** *cross-linking*, espectrometria de massa, enoil-ACP-redutase.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB), a disease mainly caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), is considered a global public health problem. Infections caused by mycobacteria are generally difficult to treat because of its natural resistance to most antibiotics. This resistance is largely attributed to the formation of the cell wall. The InhA is part of the mycobacterial FAS II system which regulates the elongation of the fatty acid chain, which will compose the cell wall of the bacillus (mycolic acids). As the FAS II system is not present in mammals, this enzyme has been described as an important macromolecular target aiming the development of drugs with selective toxicity. The development of analytical techniques for studying proteins in solution by mass spectrometry combined with cross-linking has permitted access information about the primary, tertiary, and quaternary structure of the proteins. In this work, the technique of cross-linking combined with mass spectrometry was implemented for the characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase (InhA) which catalyzes the final essential enzymatic step in fatty acid elongation in the FAS II pathway, converting 2-trans-enoyl-ACP to acyl-ACP via an NADH-dependent reaction.

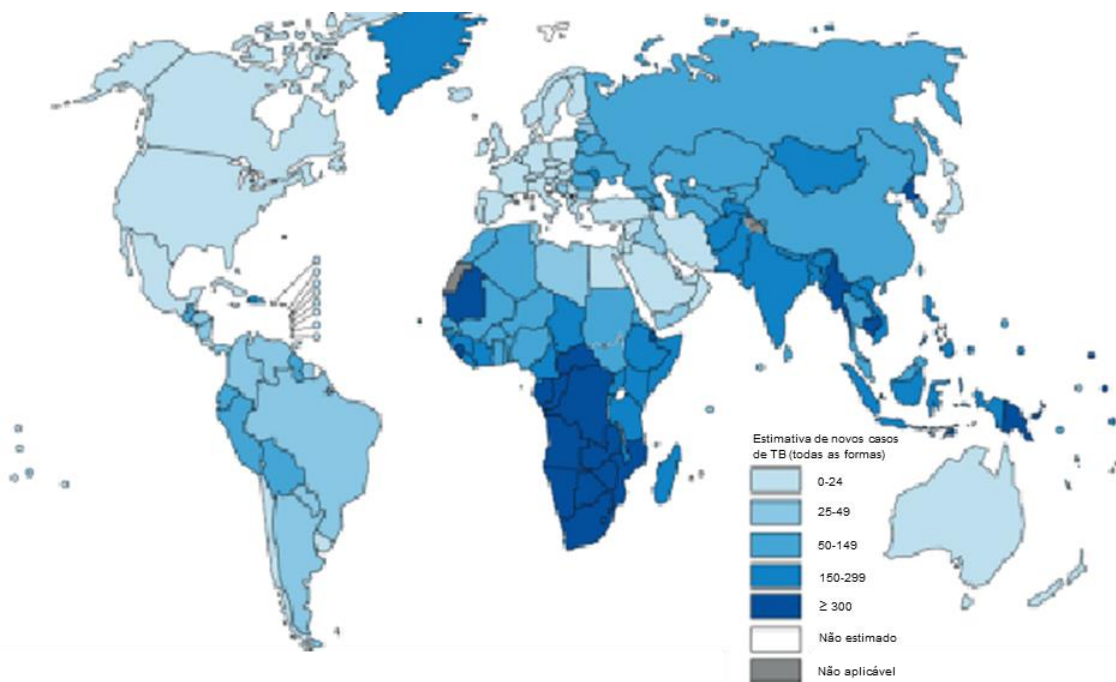
**Keywords:** cross-linking, mass spectrometry, enoyl-ACP reductase.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB), doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), é considerada um problema global de saúde pública. Em 2011 foi reportado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) 8,7 milhões de casos de tuberculose no mundo com uma variação de 8,3 milhões a 9,0 milhões de casos, equivalente a 125 casos por cada 100 000 habitantes (**Figura 1**) (WHO, 2012).

Dos países com maior incidência de tuberculose no mundo em 2011, destacam-se a Índia (2,0 milhões a 2,5 milhões), África do sul (0,4 milhões a 0,6 milhões), Indonésia (0,4 milhões a 0,5 milhões), Paquistão (0,3 milhões a 0,5 milhões) e China (0,9 milhões a 1,1 milhões). A Índia e China são os países com os maiores índices, rerepresentando 26% e 12% dos casos mundiais de TB, respectivamente (WHO, 2012).

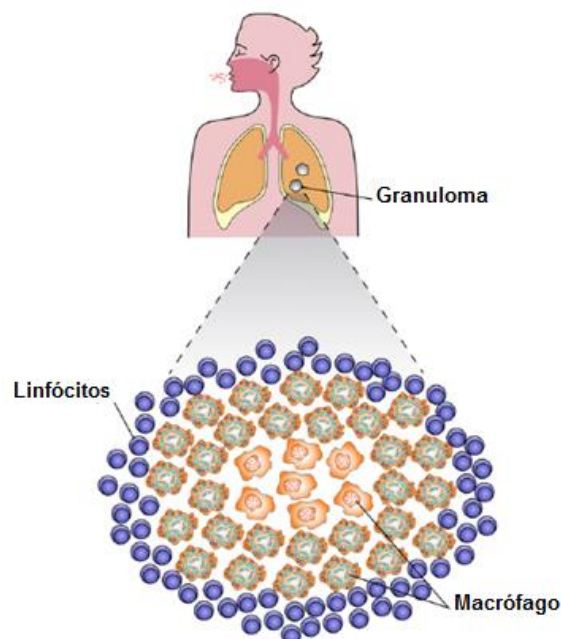


**Figura 1.** Mapa mundial representativo dos casos de TB, adaptado de (WHO, 2012).

Dentre os principais fatores relacionados ao número elevado de caso de TB estão: (i) falta da adesão dos pacientes aos esquemas terapêuticos disponíveis, os quais apresentam longa duração (de seis a nove meses); (ii) o aparecimento de cepas multirresistentes e, (iii) a coinfeção com o vírus do HIV, uma vez que a TB é a principal causa de mortes entre os pacientes HIV-positivos (ANDRADE *et al.*, 2008).

A transmissão do bacilo ocorre principalmente através da emissão de aerossóis por uma pessoa infectada com MTB, que são então inalados por outros indivíduos. Os bacilos transmitidos são internalizados por macrófagos alveolares presentes nos pulmões (PIETERS, 2008).

Os bacilos internalizados pelos macrófagos que conseguem evitar a fusão do lisossoma ao fagossoma sobrevivem. Entretanto, o MTB pode ficar em um estado de latência, ou desenvolver a doença. No estado de latência, o bacilo fica contido em uma estrutura denominada granuloma, ilustrada na **Figura 2**. No centro dessa estrutura estão localizados os macrófagos que internalizaram os bacilos envoltos por outros macrófagos e mais externamente por linfócitos (PIETERS, 2008).



**Figura 2.** Representação esquemática do granuloma. No centro, estão localizados os macrófagos contendo o bacilo, e na periferia os linfócitos T. Adaptado de PIETERS, 2008.

A emergência de focos de novas cepas MTB resistentes aos fármacos disponíveis tem mobilizado a sociedade científica para a procura de novas alternativas terapêuticas para combater a doença. Entre as cepas multirresistentes a fármacos, a cepa MDR-TB é definida como resistente aos fármacos de primeira linha como isoniazida e rifampicina. Os fármacos de segunda linha (etionamida, canamicina, ciclosserina e ácido *para*-aminosalicílico) são menos efetivos, e seus efeitos tóxicos são mais elevados (BASSO *et al.*, 2005).

As infecções causadas pela micobactéria são, em geral, difíceis de tratar devido à sua resistência natural à maioria dos antibióticos. Tal resistência é atribuída em grande parte à constituição da parede celular (ANDRADE *et al.*, 2008). Os sintomas da doença desaparecem após 2 a 4 semanas de tratamento contínuo; o que leva muitos pacientes a desistência, já que os fármacos utilizados são consideravelmente tóxicos, apresentando diversos efeitos colaterais e interações medicamentosas. Assim, se criam condições para a seleção de microrganismos resistentes a medicamentos, uma vez que em muitos desses pacientes acaba ocorrendo à reativação da doença. Um novo regime terapêutico preconizado pela OMS, conhecido como Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração (DOTS) tem sido incentivado; neste, se dá a participação de agentes de saúde que acompanham o tratamento dos pacientes, monitorando a administração regular de pelo menos três agentes quimioterápicos e a manutenção do tratamento por um período de 6 a 9 meses. O regime de tratamento consiste na administração de rifampicina, pirazinamida, isoniazida e estreptomicina ou etambutol durante os dois primeiros meses e isoniazida e rifampicina durante mais quatro meses (WHO Report 2012).

Apesar do DOTS, proclamado como “*um dos principais sucessos na história da saúde pública na década de 90*”, ser amplamente utilizado, a incidência e mortalidade da doença continuam aumentando em muitos países, exacerbadas pelos altos níveis de HIV (co-infecção), baixa qualidade dos sistemas de saúde pública e, principalmente, indisponibilidade de novos medicamentos. Dessa maneira, o controle sustentável da epidemia de TB não

pode ser alcançado em um país, sem que se leve em conta a epidemia global, incluindo a pesquisa como componente chave.

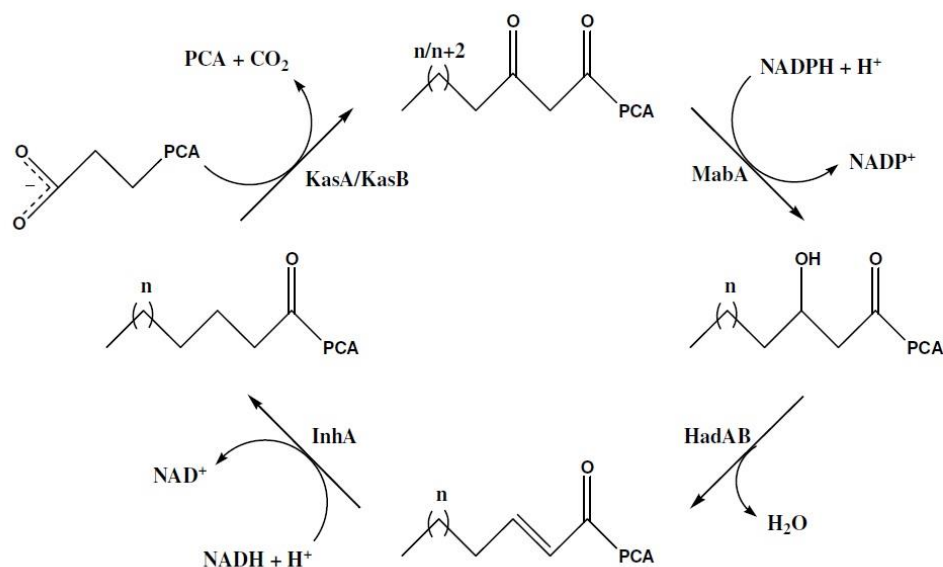
## 1.2 Enoil-ACP-redutase (InhA)

A parede celular da micobactéria é composta por três macromoléculas associadas covalentemente: peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. Essas macromoléculas associadas formam um complexo denominado mAGP (do inglês, *mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex*). Os ácidos micólicos têm sido utilizados como uma característica taxonômica-chave de gêneros como *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, e *Tsukamurella* (BASSO *et al.*, 2005).

A biossíntese de ácidos graxos pelo sistema de síntese de ácido graxos (FAS, do inglês, *fatty acid synthase*), envolve ciclos repetitivos de condensação, ceto-redução, desidratação e enoil-redução. O sistema FAS do tipo I é encontrado apenas em eucariotos, com exceção das plantas, que, juntamente com os procariotos, possuem o sistema FAS do tipo II (**Figura 3**). Diferentemente dos demais organismos, as micobactérias possuem os dois sistemas para a síntese de ácidos graxos, onde o sistema FAS II utiliza os produtos do sistema FAS I como base para o alongamento mais uniforme do ácido graxo (ANDRADE *et al.*, 2008).

A enzima enoil-ACP redutase é codificada pelo gene *inhA*, possuindo 268 aminoácidos e uma massa molecular aproximadamente de 29 kDa. Comporta-se como um homotetrâmero em solução (NICOLE *et al.* 2007), possuindo sete fitas  $\beta$  e oito hélices  $\alpha$  (Dessen *et al.*, 1995). Essa enzima regula o alongamento da cadeia dos ácidos graxos, exibindo uma especificidade para cadeias longas ( $C_{18} > C_{16}$ ) do tipo enoil tioéster. A reação catalizada pela InhA consiste em uma redução estereoespecífica, NADH-dependente, de ácidos graxos  $\alpha$  e  $\beta$ -insaturados ligados à proteína acil-carreadora, estando os resíduos K 165, M 161 e Y 158, envolvidos no mecanismo de catálise dessa enzima (OLIVEIRA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2008; BASSO *et al.* , 1998).

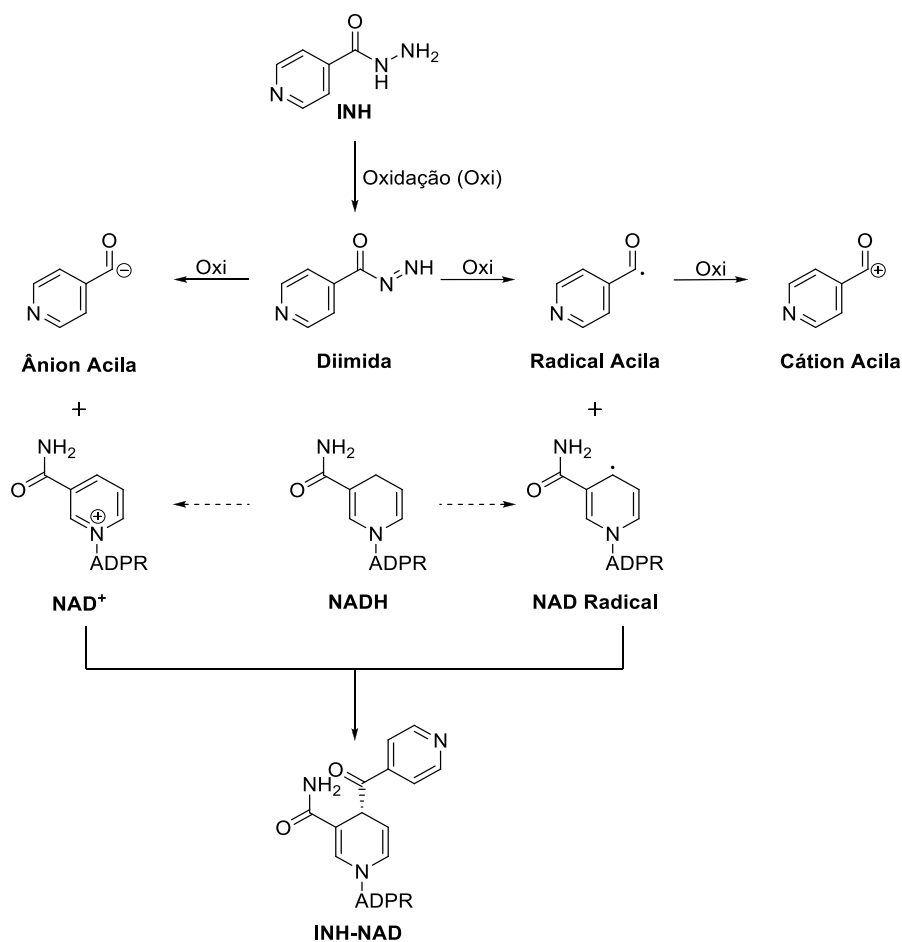




**Figura 3.** Mecanismo do sistema FAS II.

A isoniazida, o principal fármaco utilizado para o tratamento da TB, por sua vez, é um pró-fármaco que para exercer sua ação necessita sofrer ativação pela enzima catalase-peroxidase (KatG). Essa proteína, na presença de íons manganês e oxigênio molecular, produz um fragmento de acil-piridina radical (**Figura 4**), o qual se liga covalentemente ao átomo de carbono na posição 4 do anel nicotinamida do cofator NADH. O produto resultante forma um complexo binário com a enzima InhA apresentando uma constante de dissociação de 0,4 nM. Essa interação inibe a atividade catalítica da proteína interrompendo a síntese de ácidos micólicos, que culminam em mudanças na parede celular bacteriana, conduzindo à lise da micobactéria (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2005; BROUSSY *et al.*, 2005).

