



Avaliação de Sistemas de Cromatografia Líquida Uni e Bidimensional Acoplados a Espectrometria de Massas na Análise do Proteoma dos Corpos Protéicos do Milho

Rogério de Campos Bicudo

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de Doutor em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. Lanças

São Carlos
2007

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese, primeiramente, a Deus. Dedico ainda, a toda minha família, em especial aos meus pais **Elias** e **Eliana** pelo apoio, incentivo, amor e exemplo de vida, a minha irmã **Tatiana** e a você, **Ana Paula**.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela constante presença em minha vida.
- A minha família, pelo apoio e incentivo.
- Agradeço especialmente a minha irmã, Tatiana, pelo companheirismo e pela ajuda no trabalho.
- A Ana Paula, pela paciência, carinho e amor.
- Ao meu "irmão" Fábio D. Vieira, pela amizade verdadeira.
- Ao Prof. Dr. Fernando M. Lanças, pela orientação, dedicação e confiança.
- Ao Dr. Colnago e a Dr^a Lucimara, pela parceria e pelas sugestões.
- Ao amigo José Carlos, pela inestimável ajuda e companheirismo.
- A todos os amigos, que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tese pudesse ser concluída.
- A Embrapa Instrumentação Agropecuária e a Embrapa Pecuária Sudeste, pelo fornecimento das amostras.
- Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (MAS-LNLS), por permitir a realização dos experimentos.
- Ao Laboratório de Cromatografia do IQSC/USP, pelo apoio institucional.
- A FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

<i>Capítulo I</i>	13
<i>Introdução</i>	13
1. Justificativas do Trabalho	14
1.1. Aspectos Gerais do Milho	14
1.2. Aprimoramento Nutricional	15
1.3. Proteoma dos Corpos Protéicos	17
2. Objetivos	19
3. Revisão da Literatura	20
3.1. As Proteínas	20
3.1.1. Por que estudar as proteínas?	20
3.1.2. Composição e estrutura das proteínas	21
3.2. Genoma e Proteoma	25
3.3. Proteômica	27
3.3.1. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D PAGE)	29
3.3.2. Cromatografia líquida (LC)	31
3.3.3. Cromatografia líquida de fase reversa (RP LC)	32
3.3.4. Cromatografia de troca iônica	35
3.3.5. Cromatografia líquida bidimensional	37
3.3.6. Espectrometria de massas	40
3.3.7. Ionização por "electrospray"	41
3.3.7. Analisadores de massas	46
3.3.8. Espectrometria de massas em "tandem"	49
3.3.9. Identificação de proteínas por espectrometria de massas	52
<i>Capítulo II</i>	58
<i>Parte Experimental</i>	58
1. LC-MS/MS	59
1.1. Preparação das Amostras	59
1.1.1. Reagentes	59
1.1.2. Obtenção dos corpos protéicos do milho	60
1.1.3. Digestão das proteínas	60
1.2. Equipamentos e Condições Experimentais	61
1.2.1. Cromatografia de fase reversa	61
1.2.2. Espectrometria de massas	63
1.3. Tratamento dos Dados	64
1.3.1. Pesquisa no banco de dados	64
1.3.2. Validação das identificações	65
2. LC/LC-MS/MS	66
2.1. Preparação das Amostras	66
2.2. Equipamentos e Condições Experimentais	67
2.2.1. Cromatografia de troca catiônica forte	67
2.2.2. Cromatografia de fase reversa	70
2.2.3. Espectrometria de massas	70
2.3. Tratamento dos Dados	70
2.3.1. Pesquisa no banco de dados	70
2.3.2. Validação das identificações	71
3. Esquema Geral	72

<i>Capítulo III</i>	74
<i>Resultados e Discussões</i>	74
1. LC-MS/MS	75
2. LC/LC-MS/MS	79
3. Comparação entre os Métodos LC-MS/MS e LC/LC-MS/MS	86
3.1. Número de Proteínas e Peptídeos Identificados	86
3.2. Qualidade do Espectro de MS/MS	88
3.3. Comparação de Parâmetros	90
4. Proteínas Identificadas	93
4.1. Zeínas	93
4.2. Seqüência das Proteínas Identificadas	94
4.3. Proteínas com mais de uma Identificação Potencial	101
<i>Capítulo IV</i>	102
<i>Conclusões</i>	102
<i>Capítulo V</i>	105
<i>Referências Bibliográficas</i>	105

