

Oxidação da lisozima por oxigênio molecular singlete: formação de *cross-linking* e proposta mecanística usando ¹⁸O-oxigênio e espectrometria de massas.

Emerson Finco Marques^{1,2} (PG)*, Marisa H. G. Medeiros² (PQ), Paolo Di Mascio^{1,2} (PQ)

marques@iq.usp.br

¹Departamento de Química Fundamental e ²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Palavras Chave: oxigênio singlete, *cross-linking*, lisozima, modificação em proteína, espectrometria de massa

Abstract

Lysozyme oxidation by singlet molecular oxygen: *cross-linking* formation and proposed mechanism using ¹⁸O labeling and mass spectrometry. Lysozyme was oxidized by singlet molecular oxygen (O₂ (¹Δ_g)) and *cross-linking* formation was investigated using mass spectroscopic approaches.

Introdução

O oxigênio singlete (O₂ (¹Δ_g)) corresponde a uma espécie eletronicamente excitada do oxigênio molecular e sua formação tem sido evidenciada em diferentes sistemas biológicos. O₂ (¹Δ_g) reage efetivamente com histidina (His), triptofano (Trp) metionina (Met), tirosina (Tyr) e cisteína (Cys)¹.

A oxidação desses amino ácidos pode levar a dimerização covalente e/ou oligodimerização descritas como *cross-linking*. Os efeitos biológicos do O₂ (¹Δ_g) tem sido investigado e sugerem o seu envolvimento na formação de *cross-links* em colágeno da pele², cristalino de lentes humanas³ e catarata⁴. Entretanto, não existem evidências da caracterização dos *cross-linking* formados.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a formação intermolecular de *cross-linking* após reação com O₂ (¹Δ_g) através de um método altamente sensível usando nano cromatografia e espectrometria de massas (nano-LC-nano-ESI-MS/MS) e experimentos com ¹⁸O-oxigênio marcado.

Resultados e Discussão

A lisozima (70 μM, tampão fosfato, D₂O, pH = 7.4) foi foto oxidada usando rosa bengala (RB) como fotossensibilizador. A oxidação da lisozima foi também investigada usando uma fonte limpa de geração de O₂ (¹Δ_g) através da termodecomposição do endoperóxido DHPN¹⁶[¹O₂] e DHPN¹⁸[¹O₂] em diferentes condições de pH (5.0, 7.4, 9.2 e 11.2).

A foto oxidação com RB e oxidação usando DHPN¹O₂ foram submetidas a analisadas por LC-MS e SDS-Page e apresentaram a formação de dimerização em 28 kDa. Estes dados demonstraram

simultaneamente a ocorrência de *cross-linking* após reação com O₂ (¹Δ_g). As bandas em 28 kDa foram cortadas e submetidas a digestão triptica e investigadas por UHR-nano-ESI-Q-TOF-LC-MS e os peptídeos foram sequenciados por MS/MS. Os *cross-links* identificados com a 2-oxo-His estão sumarizados na Tabela 1. Além disso, *cross-links* entre os Trp oxidados foram investigados e identificados.

Tabela 1. Formação dos *cross-linking* com a 2-oxo-Histidina.

Resíduo	Peptídeo	Carga <i>cross-linking</i>	¹⁶ [¹ O ₂]	¹⁸ [¹ O ₂]
			m/z	m/z
His ¹⁵	HGLDNYR	[(M+2H) ²⁺]	881.4073	882.4098
Lys ¹	KVFG	[(M+2H) ²⁺]	669.3346	670.3371
Lys ¹³	CELAAMK	[(M+3H) ³⁺]	594.2759	594.9437
Lys ¹⁵	CKGTDVQAWIR	[(M+3H) ³⁺]	741.0251	741.6932
Trp ⁶²	WWCNDGR	[(M+3H) ³⁺]	628.9335	630.2698
Trp ¹²³	CKGTDVQAWIR	[(M+3H) ³⁺]	742.3564	743.6933

Conclusões

Nossos estudos, envolvendo uma proteína modelo e a oxidação por O₂ (¹Δ_g), demonstraram a formação de um ligação covalente intermolecular entre a 2-oxo-histidina e histina (2-oxo-His-His), lisina (2-oxo-His-Lys), e triptofano oxidado (2-oxo-His-Trp[O]) e (Trp[O]-Trp[O]). Esses resultados evidenciam que O₂ (¹Δ_g) é um importante intermediário na formação de *cross-linking* em sistemas biológicos.

Agradecimentos

FAPES, FAPESP-CEPID Redoxoma, CNPq, USP-NAP

¹Davies, M.J.; *Biochem Biophys Res Commun.* **2003**, *305*, 761.

²Kakehashi, A.; Akiba, J.; N. Ueno, N.; Chakrabarti, B.; *Biochem Biophys Res Commun.* **1993**, *196*, 1440.

³Renston, R.H.; Jones, A.; Christiansen, W.D.; Hradek G. T.; *Science*, **1980**, *208*, 1278.

⁴Balasubramanian, D.; Du, X.; Zigler, J. S., Jr.; *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 761.