A alteração estrutural no gene *KatG* (S315T) (VASCONSELOS *et al.* 2008; RICHARD & CLIFTON, 2000), resulta na catalase-peroxidase mutante, sendo essa associada à resistência ao fármaco isoniazida. Estudos realizados por SOUZA *et al.*, 2005 e OLIVEIRA *et al.*, 2006 demonstraram que a isoniazida e a tionicotinamida coordenadas com pentacianoferrato(II) não necessitavam da KatG para produzir a inibição da enzima InhA.



**Figura 4.** Mecanismo de ativação da isoniazida.

Devido à importância dessa enzima, é necessário desenvolver métodos para estudar seu comportamento em solução, dentro desse contexto, a espectrometria de massa combinada a agentes de ligação cruzada é uma ferramenta interessante devido aos seus dados de alta resolução.

### 1.3 Espectrometria de massa (MS)

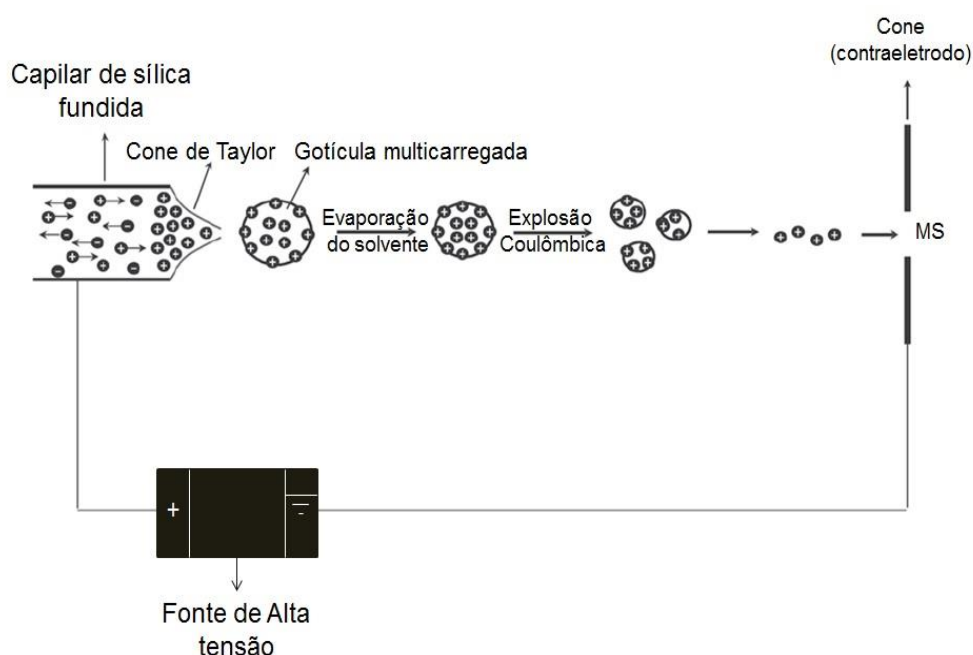
Métodos analíticos para a determinação da estrutura de proteínas, como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e difratometria de raios-X, possibilitam obter informações sobre macromoléculas em nível atômico. Entretanto, diferentemente da difratometria de raios-X, a MS possibilita acessar informações estruturais das proteínas e complexos protéicos em solução, em condições mais próximas das encontradas *in vivo*. Além disso, ao contrário da técnica de RMN, a MS apresenta limitações menores em

termos de tamanho das macromoléculas e pureza da amostra quando se trata de complexos protéicos (GOODLETT *et al.*,2010).

No final da década de 80, a técnica de MS avançou com o desenvolvimento de metodologias como a ionização por *electrospray* (ESI) e a dessecção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI). Essas metodologias possibilitaram que o processo de ionização de macromoléculas fosse realizado de maneira eficiente (PORTO, 2006).

A técnica de ESI consiste em aplicar um campo elétrico  $E$  no capilar de tal forma a produzir uma redistribuição das cargas em solução, ocorrendo um acúmulo de partículas positivas (no caso do modo positivo) na ponta do capilar.

No entanto, o acúmulo de cargas positivas conduz a uma desestabilização da superfície da gota presa na ponta do capilar, pois as partículas carregadas positivamente são atraídas para a região com carga negativa, de tal forma que a gota ganha a forma de um cone, denominado de cone de Taylor, e assim produzindo um fino aerossol (**Figura 5**) (KERBALE & VERKERK, 2009; FENN *et al.* 1989).



**Figura 5.** Representação do sistema de *electrospray*, adaptado de PALMA *et al.*,2008.

A dessolvatação do analito ocorre após a liberação das gotas geradas pelo cone de Taylor. Nesse processo, as moléculas do solvente são removidas por evaporação e a densidade de cargas nessas gotas aumenta à medida que a concentração de solvente na gota diminui por esse processo de dessolvatação. Dessa forma, a densidade de íons de mesma carga aumenta no interior da gota. Esse processo se segue até o ponto no qual a repulsão eletrostática supera a tensão superficial, resultando na fragmentação da gota, processo esse denominado explosão coulômbica (WILM & MATTHIAS, 1994).

Após os íons serem transferidos para a fase gasosa, esses são direcionados até o analisador de massas. O sistema linear de armadilha de íons funciona como um “filtro”, onde os íons são confinados radialmente por uma rádio frequência (RF) bidimensional, e axialmente é parado por potenciais aplicados no final dos eletrodos. Esse sistema possui uma alta capacidade de injeção e armazenamento de íons (FRANK *et al.* 2005; JONSSON *et al.* 2001).

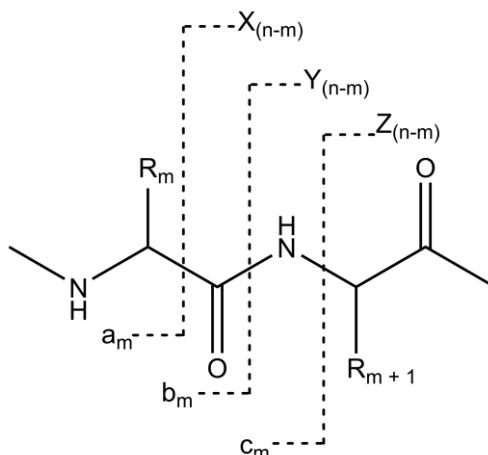
À medida que os íons passam pelo filtro de massa e chegam até o analisador é possível obter a razão massa/carga ( $m/z$ ). No caso de peptídeos, obtém-se um espectro de  $m/z$ ; através da deconvolução desse espectro de  $m/z$  se obtém as massas dos peptídeos, sendo então possível iniciar o procedimento de mapeamento peptídico.

No processo de mapeamento peptídico, os íons são primeiramente injetados no equipamento e então fragmentados, frequentemente pelo método de dissociação induzida por colisão (CID). Nesse método, os peptídeos ionizados são acelerados para uma região do espectrômetro preenchida com gás inerte (hélio, nitrogênio ou argônio), e assim colidem com as moléculas desse gás (PALMA *et al.*, 2008).

A energia translacional de cada colisão é convertida em energia interna, que induz a transferência intramolecular dos prótons em cada peptídeo, de maneira a desestabilizar as ligações do esqueleto polipeptídico, logo levando à formação dos íons fragmentos (PALMA *et al.*, 2008; JENNIFER *et al.*, 1996).

Os íons fragmentos mais comuns no processo de CID de baixa energia são os íons do tipo *a*, *b* e *y*, representados na **Figura 6**. Os íons do tipo *a* e *b*

retêm a carga residual na região *N*-terminal, e os íons do tipo *y* retêm a carga residual na região *C*-terminal (PALMA *et al.*, 2008).



**Figura 6.** Estrutura geral de um peptídeo conforme a nomenclatura de Roepstorff-Fohlmann-Biemann, adaptado de PALMA *et al.*, 2008.

O mapeamento consiste basicamente em determinar quais são os íons fragmentos dos respectivos peptídeos; uma vez identificados, é possível montar a sequência de aminoácidos.

Essa técnica permite obter com uma resolução elevada a informação sobre a estrutura unidimensional da cadeia polipeptídica, entretanto, quando combinada com outras técnicas experimentais, tais como *footprinting*, troca de hidrogênio-deutério, ou *cross-linking*, é possível obter a informações sobre a topologia da proteína, a acessibilidade ao solvente, a dinâmica em solução, a interação proteína-proteína e proteína-ligante (SINZ & DIHAZI, 2005; PAN *et al.* 2011; CEDRIC *et al.* 2009).

#### 1.4 Estudos de dinâmica por espectrometria de massa

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm utilizado radicais hidroxila para monitorar a estrutura, dinâmica e interação de proteínas. Esse agente altamente reativo modifica covalentemente as regiões expostas da proteína ao solvente, sendo que o aduto formado possui, para cada

modificação ocorrida, uma massa molecular 16 Da superior a do peptídeo não modificado, o que é facilmente reconhecido por MS (XIN *et al.* 2008).

Muitos métodos para geração de radicais livres têm sido propostos, como, por exemplo, métodos químicos, radiólise da água, ou fotólise do peróxido de hidrogênio. O método químico mais popular é a utilização do reagente de Fenton, que decompõe o peróxido de hidrogênio através da catálise mediada por metais de transição tais como o Fe(II). Todavia, a adição de EDTA no meio de reação pode solubilizar outros metais, podendo assim perturbar as condições das amostras biológicas. Além disso, essa reação exige um tempo considerável, podendo gerar alterações na estrutura que levam a erros de interpretação (BRENOWITZ *et al.* 2006).

A radiólise da água consiste em utilizar uma radiação ionizante capaz de gerar radicais hidroxila sem adição de qualquer componente químico. Entretanto, a utilização de um meio tamponado faz-se necessário para suportar a variação do pH devido à decomposição da água. A maior desvantagem desse sistema, contudo, é a necessidade de uma fonte geradora de raios gama (STOCKS *et al.* 2006).

Outro método empregado em estudos de dinâmica estrutural de proteínas consiste na geração de radicais hidroxila por meio da fotólise do peróxido de hidrogênio. Nesse método, utiliza-se uma fonte de laser com comprimento de onda de 266 nm para induzir a reação. Dentre as vantagens do método, destaca-se que a exposição aos radicais hidroxila pode ser feita em escalas temporais de microssegundos, levando a uma marcação rápida, que evita reações secundárias. Entretanto, o equipamento necessário é de custo elevado (GROSS *et al.* 2009).

A técnica de *cross-linking* consiste em utilizar uma molécula, a qual se liga a uma proteína-alvo covalentemente. Dessa maneira, é possível obter informações detalhadas sobre os locais de contato e inferir aspectos sobre a topologia da proteína (ANTON *et al.* 2003).

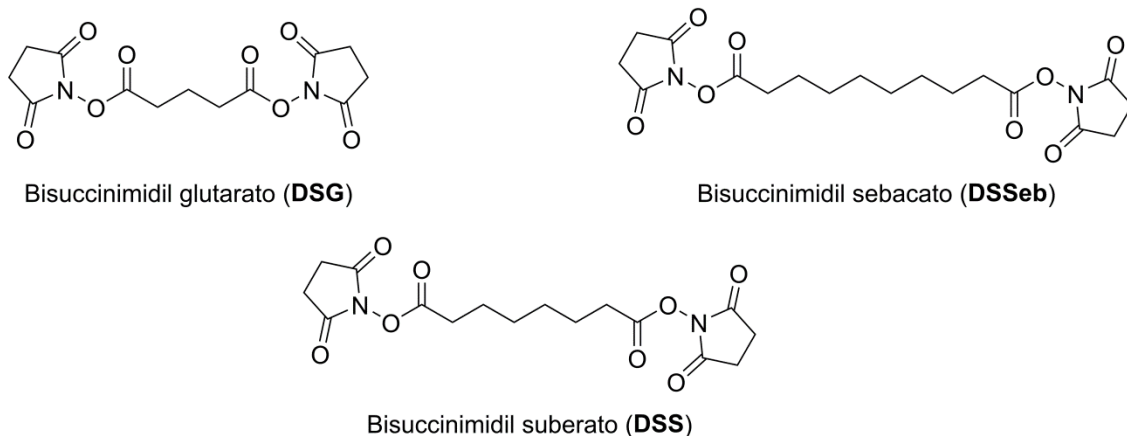
Diferentes tipos de reagentes de ligação cruzada (*cross-linkers*) têm sido sintetizados, estando, dentre os mais utilizados, as *N*-hidroxisuccinimidas

(NHS). Os ésteres de NHS reagem com nucleófilos, liberando o grupamento NHS ou sulfo-NHS, formando assim o produto acetilado. Outros exemplos estão listados na **Tabela 1** (SINZ, 2003).

**Tabela 1.** Propriedades de grupos mais comuns utilizado em Cross-linking (ANTON *et al.* 2003).

<b>Exemplos</b>	<b>Reatividade com</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Imido-ésteres, hidroxisuccinimida	<i>N</i> - Aminas	Ocorrência alta de grupos NH <sub>2</sub>	Removem sítios tripticos
Isotiocianatos	Aminas	Alta seletividade de reação	Removem sítios tripticos
Diazoacetato-esters, Diazoacetamidas	Ácidos Carboxílicos	Ocorrência alta dos grupos COOH	As reações possuem baixa especificidade
Cloretos de ácido	Sulfidrilas	Reações muito específicas	De ocorrência rara
Dissulfetos, maleimidias	<i>N</i> - Sulfidrilas	Combinação com mutação dirigida	Resíduos de cisteínas são encontrados frequentemente nas proteínas

Os *cross-linkers* podem ser bifuncionais, sendo estes classificados como homobifuncionais ou heterobifuncionais, de acordo com a natureza dos grupos funcionais presentes. Os grupos funcionais destes compostos encontram-se separados por um conjunto de átomos denominados cadeia espaçadora. Na **Figura 7** estão ilustrados alguns exemplos de *cross-linkers* homobifuncionais (SINZ, 2003; RINNER *et al.* 2010; AMADEU, 2009).



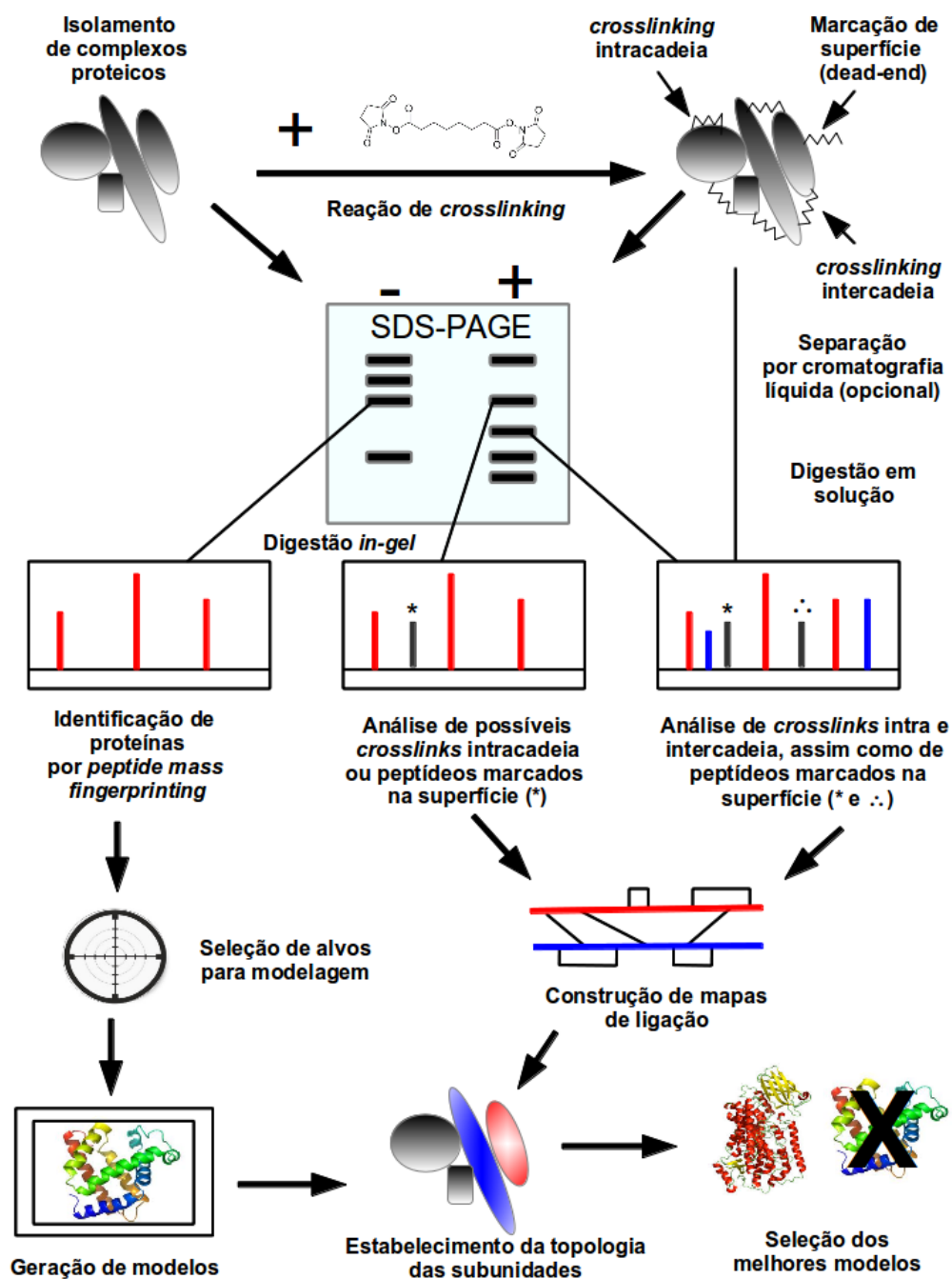
**Figura 7.** Exemplos de agentes de ligação cruzada comerciais derivados da *N*-hidroxisuccinimida.