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estágios do desenvolvimento dos corpos protéicos de milho. Inicialmente, essas organelas são formadas apenas pelas zeínas β e γ as quais permanecem na periferia das mesmas (A). Em seguida, há um acúmulo das zeínas α e δ na região central (B, C e D), provocando um aumento no diâmetro dessas estruturas (1-2μm).⁴</i>	14
<i>Figura 2: Fórmula estrutural geral de um aminoácido.</i>	21
<i>Figura 3: Os 20 aminoácidos mais comuns.</i>	22
<i>Figura 4: Formação da ligação peptídica (em vermelho) através da eliminação de uma molécula de água.</i>	23
<i>Figura 5: A sequência de aminoácidos da cadeia de polipeptídeos de uma proteína é chamada de estrutura primária. Diferentes regiões dessa sequência formam uma estrutura secundária regular local, como a hélice alfa (α) ou folha beta (β). A estrutura terciária é formada pelo empacotamento de tais elementos estruturais em uma ou várias unidades globulares compactas chamadas domínios. A proteína final pode conter várias cadeias de polipeptídeos organizadas em uma estrutura quaternária.²⁰</i>	24
<i>Figura 6: Formação da proteína. As células são as unidades fundamentais de funcionamento de todo sistema vivo; nelas estão os genes que possuem as instruções para a produção das proteínas.²³</i>	25
<i>Figura 7: Análise esquemática do proteoma. A entrada do sistema é o proteoma em toda sua complexidade. Proteínas e peptídeos são separados e analisados pelas ferramentas listadas. Os dados brutos, obtidos pela associação MS/MS, são posteriormente processados por um software para produção de informação a respeito da identidade das proteínas detectadas.³²</i>	28
<i>Figura 8: Metodologia usada para a realização da eletroforese bidimensional em gel de poli(acrilamida) (2D PAGE). Após a aplicação da amostra, o gel de poli(acrilamida) é submetido a um campo elétrico para separação bidimensional. Na primeira dimensão, a separação ocorre de acordo com os pontos isoelétricos das proteínas (focalização isoelétrica). Já na segunda dimensão, a separação se dá de acordo com suas massas moleculares. Em seguida, proteínas individuais são recortadas do gel e fragmentadas (com tripsina, por exemplo). Os peptídeos gerados da digestão enzimática são analisados por espectrometria de massas.³⁴</i>	30
<i>Figura 9: O polipeptídeo entra na coluna com a fase móvel. A parte hidrofóbica do polipeptídeo adsorve na superfície hidrofóbica da fase reversa e, ali permanece, até que a concentração de solvente orgânico atinja o valor crítico e desorva o polipeptídeo.</i>	34
<i>Figura 10: A retenção de moléculas pequenas, como a bifenil, diminui gradualmente a medida que a concentração de solvente orgânico aumenta, pois a bifenil é retida por partição. Já a retenção de polipeptídeos, como a lisozima, muda repentinamente e drasticamente quando a concentração de solvente orgânico atinge o valor crítico necessário para desorver o polipeptídeo.⁴⁷</i>	35
<i>Figura 11: Cadeias laterais básicas protonadas.</i>	37
<i>Figura 12: Separação de uma mistura de peptídeos por cromatografia de troca catiônica em linha com cromatografia de fase reversa.⁵³</i>	39
<i>Figura 13: Esquema de uma fonte de “electrospray” e do processo de formação do “spray”. A região I está sob pressão atmosférica, a região II, sob pressão intermediária e a região III, sob alto vácuo.^{54,58,59}</i>	42
<i>Figura 14: Esquema do processo de geração de micro gotas por “electrospray”. As setas brancas representam a evaporação do solvente, e o tempo indicado sobre elas é aquele necessário para a redução do diâmetro até o valor no qual ocorre a liberação das micro gotas (seta preta). O número, dentro das gotas maiores, indica a quantidade de cargas em excesso. Já o valor numérico ao lado das gotículas representa o número de cargas de cada uma delas. Portanto, o resultado da fissão é sempre uma gota principal e várias outras de menor tamanho. O esquema A, em amarelo, mostra que as gotas menores também sofrem o processo de fissão. Nesse esquema, há a geração de gotículas com diâmetro em torno de 6nm e com duas cargas em excesso. Tomando-se, como exemplo, o diâmetro de um íon sulfato hidratado que é da ordem de 0,4nm, pode-se perceber que as gotas já atingem o nível molecular, após poucas fissões. No esquema B, também em amarelo, é apresentado o processo de deformação e fissão de uma gota, com excesso de carga, numa região de alto campo elétrico. Em I, têm-se uma gota, com excesso de carga, que acabou de ser inserida em uma região com um campo elétrico. Já em II, a gota começa a se deformar e o excesso de carga, antes distribuído uniformemente sobre sua superfície, começa a se concentrar na direção estabelecida pelo campo. Em III, observa-se uma significativa deformação da região da gota de maior densidade de carga. Finalmente, em IV, há o aumento da deformação e a conseqüente liberação das gotículas, que possuem maior densidade de carga que a gota original. O tempo que decorre até a produção dos íons, na fase gasosa, é da ordem de microssegundos.^{54,59,60}</i>	44

