

INVESTIGAÇÃO DOS PRODUTOS FORMADOS PELA REAÇÃO DE METIONINA ISOLADA OU INCORPORADA EM PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS E OXIGÊNIO SINGLETE

Rafaela Oliveira Nascimento, Fernanda Manso Prado, Paolo Di Mascio, Graziella Eliza Ronsein

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química - USP

nrafaelaoliveira@usp.br

Objetivos

O aminoácido metionina (Met) é um dos principais alvos de oxidantes no meio biológico. A maioria dos oxidantes reage com Met formando somente sulfóxido de metionina. Porém, a oxidação de metionina por ácidos hipohalosos (HOCl e HOBr) pode levar também a formação de dehidrometionina (DHM), sugerida anteriormente como biomarcador de estresse oxidativo gerado por esses oxidantes [1]. Entretanto, DHM também pode ser formada via oxidação de Met por oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), por mecanismos dependentes do pH [2]. O projeto tem como objetivo identificar os produtos de oxidação de Met gerados por esses oxidantes, a fim de comparar os rendimentos de DHM em peptídeos e proteínas nos dois casos. Além disso, esse projeto deseja determinar os mecanismos da oxidação de metionina por $^1\text{O}_2$.

Métodos e Procedimentos

Os produtos de oxidação de Met-Ala-Ser (MAS) e proteína ubiquitina (com Met no N-terminal) foram analisados por HPLC/MS/MS, comparando os rendimentos de DHM nas reações com ácidos hipohalosos e com $^1\text{O}_2$. Os mecanismos de oxidação de metionina com $^1\text{O}_2$ foram estudados a partir da fotooxidação do aminoácido em H_2^{18}O . Como os rendimentos e mecanismos dependem do pH da reação, esses foram avaliados em diferentes pHs, pH 5 (tampão citrato), pH 7,4 (tampões fosfato e MOPS), e pH 9,2 (tampão carbonato). Os experimentos em H_2^{18}O também foram

avaliados em pH 9 (tampão glicina), e pH 9, 10 e 11 em tampão CAPS.

Resultados

A formação de DHM foi identificada no peptídeo MAS nas reações com ácidos hipohalosos e $^1\text{O}_2$. O rendimento de DHM aumentou com o pH. Com relação ao oxidante analisado, em geral HOCl apresentou menores rendimentos de DHM, enquanto os maiores foram observados nas reações com HOBr e com $^1\text{O}_2$, sendo que esses apresentaram rendimentos próximos. A presença de DHM também foi identificada após oxidação da proteína ubiquitina, tanto a partir de ácidos hipohalosos como a partir de $^1\text{O}_2$. Para a investigação do mecanismo da reação, demonstrou-se que a fotooxidação de metionina em H_2^{18}O gerou tanto sulfóxido de metionina marcado como não marcado isotopicamente. Desta forma, propõe-se que a reação de $^1\text{O}_2$ com metionina em H_2^{18}O leva a formação inicial de um intermediário persulfóxido, que pode ser atacado por outra molécula de metionina (favorecido em pHs mais baixos), gerando duas moléculas de sulfóxido de metionina não marcadas, ou atacada por íons $^{18}\text{OH}^-$ (favorecido pelo aumento do pH), levando a geração de um sulfóxido de metionina marcado e H_2O_2 . De acordo com estes mecanismos, os menores rendimentos de sulfóxido marcado foram observados em pH 5, e maiores rendimentos foram observados com aumento do pH, segundo mecanismo proposto na figura 1.

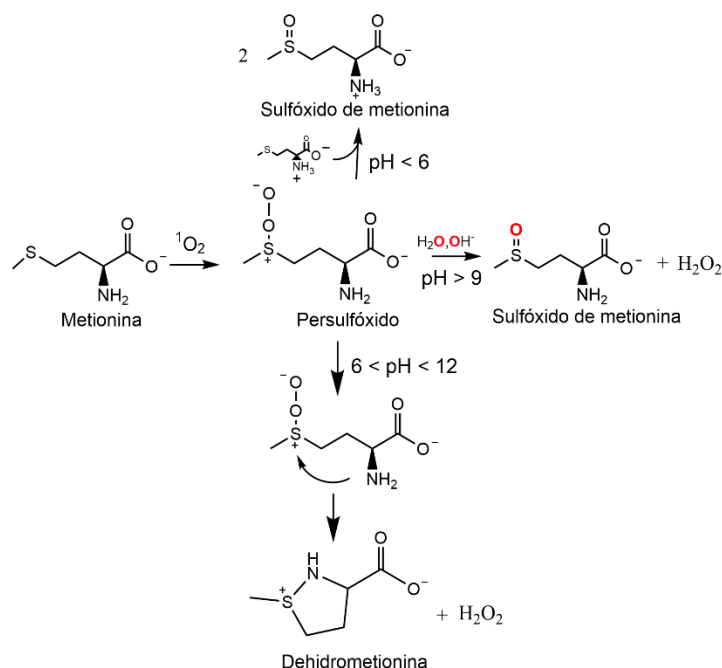


Figura 1- Mecanismos propostos para a oxidação de metionina por oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

Conclusões

A formação de DHM pode ser detectada nas reações com ácidos hipohalosos e $^1\text{O}_2$ em peptídeos e proteínas contendo metionina no N-terminal. O rendimento de DHM com $^1\text{O}_2$ foi próximo do observado com HOBr e maior que com HOCl. Esses resultados indicam que $^1\text{O}_2$ também é um potencial gerador de DHM em meio biológico. Foi possível concluir também que o mecanismo de oxidação de metionina com $^1\text{O}_2$ pode seguir por diferentes mecanismos e que dependem do pH em que a reação ocorre. Em seguida, deseja-se analisar se DHM também é formada com proteínas presentes em neutrófilos e eosinófilos, potenciais geradores desses oxidantes.

Referências Bibliográficas

1-PESKIN, A. V. et al. Oxidation of methionine to dehydromethionine by reactive halogen species generated by neutrophils. *Biochemistry*, 48(42), 10175–10182, 2009.

2-SYSAK, P. K.; FOOTE, C. S.; CHING, Ta-Yen. Chemistry of singlet oxygen—XXV. Photooxygenation of methionine. *Photochemistry and Photobiology*, v. 26, n. 1, p. 19-27, 1977.