A cadeia espaçadora pode ter características que facilitam o monitoramento seletivo (isto é, fluorescência) e purificação (por exemplo, cromatografia por afinidade), ou que geram produtos de clivagem a partir de reações subsequentes (ANTON *et al.* 2003).

Também foram desenvolvidos *cross-linkers* que não apresentam uma cadeia espaçadora entre os grupos funcionais, sendo conhecidos como *cross-linkers* do tipo *zero-length*. Estes compostos são os menores sistemas de *cross-linking* disponíveis, utilizados para produzir ligação cruzada entre duas proteínas (AMADEU, 2009; SINZ, 2003).

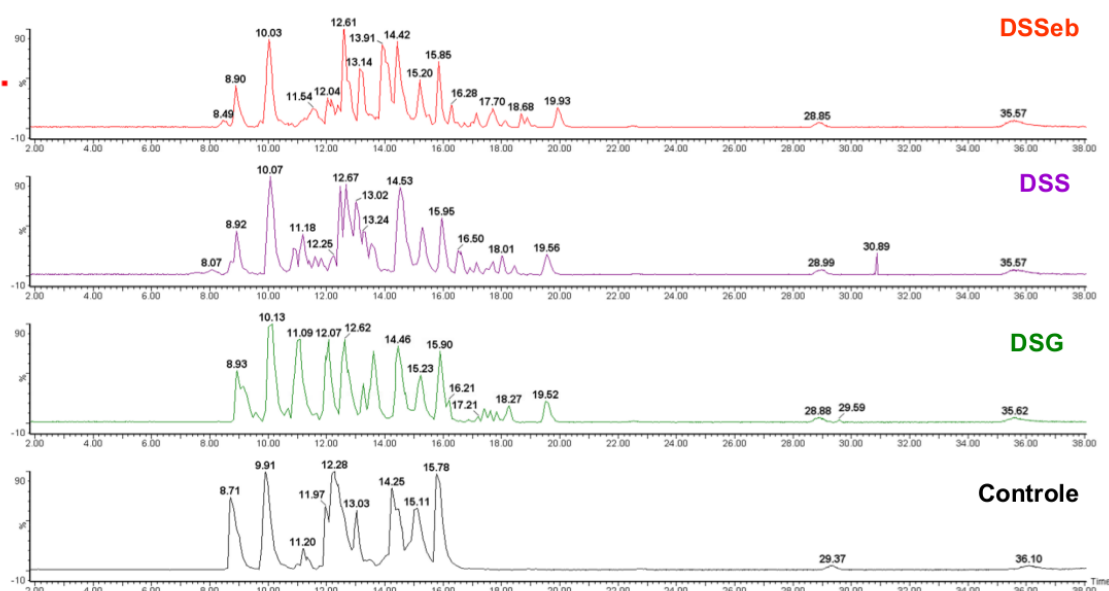
A estratégia geral da utilização dos *cross-linkers* consiste na determinação das restrições espaciais, como mostrado na **Figura 8**. Normalmente são utilizados *cross-linkers* bifuncionais, como, por exemplo, DSS. A concentração de proteína sugerida é da ordem de micromolar, a fim de reduzir agregados, e as reações podem ser monitoradas por SDS-PAGE (AMADEU, 2009; SINZ, 2003; PILAU, 2010).





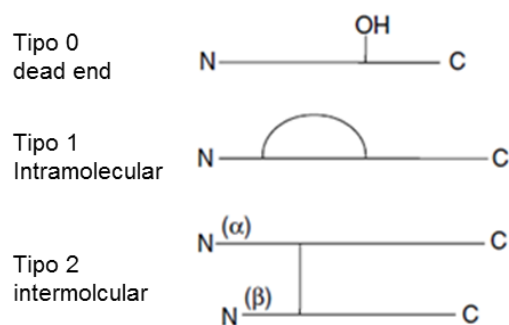
**Figura 8.** Estratégia geral para mapeamento da estrutura tridimensional através de peptídeos modificados do tipo 1 (área exposta ao solvente), peptídeos do tipo 2 (determina interações proteína-proteína), adaptado ANTON *et al.*, 2003.

ALANA, 2010 obteve dados de MS, no qual foram utilizados diferentes agentes de ligação cruzada para determinar a composição e topologia da Citocromo C, Ubiquitina e Mioglobina com análise dos cromatogramas obtidos. Observando a presença de íons com massa diferente da massa do padrão foi possível identificar os peptídeos modificados pelo tratamento com os agentes de ligação cruzada. A **Figura 9** mostra um exemplo de um cromatograma do Citocromo C.



**Figura 9.** Cromatogramas dos peptídeos trípticos do Citocromo C, adaptado de ALANA, 2010.

Os produtos gerados na reação de *cross-linking* são os intra-molecular, inter-molecular e *dead-end*, que estão representados na **Figura 10**. Os produtos de interesse são do tipo inter-molecular. Entretanto, a identificação desses peptídeos modificados não é tarefa trivial, pois a concentração dos peptídeos modificados é muito inferior à dos não modificados, o que dificulta a análise (AMADEU, 2009; SINZ, 2003; PILAU, 2010; ALANA, 2010).



**Figura 10.** Classificação dos tipos de produtos da reação com *cross-link*, tipo 0 *dead end*, tipo 1 intramolecular, tipo 2 intermolecular, adaptado de SINZ, 2003.

Todavia, tem-se desenvolvido diferentes técnicas para contornar esses problemas, como o uso de *cross-linkers* deuterados, ou *cross-linkers* denominados MS-cliváveis, que possuem sítios de clivagem que são induzidos no processo de MS/MS, *cross-linker* trifuncionais, os quais geralmente associados à biotina são purificados por cromatografia de afinidade (PIERRE *et al.* 2011; LUO *et al.* 2012).

Outra técnica também utilizada é a purificação por cromatografia de troca iônica. Essa técnica se baseia no fato de que os peptídeos modificados têm seu estado de carga líquido diminuído em relação aos não modificados. Devido às diferenças de carga, a força de interação entre a resina e o analito é diferente quando os peptídeos se encontram modificados, sendo assim possível realizar o enriquecimento da amostra para posterior análise por MS (SINZ *et al.* 2012).

A técnica de *cross-linking* combinada com a espectrometria de massa apresenta-se como uma estratégia rápida para o mapeamento de proteínas com estrutura tridimensional obtida com baixa resolução, ou no caso de não possuírem estrutura cristalográfica resolvida por difratometria de raios-X (SINZ & DIHAZI, 2005), como é o caso da InhA na forma apo.

Além disso, diferentemente dos estudos estruturais por difratometria de raios-X, que requerem a obtenção de cristais, a técnica de *cross-linking* fornece parâmetros experimentais sobre a dinâmica da proteína em solução. Comumente, para se obter o cristal, as proteínas passam por várias condições de estresse, e, como resultado, a estrutura resolvida não necessariamente corresponde à conformação encontrada em solução (JOSEPH, 2007). Dessa forma, torna-se interessante a utilização da metodologia de *cross-linking* no estudo da dinâmica de interação proteína-ligante, cujos resultados podem ser utilizados posteriormente como restrições em modelos teóricos para estudos *in silico*.

Em um estudo utilizando BS<sup>3</sup> como agente de ligação cruzada, para verificar interações entre o aduto formado a partir da ativação da isoniazida e a InhA do tipo selvagem ou mutantes da InhA (ile21val, ile47thr e ser94ala), foi demonstrado que houve mudança conformacional da InhA do tipo selvagem durante o processo de interação (NICOLE *et al.* 2007). Entretanto, esses dados de MS combinados com *cross-linkers* não foram suficientemente explorados, uma vez que não mostraram a caracterização estrutural relativa às mudanças conformacionais.

Assim, neste trabalho, a técnica de agentes de ligação cruzada combinada com a espectrometria de massas foi implementada para a caracterização da InhA e seu futuro uso para o mapeamento da interação dessa proteína com moléculas de interesse farmacológico.

## 2. Justificativa

O surgimento e propagação de cepas de MTB resistentes aos fármacos disponíveis no mercado atual têm se tornado um problema grave de saúde pública. Cepas como MDR-TB e XDR-TB (multirresistentes e extensivamente resistentes a fármacos, respectivamente) têm sido a motivação da comunidade científica a procura de novas formas químicas capazes de atuar sobre essas cepas (AMARAL, 2012; WHO, 2012).

O tratamento de cepas como do tipo MDR-TB requer aproximadamente um período de 20 meses, utilizando fármacos de segunda linha, os quais possuem efeitos colaterais mais elevados e a taxa de cura geralmente em torno de 60% a 75% (WHO, 2012; AMARAL, 2012).

Atualmente existem 10 compostos em investigação clínica com potencial de se tornarem fármacos antituberculose, com a intenção de diminuir o tempo de tratamento, uma vez que o tratamento preconizado pela Organização Mundial da Saúde, DOTS (do inglês *Directed Observed Treatment, Short-Course*), é demasiadamente longo (WHO, 2012).

No processo de desenvolvimento racional de um novo fármaco, considera-se, geralmente, aspectos como as regras de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001), propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e parâmetros termodinâmicos de formação do complexo binário (Energia livre de Gibbs, Entalpia, Capacidade Térmica, Entropia, Constante de equilíbrio). Esses passos no planejamento de um novo fármaco não são triviais; demandam tempo de pesquisa e desenvolvimento e testes de investigação clínica.

Por isso, o estudo estrutural da InhA e se faz necessário, uma vez que esses resultados podem ser combinados com estudos de dinâmica molecular para proposta de mecanismo reacional, servindo como um modelo para novas proposições química candidatas a fármacos antituberculose.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Utilizar a espectrometria de massas combinada a agentes de ligação cruzada para a caracterização estrutural em solução da enzima Enoil-ACP-redutase de *Mycobacterium tuberculosis*.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementação da técnica de caracterização estrutural de proteínas em solução por espectrometria de massas acoplada a agentes de ligação cruzada utilizando a mioglobina como proteína modelo.
- Caracterização das alterações estruturais da InhA com o uso do agente de ligação cruzada disuccinimidil suberato (DSS; CAS: 68528-80-3).

#### **4. MANUSCRITO**

Manuscrito submetido para publicação na revista *RSC Advances*.

## **A bottom-up approach coupled with SIM/SRM for the analysis of protein interactions in cross-linking mass spectrometry**

Anderson J. A. B. dos Santos, Cristiano V. Bizarro, Luiz A. Basso, Diógenes S. Santos\* and Pablo Machado\*

*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil*

\*Corresponding authors. Phone/Fax: +55 51 3320 3629

E-mail address: [diogenes@pucrs.br](mailto:diogenes@pucrs.br) (D.S. Santos); [pablo.machado@pucrs.br](mailto:pablo.machado@pucrs.br) (P. Machado)



## **Abstract**

Cross-linking combined with mass spectrometry has furnished important information regarding the function and architecture of proteins of biological interest. The main bottleneck in this technique is related to the detection of modified ions, which are obtained in very low relative abundance. Here, a new bottom-up approach using selected-ion monitoring and selected-reaction monitoring (SIM/SRM) is described to improve sensitivity in protein complex structural analysis. Our protocol provides a simple and rapid procedure to enable its use in high-throughput structural studies.

**Key words:** bottom-up, selected-ion monitoring, selected-reaction monitoring, cross-linked peptides, protein structure, molecular targets

## 1. Introduction

Since the discovery in the late 1980s of new ionization techniques (ESI and MALDI), mass spectrometry (MS) has emerged as a powerful tool in analyzing biological macromolecules.<sup>1,2</sup> More recently, this technology has achieved a prominent role in obtaining structural information on proteins and their complexes, furnishing important insights regarding fundamental biological processes.<sup>3</sup> Considered complementary to high-resolution methods such as protein crystallography and nuclear magnetic resonance, MS has been useful in protein structural characterization, especially when these higher-resolution techniques are prohibited by molecular weight, sample concentration, purity, or crystallization issues. Moreover, the conditions used in MS experiments can mimic the native protein environment, which is conducive to results that are reliable in a biological context.

When coupled with chemical cross-linking (CXMS), mass spectrometry provides information on important protein structural features such as distance constraints, solvent accessibility, dynamics, amino acid reactivity, and interaction patterns in a site-specific manner with high sensitivity and speed.<sup>4</sup> CXMS is based on the analysis of cross-linked complexes between amino acid residues of different proteins. The desired information is the identification of cross-linked peptides in the protein structure that were able to react at allowed spatial distances and/or at exposed protein regions accessible to the reactant.<sup>5</sup> In applying CXMS methods, two strategies have been accomplished for the identification of the peptide containing cross-linking: top-down and bottom-up approaches. In the top-down strategy, the intact protein complex is subjected to MS analysis followed by direct fragmentation within the mass spectrometer.

Although this protocol offers an important advantage in circumventing the need for peptide separation, it is limited by the size and nature of the protein complex under analysis. Alternatively, the bottom-up strategy involves proteolytic or chemical digestion followed by peptide separation and MS characterization.

It is noteworthy that due to the very low relative abundance of cross-linked peptides, compared to linear chains, their detection is extremely difficult and has been described as the main challenge in CXMS. In this context, several strategies have been applied to improve the capacity for identifying cross-linked products, including fluorogenic, cleavable or isotope-labeled cross-linkers.<sup>6</sup> However, these techniques are time consuming and require intensive sample handling, which reduces the applicability of CXMS in high-throughput structure analysis.<sup>7</sup>

In an attempt to overcome such limitations, the use of a bottom-up method coupled to selected-ion monitoring and selected-reaction monitoring approaches (SIM/SRM) could improve the sensitivity and facilitate the correct assignment of cross-linked residues. SIM/SRM was originally employed in quantitative proteomic experiments to monitor a small ion mass range of interest and specific ion transitions (precursor/fragment ion pairs).<sup>8</sup>

As part of our ongoing research program, we are interested in the structural characterization of molecular targets for the development of novel compounds for the treatment of tuberculosis. The information provided by CXMS can facilitate and enhance our understanding of the distances and conformational changes in proteins before and after binding events. Moreover, theoretical models obtained *in silico* could be corrected by distance constraints observed in these experiments.

Therefore, because of the importance of CXMS in protein structure inquiries and in an attempt to improve its facility, sensitivity and specificity in detecting cross-linked peptides, the use of a bottom-up approach coupled with SIM/SRM strategies for the characterization of protein-protein interaction is described. The proposed protocol employs disuccinimidyl suberate (DSS) as a cross-linking agent for the analysis of myoglobin and *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier reductase (*MtInhA*).