Figura 15: Esquema de um filtro de massas quadrupolar. Os íons entram e viajam na direção z enquanto oscilam no plano x-y. Tal oscilação é controlada pelos potenciais DC (U) e RF (V) aplicados em cada par de barras. Somente atravessarão o quadrupolo e serão detectados, os íons que tiverem trajetórias estáveis sob os valores de U e V aplicados. ⁶³ 48

Figura 16: Diagrama esquemático de um analisador de massas do tipo TOF. ³⁶ 49

Figura 17: Diagrama esquemático do funcionamento básico de um triplo quadrupolo. Inicialmente, com o uso do primeiro quadrupolo (Q1), faz-se uma varredura de todos os íons existentes na amostra. Em seguida, um íon da primeira varredura é selecionado. Após isso, o primeiro quadrupolo permite que apenas o íon escolhido entre na cela de colisão (q2). Na cela, tal íon é fragmentado mediante colisão com gás (em geral, argônio ou até mesmo ar). Finalmente, o segundo quadrupolo (Q3) faz a varredura dos íons (chamados de íons filhos) gerados pela colisão com o gás. 50

Figura 18: Esquema do espectrômetro de massas comercial Q-TOF, da Waters/Micromass. Seu funcionamento é similar ao funcionamento básico do triplo quadrupolo, descrito na Figura 17. A diferença reside no fato de que, no Q-TOF, é no analisador do tipo tempo de voo que ocorre a separação dos íons, gerados pela colisão com o gás. 51

Figura 19: Foto (A) e esquemas representativos (B e C) do sistema cromatográfico “capLC”, acoplado ao espectrômetro de massas, da Waters/Micromass. ⁶⁷ (B) A válvula se encontra na posição de lavagem da amostra, a qual está retida na pré-coluna. (C) A válvula se encontra na posição de análise. A fase móvel empregada nas análises cromatográficas foi: A – Água/0,1%Ácido Fórmico, B – Acetonitrila/0,1%Ácido Fórmico e C – Água. O volume de injeção foi de 6,4µl e o fluxo na coluna analítica foi de 200nl/min. As colunas cromatográficas, de modelo Waters Symmetry 300, tiveram as seguintes especificações: pré-coluna de fase reversa (C₁₈) - 5mmx0,350mm e d_p (diâmetro das partículas) de 5µm; coluna analítica de fase reversa (C₁₈) - 150mmx0,075mm e d_p (diâmetro das partículas) de 3µm. Utilizou-se o seguinte gradiente: 10min – 10%B, 70min – 45%B, 80min – 60%B, 85min – 10%B; a etapa de lavagem da amostra com o solvente C, a 10µl/min, durou 10 minutos. 62

Figura 20: Esquema representativo do sistema “on-line” de LC-MS/MS. ⁶⁷ O sistema capLC (A), com a válvula na posição de análise, está diretamente acoplado ao espectrômetro de massas do tipo ESI-Q/TOF (B). As análises por espectrometria de massas foram feitas no modo positivo usando os seguintes parâmetros: voltagem do cone 35V, voltagem do capilar 3500V, temperatura da fonte 100°C, varredura (modo MS) 200-2500 (m/z) e varredura (modo MS/MS) 50-4000 (m/z). O espectrômetro foi operado no modo DDA (“Data Direct Analysis”) segundo o qual os peptídeos foram selecionados automaticamente para o modo MS/MS baseado na carga (+2, +3 e +4) e na intensidade (os três íons mais intensos detectados no modo MS). Empregou-se argônio como gás de colisão. 63

Figura 21: Esquema geral resumido das análises realizadas. 73

Figura 22: Cromatogramas (BPI) dos peptídeos selecionados para o modo MS/MS; as funções 2, 3 e 4 são as responsáveis pela seleção automática dos peptídeos, para o modo MS/MS, com base na carga (+2, +3 e +4) e na intensidade (os três íons mais intensos detectados no modo MS - função 1). Os peptídeos são derivados das proteínas, digeridas com tripsina, dos corpos protéicos do milho BR 473. 76

Figura 23: Cromatograma de SCX com indicação das sete frações produzidas da amostra de peptídeos dos corpos protéicos digeridos do milho BR 473. Para cada fração são mostrados os cromatogramas (BPI) dos peptídeos selecionados para o modo MS/MS do espectrômetro de massas. 80

Figura 24: Número de proteínas identificadas em cada um dos dois métodos empregados: LC-MS/MS e LC/LC-MS/MS. No método LC-MS/MS, foram identificadas 6 proteínas no total sendo que 5 delas também foram identificadas no outro método. Já no método LC/LC-MS/MS, foram identificadas 16 proteínas no total. A área de interseção dos círculos indica o número de proteínas identificadas comuns nos dois métodos. No total, foram identificadas 17 proteínas únicas considerando-se ambos os métodos. 86