## 2. Results and Discussion

Our efforts focused first on the application of the proposed methodology to the study of myoglobin (MYO), which has already been well characterized in CXMS experiments.<sup>9</sup> The homobifunctional-based cross-linker DSS was chosen due to the facility of identifying its diagnostic ions.<sup>10</sup> This reactant was used at MYO:DSS molar ratios of 1:5, 1:10 and 1:50. After the acylation reaction, the samples were enzymatically digested, reducing the cross-linked protein complex to peptides. Next, nanoLC chromatography was performed, separating the peptide mixtures for analysis in a mass spectrometer equipped with a nano-electrospray ionization system. Operating the equipment in a data-dependent mode, the five most abundant precursor ions were selected for fragmentation ( $MS^2$ ), applying 35% of CID.

The data obtained in  $MS^2$  were screened in XQL (Xcallibur Query Language) software<sup>11</sup> to identify the modified peptides. After deconvolution, the identification was performed *via* XBobcat software,<sup>12</sup> generating a panel of candidate precursor ions (Figure 1). Although the diagnostic ions have been obtained with appreciable accuracy, the precursor ion did not correspond to a modified peptide (Table 1). One possible explanation is that cross-linked peptides are generally obtained in lower concentrations than unmodified ones, and when those ions are isolated, other unspecific ions at low abundance can be selected together for fragmentation. This action makes the identification of targeted ions a difficult and laborious process.

Therefore, to improve the sensitivity in identifying the linked peptides, a SIM/SRM approach was implemented, utilizing the ion candidates obtained from the protocol described above. From these analyses, it can be observed

that the SIM/SRM approach led to increased sensitivity compared to other detection strategies, such as target mass using the isolation band of  $m/z$  2 and  $m/z$  5 (Figure 2). In addition, an accurate assignment of cross-linked peptides containing lysine residues was obtained with an accuracy of 3.6 ppm. This finding was confirmed by specific ion transitions with an accuracy of 0.02 ppm and 5.9 ppm for  $P \rightarrow y_{3-DSS}^+$  and  $P \rightarrow y_{4-DSS}^+$ , respectively (Table 2). The improved sensitivity can be credited to the SIM method, which allows ion monitoring in a very small range of  $m/z$ , while the specificity is furnished by the SRM technique for characterizing the transitions of the ions of interest (e.g.,  $m/z$  909.46  $\rightarrow$  565.2873 for  $P \rightarrow y_{4-DSS}^+$ ).

Using this template protocol, the wild-type *Mtl*nhA was reacted with DSS for CXMS analysis. This enzyme is encoded by the *inhA* gene and consists of 268 amino acids with a molecular mass of approximately 29 kDa.<sup>13</sup> In solution, *Mtl*nhA has been described as a homotetramer containing seven  $\beta$ -sheets and eight  $\alpha$ -helices.<sup>13</sup> This enzyme regulates the elongation of the fatty acid chain, showing specificity for long chain ( $C_{18} > C_{16}$ ) enoyl thioesters. Moreover, *Mtl*nhA has been reported as a primary molecular target of the pro-drug isoniazid used to treat tuberculosis.<sup>14</sup> Through a search using XQL, the diagnostic ion  $m/z$  239.1744 was found with an accuracy of 5 ppm; however, the precursor ion did not corresponded to a modified peptide. Based on the analysis of the data from MS<sup>1</sup> using XBobcat software, the peptide APIGWNMKDATPVA(K240)-TGLLDG(K8)R with  $m/z$  1298.1947 was identified. Nevertheless, the SIM method was able to select the ion with  $m/z$  1298.1945, leading to an accuracy of 0.0077 ppm for the proposed peptide (Figure 3). This interpeptide cross-linking was observed between the lysine residues (K240 and K8) at a spatial

distance of 11 Å, according to X-ray experiments, and within the allowed distances for DDS covalent bonding.<sup>13,15</sup> In addition, these data were obtained in an easy, accurate, and rapid way and are in agreement with the results of previously reported cross-linking protocols using *MtInhA*.<sup>15</sup> Finally, analysis of the SDS-PAGE gel showed a band at approximately 112 kDa corresponding to the tetrameric form of *MtInhA* from the DSS reaction (Figure 4). This result corroborates the existence of the DSS-interlinked peptides across the dimer interfaces of *MtInhA*.

### **3. Conclusions**

The development of a bottom-up SIM/SRM methodology has been successfully accomplished for rapid, accurate and straightforward protein-protein interaction analysis in cross-linking mass spectrometry. The simplicity of execution and the potential applications make this methodology highly attractive. In addition, the sensitivity enhancement from the described protocol improved the specific identification of cross-linked peptide content in protein complex analysis. Studies on *MtInhA* in the presence of ligands (substrate and drug candidates) are in progress, and these data will be reported in the future.

### **Acknowledgements**

This work was supported by funds provided by the National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB), Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPEs (Brazil) to D. S. Santos and L. A. Basso. L. A. Basso

(CNPq, 520182/99-5) and D. S. Santos (CNPq, 304051/1975-06) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq).

## **4. Experimental**

### **4.1. Apparatus and analysis**

All common reactants were used as obtained from commercial suppliers without further purification. High-resolution mass spectra were obtained for all compounds on a LTQ Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). This hybrid system combines a LTQ XL linear ion trap mass spectrometer and an Orbitrap mass analyzer. The experiments were performed in the positive-ion mode using nano-electrospray ionization (nano-ESI). Chromatographic experiments were performed in a nanoLC Ultra system (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent).

### **4.2 Procedures**

**Myoglobin analysis.** MYO was solubilized in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, at a final concentration of 1 mg/mL. DSS was solubilized at a concentration of 1 mg/mL in a 1:10 (v/v) solution of dimethylformamide (DMF) and the same sodium phosphate buffer. Fifty microliter aliquots of the MYO solution were added to the DSS solution at molar ratios of 1:5, 1:10 and 1:50 protein to DSS.<sup>9</sup> The samples were incubated at room temperature for 2 h, and the reaction was halted by adding 1 M Tris hydrochloride, pH 7.5, for a final concentration of 50 mM.<sup>9</sup> Proteolytic digestion with trypsin was performed with



posterior chromatography using a nanoLC system connected to a mass spectrometer through a nano-electrospray ionization source. Tryptic peptides were desalted on a 150  $\mu\text{m}$  i.d., 5 cm long precolumn and separated on a 150  $\mu\text{m}$  i.d., 11 cm long analytical column, both packed in-house with Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  C18 core-shell particles (Phenomenex, Inc.) by a slurry packing procedure. The gradient method employed a mobile phase A composed of water/acetonitrile/formic acid (97:3:0.1; v/v) and a mobile phase B composed of acetonitrile/water/formic acid (97:3:0.1; v/v). The flow used was 300 nL/min with a gradient of 5% B (0-5 min), 5 - 35% B (5-95 min), 35 - 95% B (95-97 min), 95% B (97-180 min).<sup>16</sup>

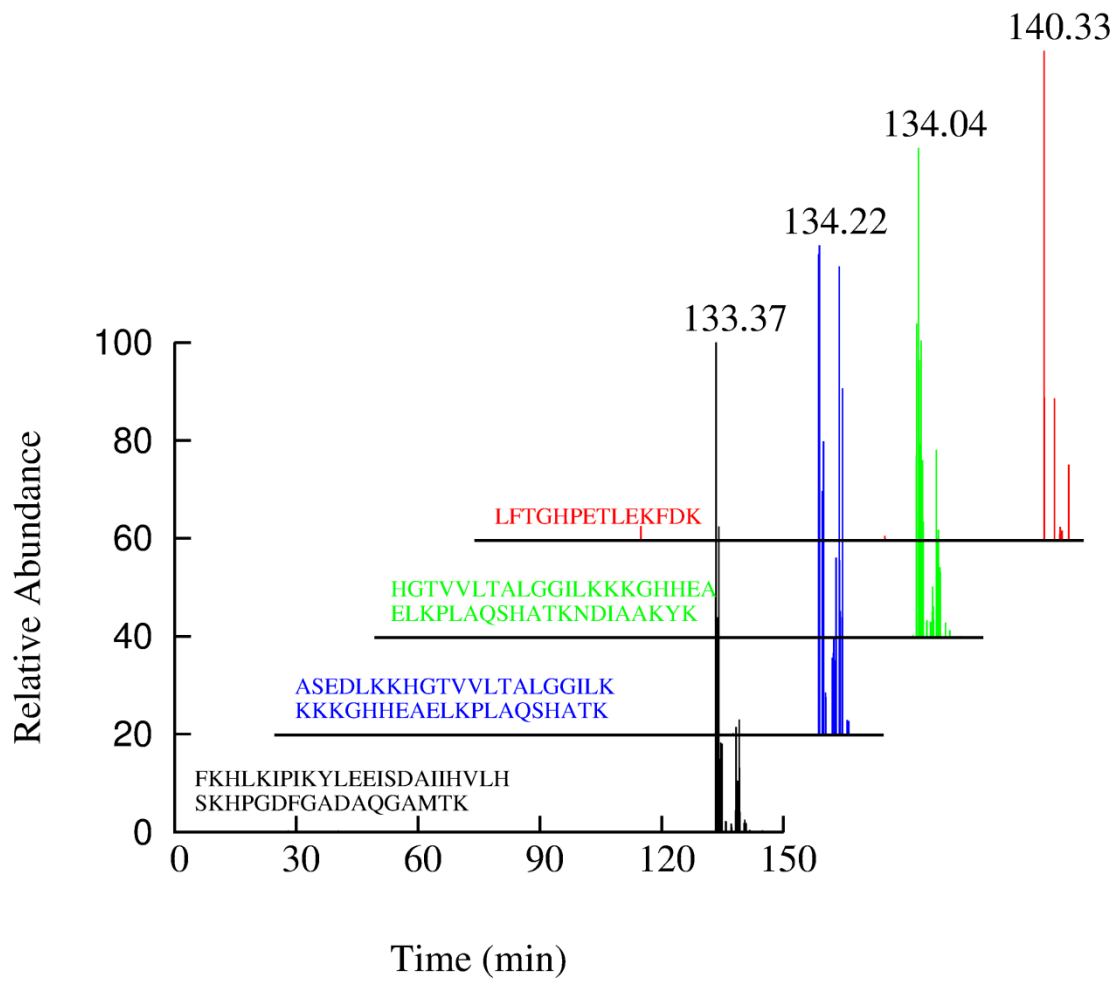
The Orbitrap was operated in a data-dependent mode followed by the fragmentation of these ions using dynamic exclusion for the MS<sup>2</sup> spectrum of the 5 most intense precursor ions. MS<sup>1</sup> was scanned with  $m/z$  50-2000, capillary voltage of 2kV and CID 35%. The modified peptide search was performed using the XQL input parameters scan number, area, MS<sup>2</sup> spectrum, and diagnostic mass range of ions ( $m/z$  222.1494,  $m/z$  239.1759 and  $m/z$  305.2229) with a variation of 0.02 Da. The candidate ions from the modified peptides were obtained using xBobcat software. Finally, SIM/SRM (MS<sup>1</sup> and MS<sup>2</sup>) was acquired in the FTMS, obtaining the target ions within an isolation band of  $m/z$  2 with posterior fragmentation by CID at 35% power output.

***Mtl*nhA analysis.** The expression and purification of *Mtl*nhA was performed as previously described.<sup>17</sup> The sample preparation was the same as described above for MYO, using a reaction stoichiometry of 1:100 (*Mtl*nhA:DSS).

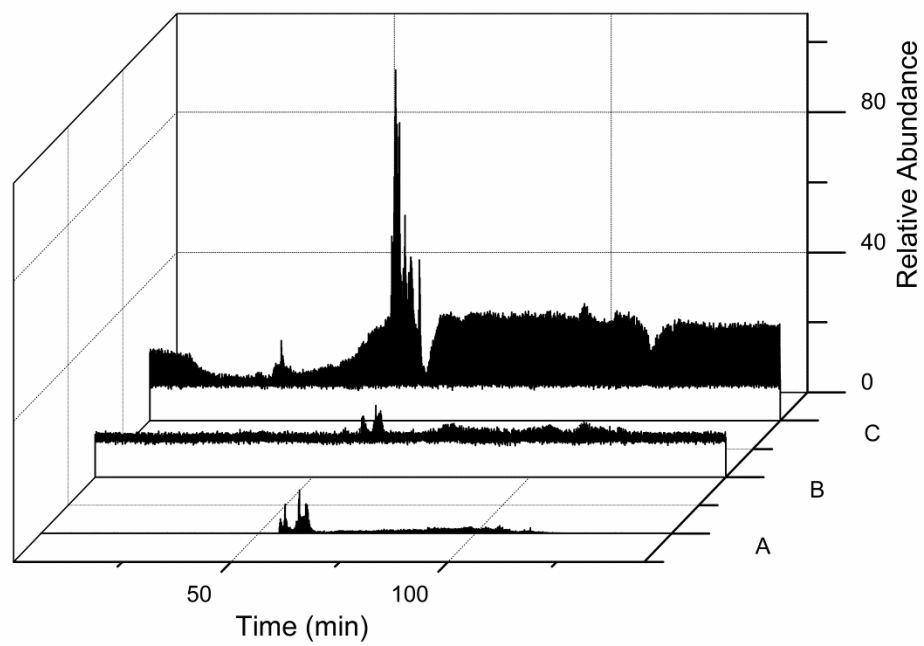
## 5. References

1. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng and C.M. Whitehouse, *Science*, 1989, **104**, 2498.
2. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299.
3. P. Singh, A. Panchaud and D. Goodlett, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 2636.
4. G. H. Dihazi and A. Sinz, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 2005.
5. A. Sinz, *J. Mass Spectrom.*, 2003, **38**, 1225.
6. J. W. Back, L. de Jong, A. O. Muijsers and C. G. de Koster, *J. Mol. Biol.*, 2003, **331**, 303.
7. A. Kao, C.-li Chiu, D. Vellucci, Y. Yang, V. R. Patel, S. Guan, A. Randall, P. Baldi, S. D. Rychnovsky and L. Huang, *Mol. Cell. Proteomics*, 2011, **10**, 1.
8. N. R. Zhang, S. Yu, P. Tiller, S. Yeh, E. Mahan and W. B. Emary, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, **23**, 1085.
9. A. H. Iglesias, L. F. A and Santos, F. Gozzo, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 909.
10. A. H. Iglesias, L. F. A. Santos and F. Gozzo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, **20**, 557.
11. W. S. Michael and H. C. Eric. *Thermo Fisher Scientific*.
12. A. Maiolica, D. Cittaro, D. Borsotti, L. Sennels, C. Ciferri, C. Tarricone, A. Musacchio and J. Rappsilber, *Mol. Cell. Proteomics*, 2007, **6**, 2200.
13. A. Dessen, A. Quémard, J. S. Blanchard, W. R. Jr. Jacobs, J. C. Sacchettini, *Science*, 1995, **267**, 1638.

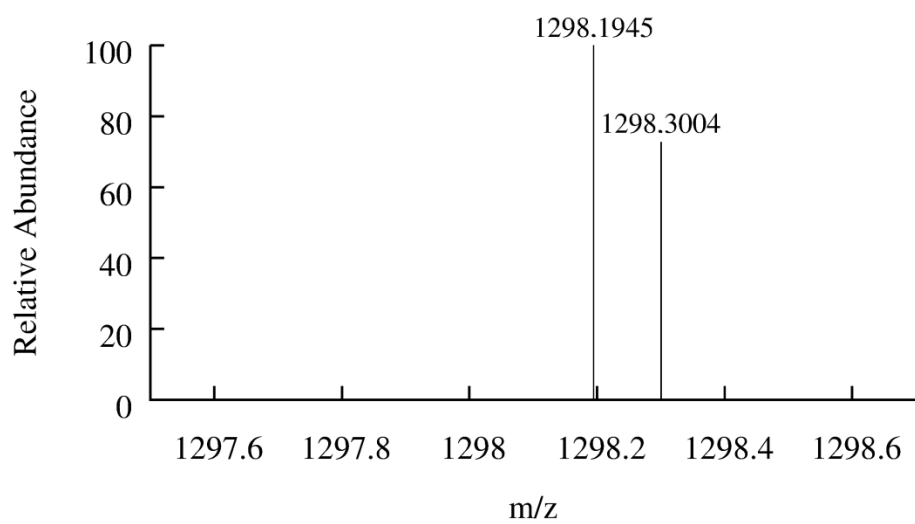
- 14.L. A. Basso, R. Zheng, J. M. Musser, W. R. Jr. Jacobs and J. S. Blanchard,  
*J. Infect. Dis.* 1998, **178**, 769.
- 15.N. A. Kruh, R. Rawat, B. P. Ruzsicska and P. J. Tonge, *Protein  
Sci.*,2007, **16**, 1617.
- 16.A. Leitner, R. Reischl, T. Walzthoeni, F. Herzog, S. Bohn, F. Förster and  
R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics.* 2012, **11**, M111.014126.
- 17.A. Quémard, J. C. Sacchettini, A. Dessen, C. Vilcheze, R. Bittman, W. R. Jr.  
Jacobs and J. S. Blanchard, *Biochemistry*, 1995, **34**, 8235.



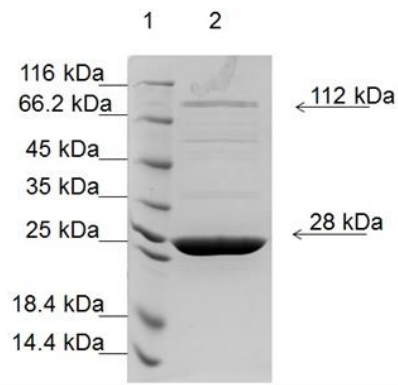
**Figure 1.** Chromatogram of the modified peptides.



**Figure 2.** MYO-DSS chromatogram of the SIM/SRM (A), MYO-DSS chromatogram with mass target and isolation width  $m/z$  2 (B), MYO-DSS chromatogram with mass target and isolation width  $m/z$  5 (C).



**Figure 3. Ion  $m/z$  1298.1945 charge state +2 obtained in SIM mode of InhA protein.**



**Figure 4.** SDS-PAGE of the InhA-DSS (Lane 2). Lane 1 mass molecular indicator.

**Table 1.** List of diagnostic ions of MYO-DSS (1:50).

Precursor Ion ( <i>m/z</i> )	Diagnosis Ion ( <i>m/z</i> )	Error (ppm)
205.13	222.1428	29
637.3	222.1495	0.45
418.26	222.1482	5.4
205.13	222.1462	14.4



**Table 2.** List of transition of MYO-DSS.

Amino Acid Sequence	Transitions	Error (ppm)
LFTGHPETLEKFDK	$P \rightarrow y_{3-DSS}^+$	0.02
	$P \rightarrow y_{4-DSS}^+$	5.9

25-Jun-2014

Dear Dr Machado:

Thank you for submitting your manuscript entitled "A bottom-up approach coupled with SIM/SRM for the analysis of protein interactions in cross-linking mass spectrometry" to RSC Advances. This is an automatic acknowledgement that your files have been successfully uploaded. You will receive a formal acknowledgement message from the Editorial Office once your submission has been verified.

Your manuscript ID is RA-ART-06-2014-006240.

Please mention the above manuscript ID in all correspondence relating to this manuscript. If there are any changes to your contact details, please log in to your Author Centre at <http://mc.manuscriptcentral.com/rscadv> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by logging into your Author Centre at <http://mc.manuscriptcentral.com/rscadv>.

Thank you for submitting your manuscript to RSC Advances.

Yours sincerely,

RSC Advances Editorial Office

advances@rsc.org

## 5. Outros Resultados

### 5.1 Impletamentação da técnica de agentes de ligação cruzada baseada em espectrometria de massa para caracterização estrutural de proteínas utilizando a Mioglobina como proteína modelo.

A proteína mioglobina (MIO) foi escolhida para implementação por já estar bem caracterizada na literatura (AMADEU, 2009; PILAU, 2010; ALANA, 2010).

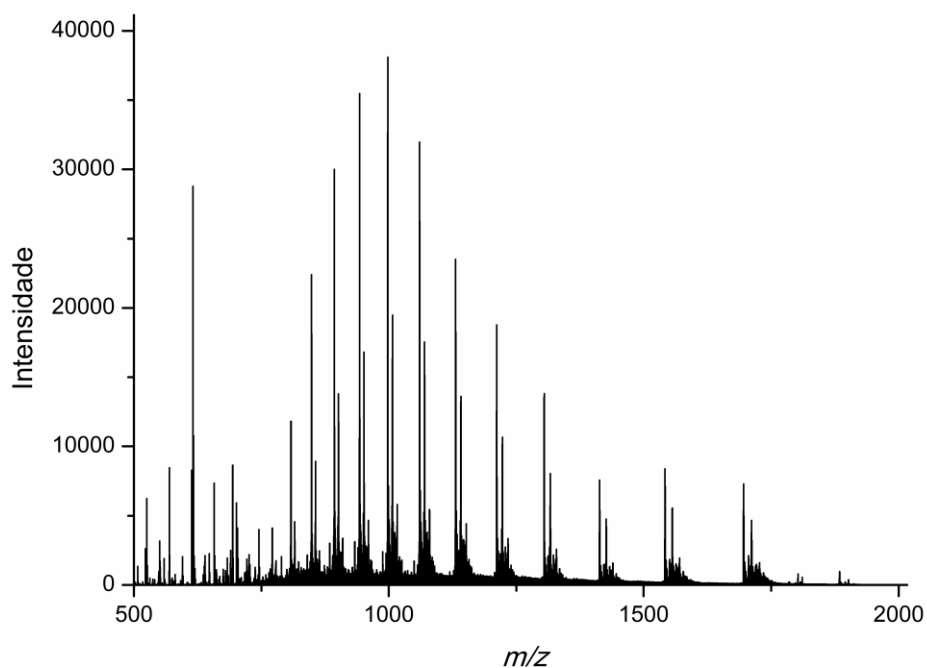
Primeiramente, a MIO foi solubilizada em uma solução tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7, em uma concentração final de 1 mg/mL. Alíquotas de 50 µL da proteína foram separadas e adicionadas em uma solução de concentração de 1 mg/mL de DSS (devido à baixa solubilidade do DSS, esse é solubilizado em 100 µL dimetilformamida (DMF) e completado com solução tampão fosfato de sódio até um volume final de 1 mL) em uma proporção molar de 1:5, 1:10 e 1:50 de proteína/DSS. Essa amostra foi incubada a temperatura ambiente por 2 h e a reação foi finalizada adicionando Tris·HCl 1M, pH 7,5 de modo que sua concentração final foi de 50 mM (AMADEU, 2009; PILAU, 2010; ALANA, 2010). Dessas amostras foram separadas três alíquotas. Para cada experimento de *top-down* foi utilizado apenas amostras com estequiometria de 1:5. Enquanto na abordagem por *bottom up* foi utilizado as amostras com estequiometria de 1:5, 1:10 e 1:50.

#### 5.1.1 Abordagem por *top-down*

Para os experimentos de *top-down* as amostras foram purificadas através de uma coluna C<sub>18</sub>, logo após foram evaporadas sob pressão reduzida e ressuspensas em 30 µL de água ultra pura. Depois foram retirados 10 µL de amostra e diluído em 490 µL com uma solução de acetonitrila/água (1:1) com 2% de ácido fórmico. Por fim, foram injetadas no espectrômetro de massa.

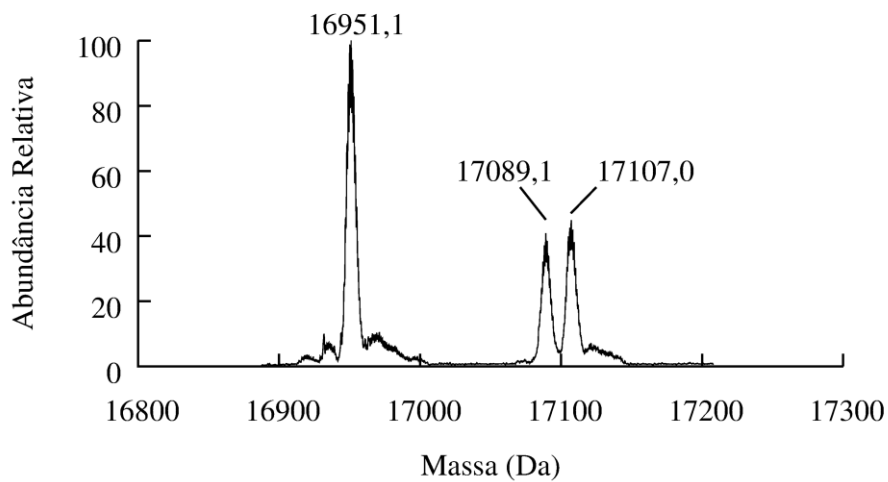
O equipamento utilizado foi LQT-XL Orbitrap, operado no modo FTMS, com 10 microscans, usando ESI, e depois foi feita a média sobre 500 scans

(Figura 11). Nos experimentos de MS/MS os íons específicos foram isolados com uma banda de isolamento de 5  $m/z$ , e depois fragmentados por CID com energia de 35%. A Figura 12 mostra o espectro deconvoluído da MIO-DSS (1:5) no qual foi observado que nessas condições foi possível obter apenas uma modificação por proteína, sendo essa a melhor condição para o experimento de *top-down*. Nessa condição é menor a probabilidade de um íon interferente surgir no processo de isolamento do íon de interesse.

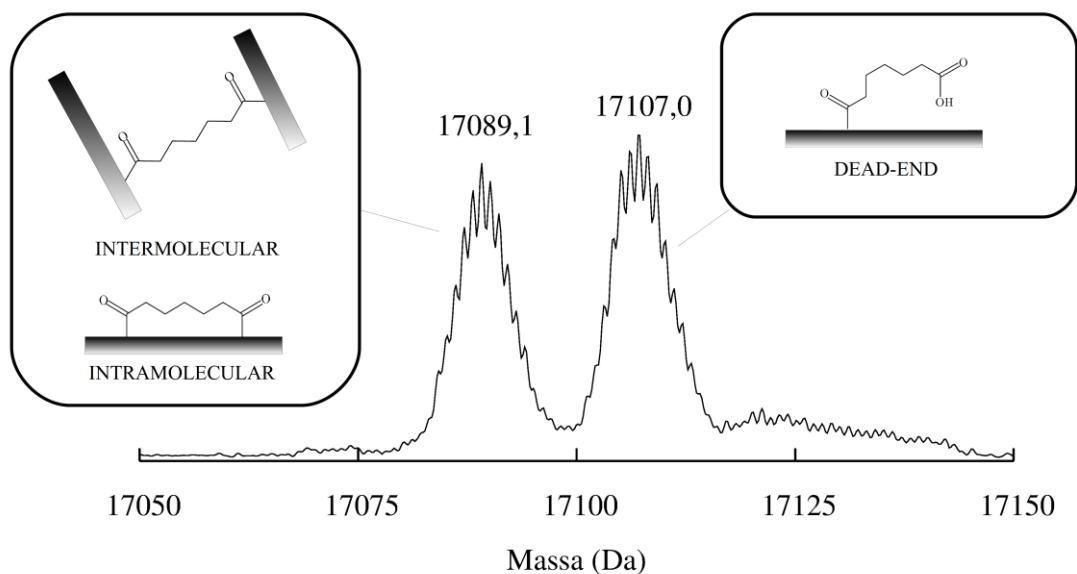


**Figura 11.** Espectro de massas médio da MIO-DSS.

(a)

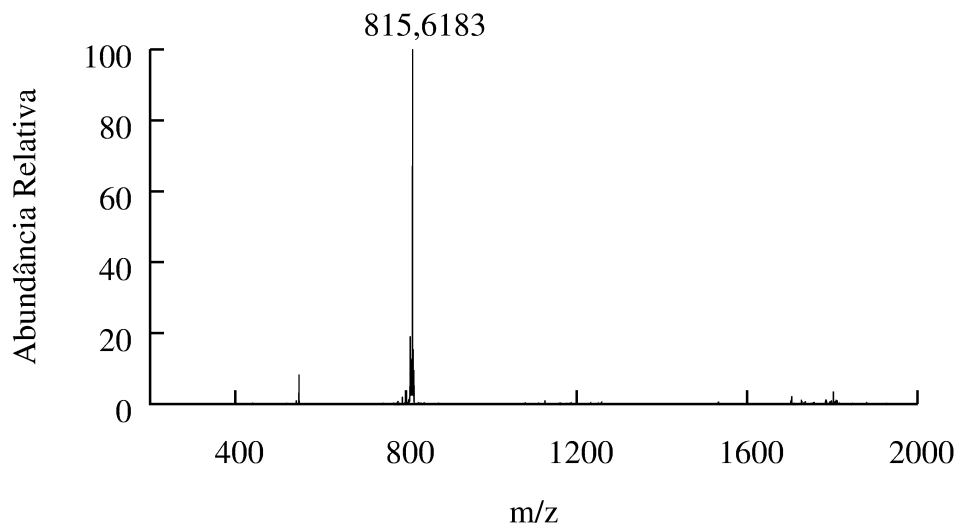


(b)

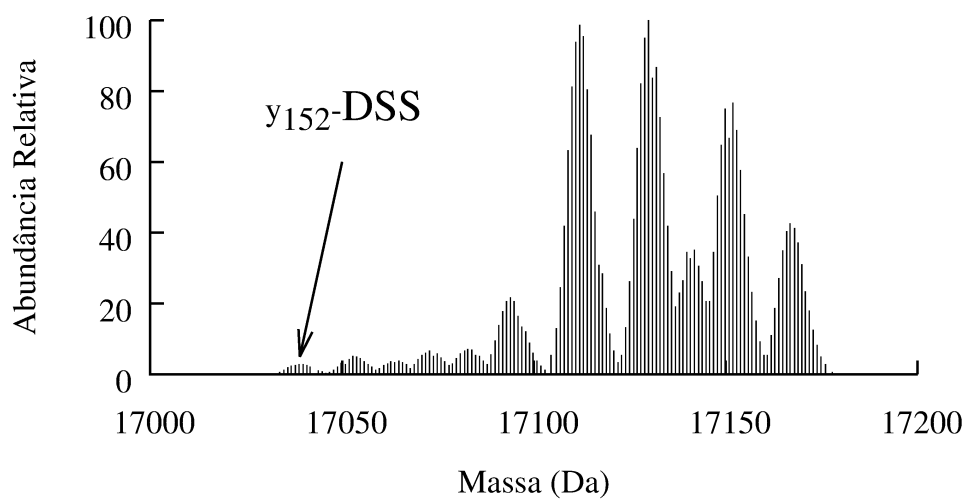


**Figura 12.** Espectro deconvolvido da MIO-DSS (1:5), íon 17089,1 Da é referente a modificação do tipo intermolecular/intramolecular, íon 17107,0 Da é referente a modificação do tipo dead-end.

A **Figura 13** mostra o íon de  $m/z$  815,6183 com estado de carga 21 correspondente a mioglobina com um agente de ligação cruzada do tipo *dead-end*, após fragmentado, foi feita a deconvolução do espectro e assim identificado o íon fragmento  $y_{152}$ -DSS (**Figura 14**).



**Figura 13.** Espectro de massa do íon  $m/z$  815,6183.



**Figura 14.** Espectro de MS/MS do íon 815 deconvoluido.

Um passo inicial para a caracterização de proteínas por *top-down* é a determinação da massa intacta bem como a distribuição dos seus respectivos estados de carga, dos quais foram selecionados para experimentos de MS/MS.

Como mostrado na **Tabela 2**, ao escolher diferentes estados de carga foi possível identificar diferentes íons fragmentos, segundo REID *et al.* 2005, diferentes estados de carga podem conduzir a diferentes perfis de fragmentação, essa diferença ocorre em estados de carga altos com os estados de carga mais baixo. Explorando essa característica é possível então aumentar o número de íons fragmentos necessário para a identificação. Os íons precursores da **Tabela 2** contêm uma modificação por proteína do tipo *dead-end*, todavia não foi possível identificar qual resíduo de aminoácido que continha a modificação.