Figura 25: Número de peptídeos identificados em cada um dos dois métodos empregados: LC-MS/MS e LC/LC-MS/MS. No método LC-MS/MS, foram identificados 19 peptídeos no total sendo que 17 deles também foram identificados no outro método. Já no método LC/LC-MS/MS, foram identificados 55 peptídeos no total. A área de interseção dos círculos indica o número de peptídeos identificados comuns nos dois métodos. No total, foram identificados 57 peptídeos únicos considerando-se ambos os métodos. 87

Figura 26: Comparação entre os espectros de MS/MS, do peptídeo “K.DVYDQVAFVK.I” de m/z 689,27 (2+), gerados pelos métodos de LC-MS/MS e LC/LC-MS/MS. 89

Figura 27: Comparação entre os métodos LC-MS/MS e LC/LC-MS/MS, considerando-se os valores normalizados, para todas as proteínas identificadas, dos seguintes parâmetros: o “score”, a porcentagem de cobertura da proteína (%CP) e o número de íons “b” e “y” (b+y). 91

Figura 28: Contribuição de cada proteína única identificada, pelos métodos de LC-MS/MS e LC/LC-MS/MS, para o alto conteúdo de lisina e triptofano da variedade de milho BR 473. 100

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Superioridade nutricional da variedade de milho BR 473 em relação ao milho comum¹⁵</i>	17
<i>Tabela 2: Peptídeos com a mesma razão massa/carga (para carga igual a um), mas com seqüência de aminoácidos e fonte de origem diferentes⁵³</i>	55
<i>Tabela 3: Algumas ferramentas (softwares), que usam dados de espectrometria de massas, para identificação de proteínas via pesquisa em banco de dados⁶⁴</i>	57
<i>Tabela 4: Reagentes utilizados na parte experimental</i>	59
<i>Tabela 5: Parâmetros empregados para a pesquisa no banco de dados do NCBI, com o uso do “software” Mascot, utilizando os dados resultantes das análises por LC-MS/MS</i>	64
<i>Tabela 6: Especificações do cromatógrafo líquido “2796 Alliance Bio”, da empresa Waters⁶⁷, usado para as análises de cromatografia de troca catiônica forte</i>	67
<i>Tabela 7: Gradiente usado para a análise, por SCX, do digerido protéico da variedade de milho BR 473</i>	68
<i>Tabela 8: Reagrupamento das frações geradas pela cromatografia de troca catiônica forte e respectivos intervalos de tempo</i>	69
<i>Tabela 9: Parâmetros empregados para a pesquisa no banco de dados do NCBI, com o uso do “software” Mascot, utilizando os dados resultantes das análises por LC/LC-MS/MS</i>	71
<i>Tabela 10: Informações sobre as proteínas identificadas, da variedade de milho BR 473, usando o método de LC-MS/MS</i>	77
<i>Tabela 11: Informações sobre as proteínas identificadas, da variedade de milho BR 473, usando o método de LC/LC-MS/MS</i>	81
<i>Tabela 12: Aminoácidos que compõem as 17 proteínas únicas identificadas pelos métodos de LC-MS/MS e LC/LC-MS/MS. Nos casos em que houve mais de uma identificação potencial (adenine nucleotide translocator, eEF1A e GAPC3/GAPC4), segundo a Tabela 11, foi considerada apenas uma (gil22162, gil1321656 e gil6166167, respectivamente), devido a grande semelhança de seqüência entre elas. Abreviatura: N^oAA – número de aminoácidos</i>	95

LISTA DE ABREVIATURAS

eEF1A: "alpha subunit of translation elongation factor 1"

ESI: "electrospray ionization"

ESI-Q/TOF: "electrospray ionization - quadrupole/time of flight"

(espectrometria de massas seqüencial com ionização do tipo electrospray e analisadores de massas do tipo quadrupolo e tempo de vôo)

LC: "liquid chromatography"

LC/LC: "liquid chromatography/liquid chromatography" (cromatografia líquida bidimensional)

LC/LC-MS/MS: "liquid chromatography/liquid chromatography - mass spectrometry/mass spectrometry" (acoplamento entre cromatografia líquida bidimensional e espectrometria de massas seqüencial)

LC-MS/MS: "liquid chromatography - mass spectrometry/mass spectrometry" (acoplamento entre cromatografia líquida unidimensional e espectrometria de massas seqüencial)

MS: "mass spectrometry"

MS/MS: "mass spectrometry/mass spectrometry" (espectrometria de massas seqüencial)

NCBI: "national center for biotechnology information"

Q: "quadrupole"

QPM: "quality protein maize"

Q/TOF: "quadrupole/time of flight" (acoplamento entre os analisadores de massas quadrupolo e tempo de vôo)

RP LC: "reversed phase liquid chromatography"

SCX: "strong cation exchange"

TOF: "time of flight"

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