**Tabela 2.** Lista de íons precursores e íons fragmentos.

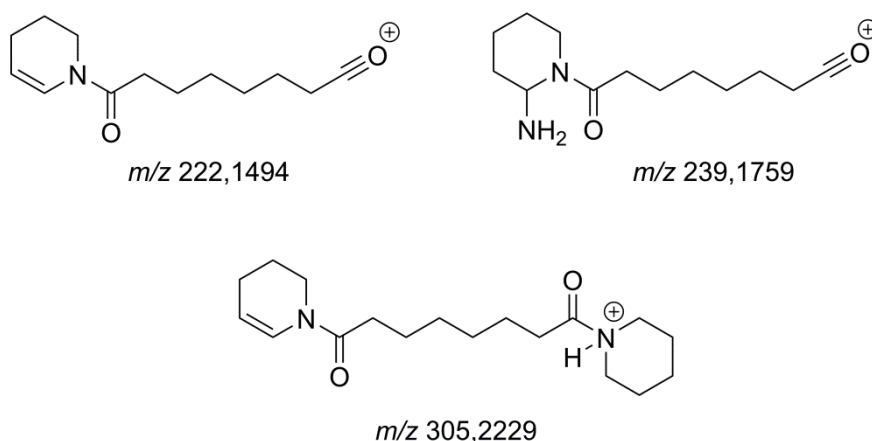
Íon precursor	Estado de carga	Íon fragmento
815	21	Y <sub>152</sub> -DSS
901	19	b <sub>148</sub> -DSS
1711	10	Y <sub>32</sub> -DSS
1007	17	Y <sub>151</sub> -DSS; Y <sub>147</sub> -DSS

### 5.1.2 Abordagem *bottom up*

Na abordagem *bottom up* as amostras foram reduzidas, alquiladas e depois tripsinizadas. A cromatografia foi realizada em um sistema Nano-LC conectado ao espectrômetro da Thermo (LTQ Orbitrap XL) equipado com *nano-electrospray*. A fase móvel A utilizada foi água/acetonitrila/ácido fórmico em uma proporção de 97:3:0,1 respectivamente e a fase móvel B acetonitrila/água/ácido fórmico na proporção de 97:3:0,1. A coluna que foi utilizada teve 11 cm de comprimento e 0,075 mm de diâmetro interno. Essa coluna foi empacotada com a resina Michom Magic C<sub>18</sub> (3 µm de tamanho de partícula, 200 Å o tamanho do poro). O fluxo utilizado foi de 300 nL/min usando um gradiente de 5% de B (0 – 5 min), 5 – 35% de B (5 – 95 min), 35 – 95% de B (95 – 97 min) e 95% de B (97 – 180 min) (ROLAND *et al.* 2012).

Foram selecionados os 5 íons precursores mais intensos para realizar scan de MS<sup>1</sup> (modo dependente de dados) com intervalo de  $m/z$  de 50 – 2000 no Orbitrap, seguido da fragmentação desses íons no LQT (dinâmica por exclusão) para espectro de MS<sup>2</sup>. Os parâmetros do experimento foram os seguintes: a voltagem aplicada no capilar de 2 kV, com CID de 35% (ROLAND *et al.* 2012; AMADEU, 2009).

A busca dos peptídeos modificados foi realizada utilizando a linguagem XQL (*Xcallibur Query Language*) no qual foram selecionados os seguintes parâmetros para a identificação dos peptídeos: número do scan, área, espectro MS<sup>2</sup>, intervalo de massa dos respectivos íons diagnósticos (mostrado na **Figura 15**) com uma variação de 0,02 Da.



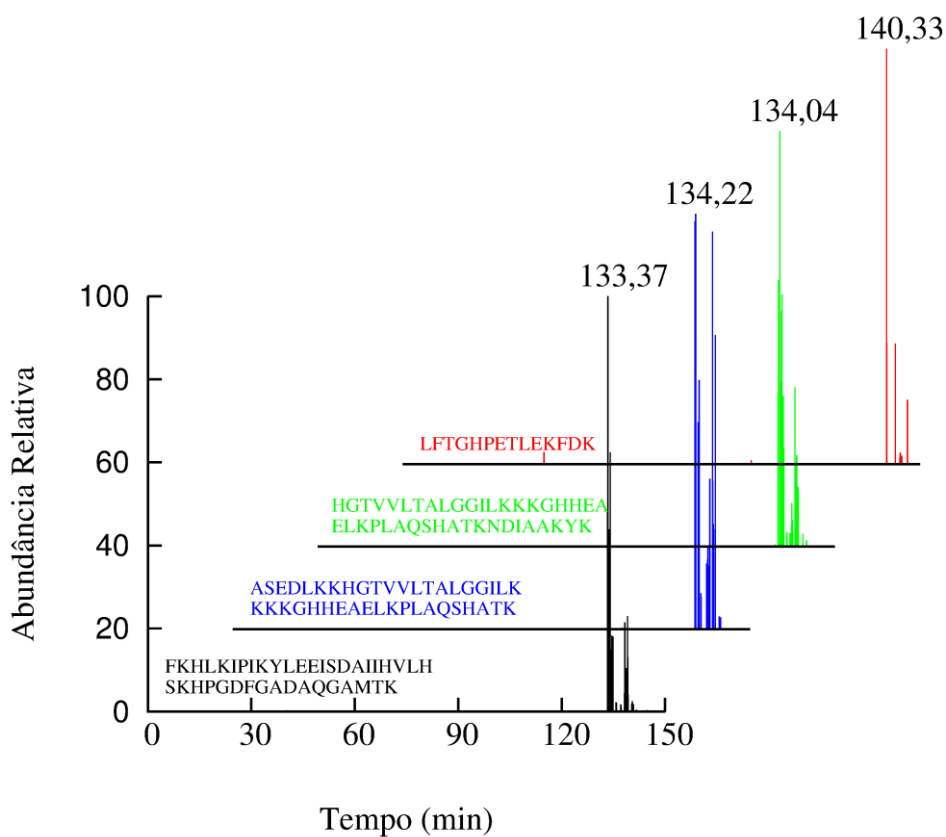
**Figura 15.** Estrutura e relação  $m/z$  dos íons diagnósticos observados em experimentos que utilizam o DSS como agente de ligação cruzada (IGLESIAS *et al.* 2010 GOZZO *et al.* 2009).

A **Figura 16** apresenta o cromatograma mostrando as sequências encontradas no MS<sup>1</sup> que foram identificadas utilizando o software XBobcat disponível para uso *online*.

Nas **Tabelas 3, 4 e 5** estão os resultados encontrados utilizando a linguagem XQL. É possível verificar que mesmo encontrando os íons diagnósticos com erro apreciável, o íon precursor não correspondia a um peptídeo modificado. Isso acontece, pois o íon correspondente ao peptídeo modificado encontra-se em concentrações menores em relação aos não



modificados. Assim, quando um íon é isolado pode haver outros íons em baixa abundância também selecionados que são fragmentados conjuntamente.



**Figura 16.** Cromatograma dos peptídeos modificados.

**Tabela 3.** Lista dos íons diagnósticos da MIO-DSS 1:5

MIO-DSS (1:5)		
Íon precursor ( <i>m/z</i> )	Íon diagnóstico ( <i>m/z</i> )	Erro (ppm)
205,09	239,1713	19
219,17	222,1486	3,6
771,2	222,1408	38

**Tabela 4.** Lista dos íons diagnósticos da MIO-DSS 1:10

MIO-DSS (1:10)		
Íon precursor ( <i>m/z</i> )	Íon diagnóstico ( <i>m/z</i> )	Erro (ppm)
1139,81	305,2268	12
447,76	222,1419	33
240,92	222,1496	0,90

**Tabela 5.** Lista dos íons diagnósticos da MIO-DSS 1:50

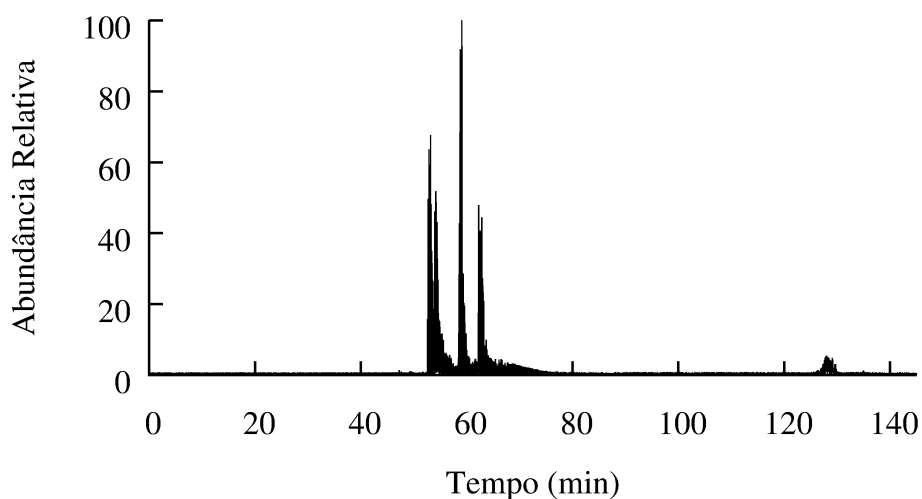
MIO-DSS (1:50)		
Íon precursor ( <i>m/z</i> )	Íon diagnóstico ( <i>m/z</i> )	Erro (ppm)
205,13	222,1428	29
637,3	222,1495	0,45
418,26	222,1482	5,4
205,13	222,1462	14,4

Com base nesses resultados foi modificado o modo de operação de aquisição de dados do MS, em vez de operar no modo dependente de dados, foi utilizado um filtro no qual o equipamento busca apenas os valores de massa dos íons selecionados. Nos experimentos de MS/MS os íons específicos foram isolados com uma banda de isolamento de 2 *m/z* e 5 *m/z*, e depois fragmentados por CID, com energia de 35%.

Nos experimentos da mioglobina sem DSS foram escolhidos os peptídeos mostrados na **Tabela 6**, e a **Figura 17** mostra o cromatograma da mioglobina.

**Tabela 6.** Lista de peptídeos selecionados da MIO sem DSS.

Sequência de Aminoácidos	[M + H] <sup>+</sup>	Erro (ppm)	RT (min)
HGTVVLTALGGILK	1378,833	-6,56	60,06
VEADIAGHGQEVLR	1606,853	-1,32	55,16
YLEFISDAIIHVLHSK	1885,013	-4,84	62,85
LFTGHPETLEK	1271,653	-8,12	53,55

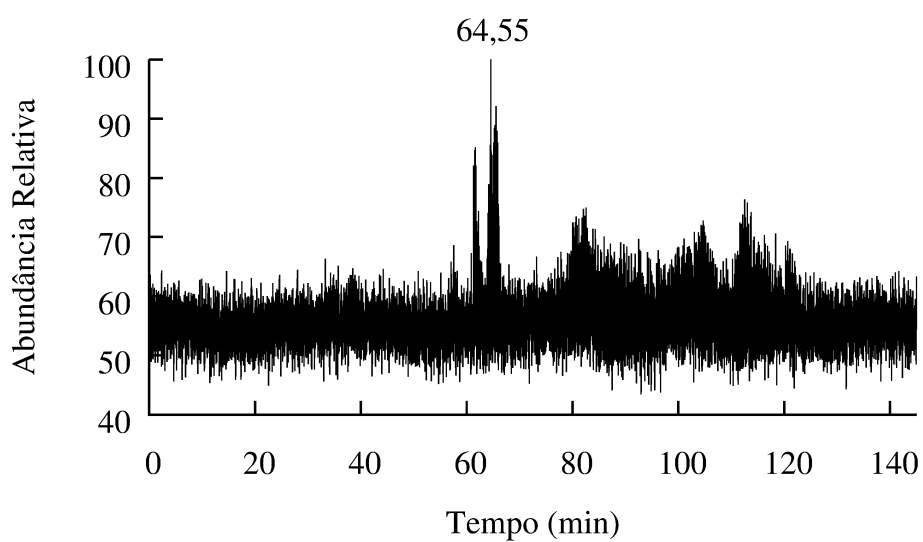


**Figura 17.** Cromatograma da Mioglobina sem DSS usando filtro de massa.

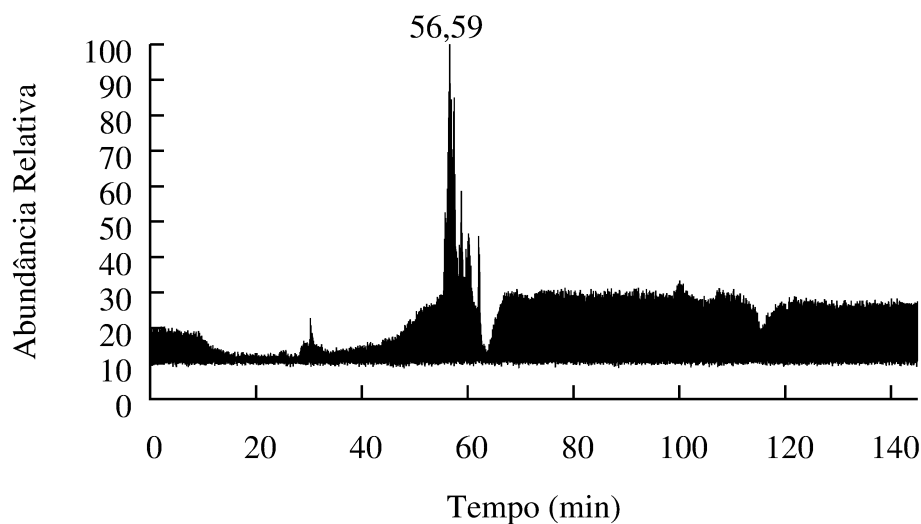
Nos experimentos entre MIO-DSS foram escolhidos os peptídeos mostrados na **Tabela 7**. Na **Figura 18** está apresentado o cromatograma MIO-DSS com banda de isolamento 2 *m/z* enquanto que na **Figura 19** está apresentado o cromatograma da MIO-DSS com banda de isolamento de 5 *m/z*. Diferente da Mioglobina sem DSS, os peptídeos selecionados da MIO-DSS não foram encontrados.

**Tabela 7.** Lista de peptídeos modificados da MIO-DSS.

Sequencia de Aminoácidos	<i>m/z</i>	Z
LFTGHPETLEKFDK	909,46	2
HGTVVLTALGGILKKKKGHHEAELKPLAQSHATK-NDIAAKYK	1510,51	3
ASEDLKKHGTVVLTALGGILKK-KKGHHEAELKPLAQSHATK	1509,19	3
FKHLK-IPIKYLEFISDAIIHVLHSHKHPGDFGADAQGAMTK	1543,82	3



**Figura 18.** Cromatograma da MIO-DSS com banda de isolamento de *m/z* 2.

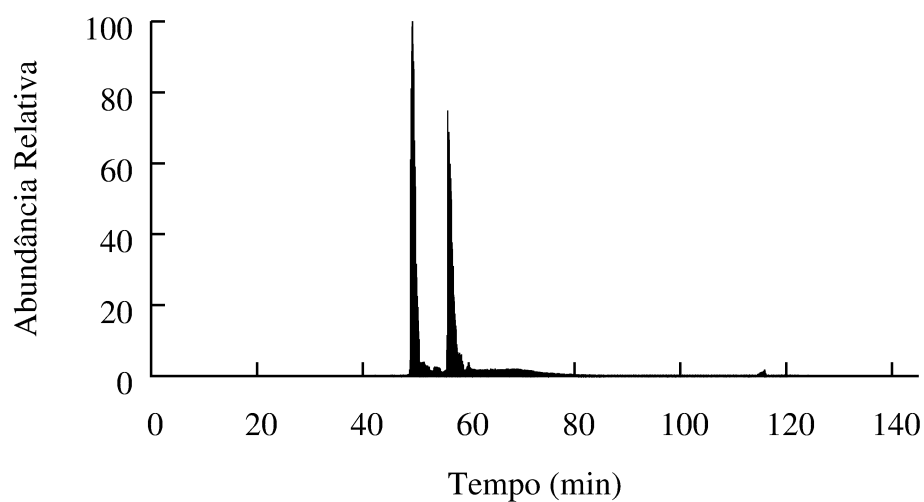


**Figura 19.** Cromatograma da MIO-DSS com banda de isolamento de  $m/z$  5.

A partir desses resultados foi modificado o modo de operação de aquisição de dados do MS, o qual foi operado no modo SIM/SRM. A **Tabela 8** mostra as transições escolhidas para a mioglobina sem DSS enquanto a **Figura 20** mostra o seu respectivo cromatograma. Na **Tabela 9** estão listadas as transições escolhidas para a MIO-DSS e na **Figura 21** está apresentado o seu respectivo cromatograma.

**Tabela 8.** Lista das transições da Mioglobina sem DSS.

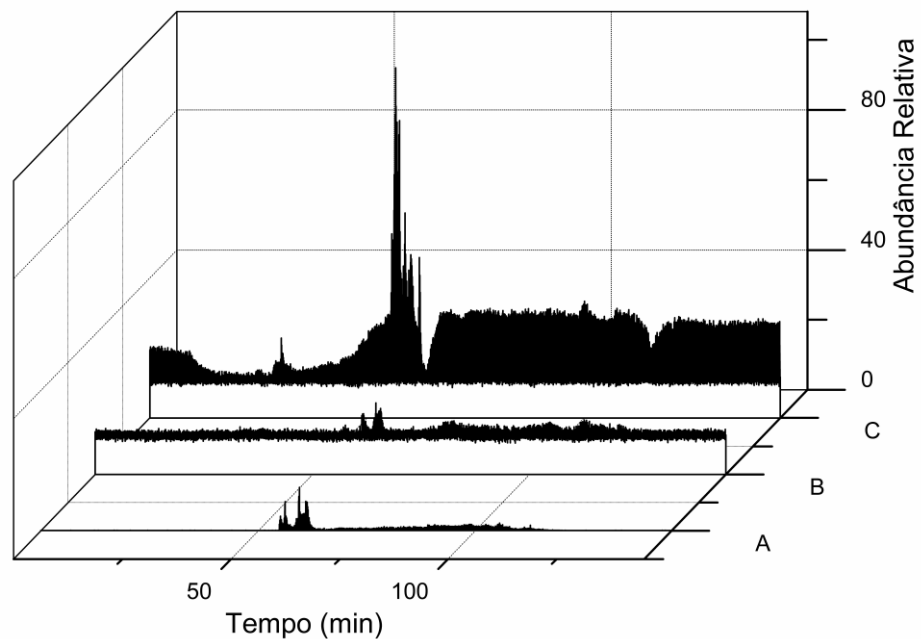
Sequência de aminoácidos	Transição	Erro (ppm)
HGTVVLTALGGILK	$P \rightarrow y_9^+$ ; $P \rightarrow y_{10}^+$ ; $P \rightarrow y_{12}^+$	8,0
LFTGHPETLEK	$P \rightarrow y_7^+$ ; $P \rightarrow y_8^+$ ; $P \rightarrow y_9^+$	8,1



**Figura 20.** Cromatograma da Mioglobina sem DSS no modo SIM/SRM.

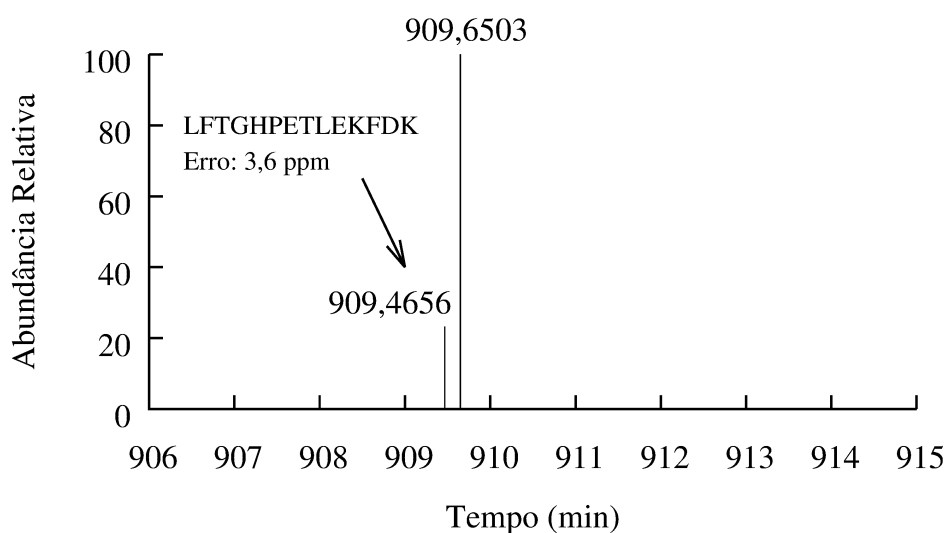
**Tabela 9.** Lista das transições da Mio-DSS.

Sequencia de aminoácido	Transições	Erro (ppm)
LFTGHPETLEKFDK	$P \rightarrow y_{3-dss}^+$ ;	0,02
	$P \rightarrow y_{4-dss}^+$	5,9



**Figura 21.** Cromatograma da MIO-DSS no modo SIM/SRM (A), cromatograma da MIO-DSS com filtro de massa com banda de isolamento de  $m/z$  2 (B), cromatograma da MIO-DSS com filtro de massa com banda de isolamento de  $m/z$  5 (C).

Experimentos de SIM/SRM geralmente são utilizados em métodos quantitativos de metabolitos ou de peptídeos alvos em proteômica quantitativa (HEREBIAN *et al.*, 2009; NATALIA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; ERVE *et al.*, 2009). O uso dessas metodologias combinadas possibilitou identificar os peptídeos modificados. Além disso, a metodologia SIM possibilitou confirmar a presença dos íons dos peptídeos modificados como mostra a **Figura 22** em uma faixa de erro de 3,6 ppm. Quando o íon foi fragmentado foi possível identificar qual resíduo de lisina continha a modificação como mostrado na **Tabela 9** com um erro menor que 0,02 ppm.



**Figura 22.** Íon isolado no modo SIM da MIO-DSS.

Como os peptídeos modificados se encontram em menor abundância em relação aos não modificados, o método de SIM possibilita monitorar o íon em um intervalo de  $m/z$  muito pequeno, geralmente uma unidade de massa, o que a torna mais sensível quando comparada a um experimento de varredura completa. O método de SRM torna o método mais específico, pois através desse monitora-se uma transição característica do analito, como por exemplo,  $m/z$  909,46 $\rightarrow$ 565,2873 ( $P \rightarrow y_{4-dss}^+$ ).

## 5.2 Expressão e purificação da enzima Enoil-ACP-redutase.

A expressão e purificação da InhA foi realizada conforme descrito por JACOBS *et al.* 1995. A partir de 5 g de célula obteve-se 7 mg de proteína homogênea.

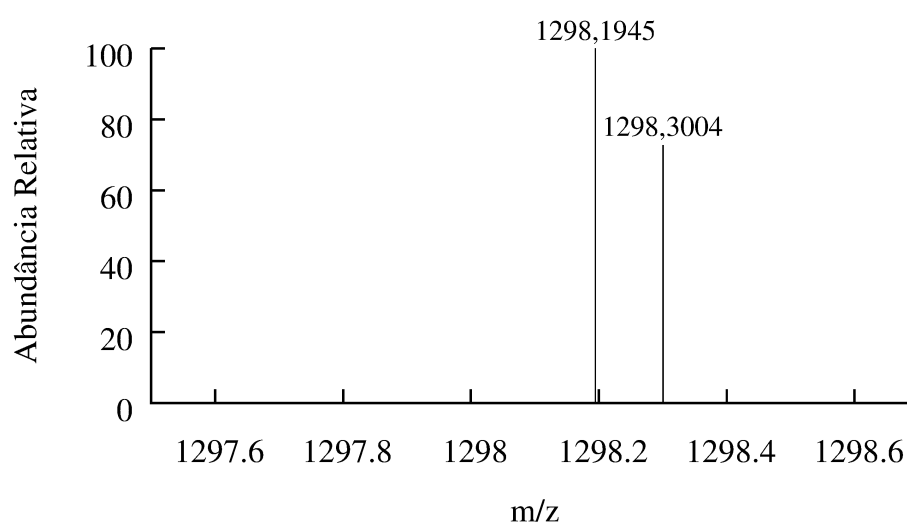
## 5.3 Caracterização das alterações estruturais da InhA com o uso de agentes de ligação cruzada.

A preparação da amostra foi a mesma descrita anteriormente para a mioglobina. A estequiometria da reação utilizada foi 1:100.

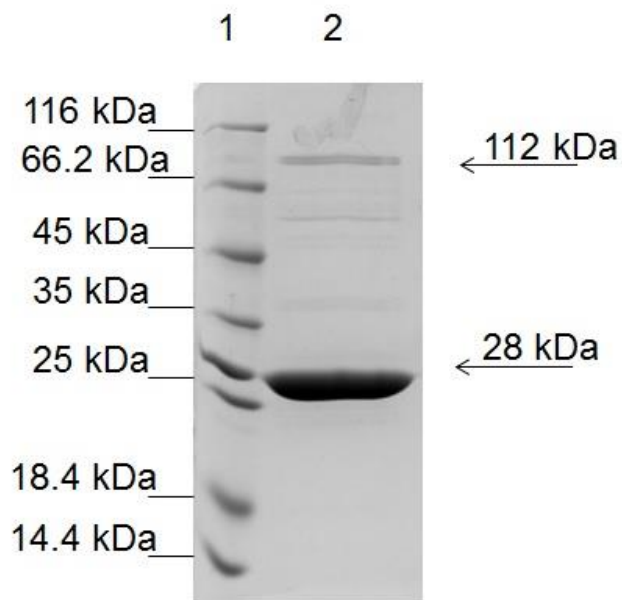


Em uma busca utilizando XQL foi encontrado o íon diagnóstico  $m/z$  239,1744 com um erro de 5 ppm, mas o íon precursor não correspondia a um peptídeo modificado. Analisando os dados de MS<sup>1</sup> foi encontrado o peptídeo modificado APIGWNMKDTPVA(K240)-TGLLDG(K8)R de  $m/z$  1298,1947 com estado de carga +2 e sem a metionina inicial. Com base no trabalho de NICOLE *et al.* 2007, o par de lisina que pode reagir com DSS é o K240-K8, que estão a uma distância de aproximadamente 9 Å e pertencem a subunidades diferentes do tetrâmero.

No experimento de SIM para InhA foi encontrado o íon de  $m/z$  1298,1945 com estado de carga +2 e que apresentou com um erro de 0,0077 ppm (**Figura 23**). Experimento de SDS-page (**Figura 24**) foi realizado para confirmar o estado oligomérico da InhA. Nesse experimento foi encontrado a forma tetramérica de aproximadamente 112 kDa com banda menos intensa que a forma monomérica. Esse resultado encontrado justifica-se pelo fato do DSS (agente de ligação cruzada utilizado) ser pouco solúvel quando comparado ao reagente utilizado por NICOLE *et al.* 2007, por isso esse resultado contrasta com o do autor, que encontrou a forma tetramérica com bandas mais intensas que a monomérica.



**Figura 23.** Íon de  $m/z$  1298,1945 obtido no modo SIM para a proteína InhA.



**Figura 24.** SDS-PAGE da InhA-DSS (canaleta 2). Na canaleta 1 o marcador de massa molecular.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análise de proteínas em solução através da técnica de espectrometria de massa permitiu combinada com agente de ligação cruzada DSS permitiu obter informações sobre a estrutura terciária da proteína enoil-ACP-redutase (InhA) de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os experimentos com a proteína alvo foram precedidos por uma otimização dos parâmetros utilizando a proteína mioglobina. Essa estrutura já é bem descrita na literatura e, portanto, pode ser utilizada como um controle nos experimentos com DSS.

Nos experimentos de *top-down* com a mioglobina, um dos passos importantes foi encontrar a melhor condição estequiométrica da reação para o isolamento dos íons. A melhor condição obtida foi a proporção 1:5 (enzima:DSS) onde foi encontrada apenas uma modificação por proteína; sendo uma do tipo *dead-end* e outra do tipo intermolecular/intramolecular. Nessas condições, quando o íon de interesse é isolado, a probabilidade de íons interferentes é menor. Como mostrado na **Tabela 2** foi possível identificar os íons fragmentos, todavia, não foi possível identificar qual lisina continha a modificação.

Na abordagem *bottom-up* foram testados diferentes proporções estequiométricas de reação. Importante destacar que a utilização da linguagem XQL para busca dos peptídeos modificados foi satisfatória e crucial para o aumento da sensibilidade e especificidade do experimento.

O desenvolvimento de um novo protocolo para busca e identificação de *cross-linkers* através da abordagem *bottom-up* acoplado a metodologia SIM/SRM foi realizada com sucesso, sendo esta técnica rápida, acurada e sensível. A simplicidade da metodologia a torna interessante, uma vez que, etapas de purificação de amostras não são necessárias facilitando a aplicação desse protocolo em triagens rápidas para determinação de parâmetros estruturais em proteínas de interesse. Com a aplicação do protocolo para o estudo da estrutura terciária da InhA foi possível identificar o peptídeo

APIGWNMKDATPVA(K240)-TGLLDG(K8)R com uma ligação cruzada do tipo intermolecular. Estudos sobre a InhA de *Mycobacterium tuberculosis* na presença de ligantes será realizado futuramente.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALANA, R. F. **Estudo teórico e experimental de proteômica estrutural por espectrometria de massa acoplada à ligação cruzada** . 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- AMADEU, H. Iglesias; SANTOS, Luiz Fernando; GOZZO, Fábio C. Identification of Cross-linked Peptides by High-Resolution Precursor Ion Scan. **Anal. Chem.**, v 82, p 909 – 916. 2010.
- AMADEU, H. I. **Utilização de espectroscopia de massas, ligação cruzada(cross-linking) e footprint no estudo de interações de proteína-proteína** . 2009. 152f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- AMARAL, Leonard. Thioridazine: an Old Neuroleptic effective against Totally Drug Resistant Tuberculosis . **Acta Med. Port.**, v 25(2), p.118-121. 2012.
- ANDRADE, Carolina Horta; PASQUALOTO, Kerly Fernanda Mesquita; ZAIM, Márcio Henrique; FERREIRA, Elizabeth Igne. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: Inibidores da InhA, enoil-ACP reductase do *M. tuberculosis* **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v 44, p. 167-179. 2008.
- ANTON, Luitzen de Jong; BACK, Jaap Willem; KOSTER, Chirs G. Chemical Cross-linking and Mass Spectrometry for Protein Structural Modeling. **J. Mol. Biol.**, v 331, p. 303–313. 2003.
- BASSO *et al.* Mechanisms of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Characterization of Enoyl Reductase Mutants Identified in Isoniazid-Resistente Clinical Isolates. **J. Infect. Dis.** v 178, p. 769 – 775. 1998.
- BASSO *et al.* The use of biodiversity as source of new chemical entites against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, an T-cell mediated diseases – A Review. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v 100, n 6, p.475-506. 2005.
- BRENOWITZ *et al.* Fast Fenton footprinting, Structural Mass Spectrometry of Proteins Using Hydroxyl Radical Based Protein Footprinting. **Nucl. Acids Res.**, v 34, n 6, p. 1 – 9. 2006.
- BROUSSY, Sylvain *et al.*  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR Characterization of pyridinium-tipe isoniazid-NAD adducts as possible inhibitors of InhA reductase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Org. Biomol. Chem.**, v 3, p. 670-673. 2005.
- BROWN, Katherine A. *et al.* Enzyme-catalyzed Mechanism of Isoniazid Activation in Class I and Class II Peroxidases. **J. Biol. Chem.**, v 279, p. 39000-39009. 2004.
- CEDRIC, E. Bobst *et al.* H/D Exchange and mass spectrometry in the studies of protein conformation and dynamic: Is there a need for a top-down approach? **Anal. Chem.**, v 81,p. 7892–7899. 2009.

- DESSEN, Andréa et al. Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of Mycobacterium tuberculosis. **Science**, v 267, p. 1638 – 1640. 1995.
- ERVI, John C. L. et al. Metabolite identification in rat brain microdialysates by direct infusion nanoelectrospray ionization after desalting on zip tip and LQT/Orbitrap mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v 23, p. 4003–4012. 2009.
- FENN, John B. et al. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v 246, n 4926, p. 64 – 71. 1998.
- FRANK, Aaron J. et al. Linear Ion traps in the mass spectrometry. **Mass Spec. Rev.**, v 24, p. 1–29. 2005.
- GOODLETT, David R. et al. Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry As a Low-Resolution protein structure determination technique. **Anal. Chem.**, v 82, p. 2636–2642. 2010.
- GOZZO, Fábio et al. Collision-Induced Dissociation of Lys-Lys Intramolecular Crosslinked Peptides. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v 20, p. 557 – 566. 2009.
- GROSS, Michael L. et al. Fast Photochemical Oxidation of Protein Footprints Faster than Protein Unfolding. **Anal. Chem.**, v 81, n 16, p. 6563–6571. 2009.
- HEREBIAN, D. et al. Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. **J. Sep. Sci.**, 32, 939–948. 2009.
- JACOBS, William R. et al. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in Mycobacterium tuberculosis . **Biochemistry**, v 34, p. 8235 – 41. 1995.
- JENNIFER, L. Jones et al. , Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model. **J. Am. Chem. Soc.**, v 118, p. 8365-8374. 1996.
- JONSSON, Suyu Liu et al. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. **Biochem. J.**, v 355 , p. 545 – 561. 2001.
- JOSEPH, D. Puglisi. The dance of domains. **Nature**, v 450, p. 1171-1172. 2007.
- KERBALE, Paul & VERKERK, Udo H. From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry. **Mass Spec. Rev.**, v 28, p. 898– 917. 2009.
- LIPINSKI, Chistopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v 46, p. 3–26. 2001.
- LUO, J. et al. An integrated chemical cross-linking and mass spectrometry approach to study protein complex architecture and function. **Mol. Cell. Proteomics**, v 11, n 2. 2012.

MA, Zhenkun et al. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **Lancet**, v 375, p. 2100 – 2109. 2010.

NATALIA, Y. T. et al Proteomic Analysis of DNA-Protein Cross-Linking by Antitumor Nitrogen Mustards. **Chem. Res. Toxicol.**, v 22(6), p.1151–1162. 2009.

NICOLE, A. Kruh et al. Probing mechanisms of resistance to the tuberculosis drug isoniazid: Conformational changes caused by inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Sci.**, v 16, p. 1617– 1627. 2007.

OLIVEIRA, Jaim S. et al. Slow-onset Inhibition of 2-trans-Enoyl-ACP (CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an Inorganic Complex. **Curr. Pharm. Design**, v 12, 2006.

PALMA, Mario Sérgio et al. Sequenciamento De Peptídeos Usando Espectrometria De Massas: Um Guia Prático. **Quim. Nova**, v 31, p. 669 – 675. 2008.

PAN, Yan et al. Protein folding mechanisms studied by pulsed oxidative labeling and mass spectrometry. **Curr. Opin. Struc. Biol.**, v 21, p. 634– 640. 2011.

PIERRE, Baldi et al. Development of a Novel Cross-Linking Strategy for Fast and Accurate Identification of Cross-linking Peptide of Protein Complex. **Mol. Cell. Proteomics**, v 10, p. 1–17. 2011.

PIETERS, Jean. *Mycobacterium tuberculosis* and Macrophage: Maintaining a Balance. **Cell Host Microbe**, v 3, p. 399 – 407. 2008.

PILAU, J. Eduardo. **Desenvolvimento metodológicos em proteômica estrutural por espectrometria de massa** . Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PORTO, Peterson. **Otimização da análise isotópica de UF6 utilizando-se a técnica de espectrometria de massas por quadrupolo** . 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

REID, E. Gavin et al. ‘Top-down’ characterization of site-directed mutagenesis products of *Staphylococcus aureus* dihydroneopterin aldolase by multistage tandem mass spectrometry in a linear quadrupole ion trap. **Analyst.**, v 131, p. 291–302. 2006.

RICHARD, A. Slayden & CLIFTON, E. Barry. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infec.**, v 2, p. 659 – 669. 2000.

RINNER, Oliver et al. Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics. **Mol. Cell. Proteomics**, v 9, p. 1634–1649. 2010.

- ROLAND, Reischl et al. Expanding the chemical cross-linking toolbox by the use of multiple proteases and enrichment by size exclusion chromatography. **Mol. Cell. Proteomics**, v 11, p. M111.014126. 2012.
- SINZ, Andrea & DIHAZI, Gry H. Mapping low-resolution three-dimensional protein structures using chemical cross-linking and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v 17, p. 2005–2014. 2003.
- SINZ, Andrea et al. Optimizing the enrichment of cross-linking products for mass spectrometry protein analysis. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v 26, p. 653–658. 2012.
- SINZ, Andrea. Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping threedimensional structures of proteins and protein complexes. **J. Mass Spectrom.**, v 38, p. 1225–1237. 2003.
- SOUZA, E.H.S. et al. Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferrate (III/II) complexes: a model system for the in vitro activation of thiamides anti-tuberculosis drugs. **J. Ino. Biochem.**, v 99, p. 368-375. 2005.
- STOCKS, B. B. et al. Mass spectrometry combined with oxidative labeling for exploring protein structure and folding. **Mass Spectrom. Rev.**, v 29, p. 651–667. 2010.
- VASCONSELOS, I. B. et al. The Mode of Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Wild-Type and Isoniazid-Resistant 2-Trans-Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes by An Inorganic Complex . **Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents**, v 7, p. 50-62. 2008.
- WHO. Global tuberculosis report. 2012.
- WILM , Matthias S. & MATTHIAS, Mann. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? **J. Mass Spectrom.**, Ion Processes , v 136, p. 167 – 180. 1994.
- XIN, Tong et al. Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry: H/D exchange, hydroxyl radical labeling, and related approaches . **J. Mass Spectrom.**, v 43, p. 1021–1036. 2008.
- ZHANG, N. R. et al. Quantification of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers – a different approach for analysis of biological samples. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v 23, p. 1085–1094. 2009.



## 8. ANEXO

### 8.1 PARTICIPAÇÕES EM OUTROS TRABALHOS

*Molash Chem* (2013) 144:1165–1170  
DOI 10.1007/s00706-013-0948-0

ORIGINAL PAPER

#### Ultrasound-assisted improvement of drug solubility: a simple and useful method for the formation of salts from 4-hydroxy-6-methyl-3-nitropyridin-2(1*H*)-one

Pablo Machado · Eduarda Ritter · Anderson J. B. dos Santos ·  
Christiano Ev Neves · Luiz A. Basso · Diógenes S. Santos

Received: 6 September 2012 / Accepted: 18 February 2013 / Published online: 3 April 2013  
© Springer Verlag Wien 2013

**Abstract** The low aqueous solubility of drug-like compounds has been described as one of the main problems causing the failure of new chemical entities in medicinal chemistry programmes. This paper describes our efforts to overcome lack of solubility and to produce a novel template protocol for forming salts of poorly soluble compounds. We prepared a series of 4-hydroxy-6-methyl-3-nitropyridin-2(1*H*)-one amine salts by using ultrasound irradiation. The poorly water-soluble molecule 4-hydroxy-6-methyl-3-nitropyridin-2(1*H*)-one was recently described as an inhibitor of the *Mycobacterium tuberculosis* orotate phosphoribosyltransferase enzyme. Salts of this molecule were prepared in 88–98 % yield from a mixture of 4-hydroxy-6-methyl-3-nitropyridin-2(1*H*)-one with primary and secondary amines (dimethylamine, diethylamine, dipropylamine, ethanolamine, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, D-threosinol, pyrrolidine and piperidine) after ultrasound irradiation. The main advantages of this method are a significant reduction in reaction times and the use of a renewable solvent as a reaction medium. Thus the compounds are obtained after irradiation for 8 min in ethanol.

**Keywords** Drug research · One-pot synthesis · Green chemistry · Amines

#### Introduction

Solubility is a key physicochemical property that needs to be controlled during drug development processes [1, 2]. The difficulty of solubilising compounds in aqueous conditions contributes to low dissolution rates that culminate in low bioavailability and weak in vivo pharmacological activity. Approximately one-third of the newly synthesised compounds in medicinal chemistry programmes have an aqueous solubility of less than 10 µg/cm<sup>3</sup> [3]. More alarming still is that 80–90 % of drug candidates in the R&D pipeline could fail because of solubility problems [2]. A major contributor to this problem arose specifically when combinatorial chemistry and high-throughput screening became popular in drug discovery and medicinal chemistry approaches in the mid-1990s [3]. These programmes produced new drug-like molecules that were screened for their biological activity using highly polar solvents, e.g. dimethyl sulfoxide (DMSO), and high-throughput screening approaches [3, 4]. Although this technology identifies molecules that bind strongly to drug targets, the use of these solvents results in drug-like molecules having remarkably low aqueous solubilities [3, 4]. In the past few years, one of the methods most used by medicinal chemists to improve in vitro activity has been the incorporation of appropriately positioned lipophilic groups [3]. Although this approach contributed to an increased entropy of binding, resulting from the favourable solvation entropy associated with hydrophobic groups [5], the properties of these new chemical entities were shifted towards higher molecular weights with decreased aqueous solubilities [6].

Aqueous solubility, together with membrane permeability, is a critical aspect of the oral bioavailability of new drug-like compounds [7]. In accordance with the Biopharmaceutical Classification System [8], solubility

P. Machado (✉) · E. Ritter · A. J. B. dos Santos · C. Ev Neves ·  
L. A. Basso · D. S. Santos (✉)  
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose,  
Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional,  
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular,  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil  
e-mail: pablo.machado@puors.br

D. S. Santos  
e-mail: diogenes@puors.br



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

Journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>

Short communication

## Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection

Valnês S. Rodrigues-Junior<sup>a,b,1</sup>, André dos Santos Junior<sup>a,c,1</sup>, Anderson Jader dos Santos<sup>a</sup>, Christopher Zandoná Schneider<sup>a</sup>, João B. Calixto<sup>d</sup>, Eduardo Henrique Silva Sousa<sup>e</sup>, Luiz Gonzaga de França Lopes<sup>e</sup>, André Arigony Souto<sup>f</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>a,b,c</sup>, Diógenes Santiago Santos<sup>a,b,c,\*</sup>, Maria M. Campos<sup>a,b,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681 – Prédio 92A Tecnopuc, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Laboratório de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>f</sup> Faculdade de Química, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>g</sup> Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 16 March 2012  
Accepted 29 April 2012

Keywords:  
Tuberculosis  
Drug development  
Pre-clinical test  
InhA inhibitor  
IQG-607  
*Mycobacterium tuberculosis*

### ABSTRACT

We have previously demonstrated a potent in vitro inhibitory activity for two pentacyano(isoniazid)ferrate(II) compounds, namely IQG-607 and IQG-639, against the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase enzyme. In this study, the activity of these compounds was evaluated using an in vivo murine model of tuberculosis. Swiss mice were infected with *M. tuberculosis* H37Rv strain and then IQG-607 or IQG-639 (250 mg/kg) was administered for 28 days or 56 days. In addition, a dose-response study was performed with IQG-607 at 5, 10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/kg. The activity of test compounds was compared with that of the positive control drug isoniazid (INH) (25 mg/kg). After 28 days or 56 days of treatment, both IQG-607 and INH significantly reduced *M. tuberculosis*-induced splenomegaly as well as significantly diminishing the colony-forming units in the spleen and lungs. IQG-607 and INH ameliorated the lung macroscopic aspect, reducing lung lesions to a similar extent. However, IQG-639 did not significantly modify any evaluated parameter. Experiments using early and late controls of infection revealed a bactericidal activity for IQG-607. IQG-607 might well represent a good candidate for clinical development as a new antimycobacterial agent.

© 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

### 1. Introduction

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains a major global health concern. According to the World Health Organization (WHO), TB was responsible for 1.3 million deaths in 2009 and currently represents the main cause of human death due to a single pathogen [1,2]. Increasing HIV–TB co-infections [2] as well as the emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant [1] and totally drug-resistant [3] strains

have increased the need for the development of new anti-TB drugs. Novel anti-TB drugs should be effective against resistant strains, decreasing the length of treatment, with a lower dose frequency, minimal drug–drug interactions and reduced toxicity [1]. Isoniazid (INH) is the most prescribed drug for active TB and prophylaxis. Its primary target is the *M. tuberculosis* 2-trans-enoyl-acyl carrier protein (CoA) reductase enzyme (InhA) [4]. INH is a pro-drug activated by the mycobacterial *katG*-encoded catalase–peroxidase enzyme in the presence of manganese ions, NAD(H) and oxygen [5].

Our group has described a new approach to the rational design of an INH analogue based on an inorganic group (a pentacyano-ferrate III/II) attached to the nitrogen atom of the heterocyclic ring of INH, which inhibits a validated target (InhA) [6]. The metal centre can promote an electron transfer reaction that mimics the in vitro activation of INH by the KatG enzyme [6]. Our group has also proved that this new compound, pentacyano(isoniazid)ferrate(II), named IQG-607 (Supplementary Fig. S1), does not require

\* Corresponding authors. Present address: Av. Ipiranga 6681, Tecnopuc, Prédio 92A, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3320 3629; fax: +55 51 3320 3629.

E-mail addresses: diogenes@pucrs.br (D.S. Santos), camposmartha@yahoo.com (M.M. Campos).

<sup>1</sup> These two authors contributed equally to this work.

## An Inorganic Complex that Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase as a Prototype of a New Class of Chemotherapeutic Agents to Treat Tuberculosis

Luiz A. Basso,<sup>\*,a,b</sup> Christopher Z. Schneider,<sup>a,b</sup> Anderson J. A. B. dos Santos,<sup>a,b</sup>  
André A. dos Santos Jr.,<sup>b,c</sup> Maria M. Campos,<sup>b,c</sup> André A. Souto<sup>a,b</sup> and Diógenes S. Santos<sup>\*,a,b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Tecnopuc, Prédio 92A,  
<sup>b</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), <sup>c</sup>Instituto de Toxicologia, Prédio 12,  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Partenon,  
90619-900 Porto Alegre - RS, Brazil

Descrevemos a atividade inibitória do IQG607, pentaciano(isoniazida)ferrato(II), frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* tanto resistentes quanto sensíveis à isoniazida, assim como a toxicidade oral e a adaptação da síntese química do IQG607 para reatores maiores. O IQG607 representa um potencial agente quimioterápico que inibe um alvo molecular definido.

Here we describe the inhibitory activity of IQG607, pentacyano(isoniazid)ferrate(II), on isoniazid-sensitive and isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, its oral toxicity, and efforts to adapt IQG607 synthesis to large chemical reactors. IQG607 represents a promising chemotherapeutic agent aiming at the inhibition of a validated and druggable molecular target.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, enoyl reductase, toxicology, large-scale synthesis, metallodrug

### Introduction

Tuberculosis (TB) remains the leading cause of mortality due to a bacterial pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>1</sup> In 2007, there were an estimated 9.27 million cases of TB, and 1.37 million (15%) were also HIV-positive patients, who are more likely to develop active TB.<sup>2</sup> Brazil ranks 14<sup>th</sup> in terms of the total number of incident cases amongst the high-burden countries.<sup>2</sup> There were an estimated 0.5 million cases of multidrug-resistant TB (MDR-TB), which is caused by strains resistant to, at least, isoniazid and rifampicin.<sup>2</sup> The emergence of extensively drug-resistant (XDR) TB cases, which are found in TB-infected patients whose isolates are MDR and also resistant to a fluoroquinolone and, at least, one second-line injectable agent,<sup>2,3</sup> its widespread distribution,<sup>4</sup> and unprecedented fatality rate,<sup>5</sup> raise the prospect of virtually incurable and deadly TB worldwide. The factors that most influence the emergence of drug-resistant strains include inappropriate treatment regimens and patient noncompliance in completing the prescribed

courses of therapy due to the lengthy standard “short-course” treatment (isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, and ethambutol or streptomycin for two months, followed by a combination of isoniazid and rifampicin for additional four months) or when the side effects become unbearable.<sup>6</sup> Moreover, no sustainable control of TB epidemic can be reached in any country without properly addressing this global public health problem, including research as a key component.<sup>7</sup> *M. tuberculosis* has been considered the world’s most successful pathogen, and this is largely due to the ability of the bacillus to persist in host tissues, where drugs that are rapidly bactericidal *in vitro* require prolonged administration to achieve comparable *in vivo* effects.<sup>8</sup> Hence, more effective and less toxic anti-tubercular agents are immediately needed to shorten the duration of current treatment, improve the treatment of drug-resistant TB, and to provide effective treatment of latent TB infection.

The modern approach in the development of new chemical entities (NCEs) against TB is based on the use of defined molecular targets. This involves (i) the search and identification of lead compounds with known molecular mechanisms against a specific target (e.g. enzymes from defined pathways), (ii) the analysis of compounds with a

\*e-mail: luiz.basso@pucrs.br, diogenes@pucrs.br