



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

---

Estudo da dinâmica conformacional das enzimas Chiquimato  
Quinase e 5-enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (EPSPS) de  
*Mycobacterium tuberculosis* através do monitoramento da troca  
isotópica hidrogênio/deutério por espectrometria de massas ESI

**MAURÍCIO RIBEIRO MARQUES**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
do Campus de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,  
para obtenção do título de doutor em  
Ciências Biológicas (Área de Concentração:  
Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro**  
**Estado de São Paulo - Brasil**  
**Fevereiro - 2007**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

---

Estudo da dinâmica conformacional das enzimas Chiquimato  
Quinase e 5-enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (EPSPS) de  
*Mycobacterium tuberculosis* através do monitoramento da troca  
isotópica hidrogênio/deutério por espectrometria de massas ESI

**MAURÍCIO RIBEIRO MARQUES**

**Orientador: Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
do Campus de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,  
para obtenção do título de doutor em  
Ciências Biológicas (Área de Concentração:  
Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro**  
**Estado de São Paulo - Brasil**  
**Fevereiro - 2007**

## *Agradecimentos*

*A Deus, por me dar força e  
coragem para ultrapassar todos os  
obstáculos e, assim, conseguir  
realizar meu sonho.*

*A minha mãe Elizabeth  
pelo caráter e pelos exemplos de coragem,  
de força, de humildade, de perseverança  
e, principalmente, amor.*

*Ao meu irmão Marcelo, ao meu  
sobrinho Gustavo e à minhas  
duas irmãs Eva Maria e Mariana*

*A minha esposa Keity, por todo apoio, ajuda,  
companheirismo, respeito e amor*

*À toda a minha família e aos meus grandes amigos, pelo incentivo  
para que eu seguisse por este caminho e pela torcida para a  
realização de meus projetos*

## **Um homem...**

*Que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida...*

*Que sempre meu deu os maiores exemplos de caráter, humildade, bondade, perseverança,  
honra, sabedoria, amor, enfim...*

*Que sempre me mostrou os melhores caminhos...*

*Que sempre, tenho certeza, está e estará ao meu lado...*

*A você pai, dedico esse trabalho. Muito obrigado por todo o seu apoio, por toda a sua força, por toda a sua amizade, por todo seu amor, por todo seu esforço para que esse meu objetivo pudesse ser alcançado. No momento em que escrevo esse texto, as lágrimas vêm a tona, não de tristeza, mas de alegria, por saber que consegui cumprir com esse objetivo e assim honrar toda a sua dedicação. Hoje, não ter você fisicamente presente é muito difícil, mas tenho certeza que você sempre está e estará comigo, me auxiliando, me guiando, enfim...*

*Por tudo pai, eu lhe agradeço. É difícil expressar todo esse agradecimento em palavras, mas acredito que uma pequena expressão pode resumir tudo...*

**Eu te amo,**

Maurício Ribeiro Marques

Ao meu pai Braz Marques Roque, *in memoriam*

*A Deus por ter possibilitado a realização deste trabalho.*

*Ao Professor Dr. Mario Sergio Palma pela oportunidade que me foi concedida, por sua valiosa orientação, dedicação, pelos conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho, pelo empenho, esforço para que este trabalho pudesse ser realizado e pela sua amizade.*

*Aos meus pais Braz e Elizabeth, pelo apoio, incentivo, por estimularem meu trabalho e entenderem minha ausência em vários momentos. Este trabalho é dedicado também à vocês.*

*Ao meu irmão Marcelo, à minha cunhada Rose, ao meu sobrinho Gustavo Henrique e às minhas irmãs Eva Maria e Mariana, pelo companheirismo, apoio e por toda felicidade que me proporcionam.*

*À minha esposa Keity, pelos momentos de felicidade, pela ajuda, pelo carinho, amor e apoio em todos os momentos.*

*À minha nova família, Michel, Edna, Kelly e Ricardo, pela alegria.*

*À amiga Maria Anita Mendes, pelo auxílio no aprendizado em técnicas de espectrometria de massas.*

*Aos professores Dr. Diógenes Santiago dos Santos e Luiz Augusto Basso, da PUC-RS, pelo fornecimento do material biológico utilizado nesse trabalho.*

*Ao prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Junior, por me dar a oportunidade de aprendizado em técnicas de modelagem molecular.*

*Aos estudantes e amigos Henrique Pereira, Nelson, Helen, Marcio e Julio, do laboratório de sistemas biomoleculares da Unesp de São José do Rio Preto, pela ajuda no tratamento dos resultados apresentados nesse trabalho.*

*Aos professores João Ruggiero Neto e Marcelo Andrés Fossy, do departamento de física da unesp de São José do Rio Preto, pelas análises de dicroísmo circular.*

*Aos meus amigos de laboratório LÍlian, Lucilene, Bibiana, Fernada, Alessandra, Nicoli, Daniel, Paulo, Virgínia, Beto, Nathália, Taty, Luiz, Meire e Roberta, pelo apoio, colaboração e companheirismo em todos os momentos.*

*Aos professores do curso de graduação em Biologia e pós graduação em Biologia Celular e Molecular, pelos ensinamentos.*

*Ao Senhor Relator deste projeto junto à FAPESP, pelas sugestões e críticas para que este trabalho crescesse e amadurecesse. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.*

*E a todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram relacionadas para que este trabalho pudesse ser concretizado.*

*Muito obrigado*

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. RESUMO.....  | 1  |
| 2. ABSTRACT.....  | 3  |
| 3. INTRODUÇÃO.....  | 5  |
| 4. REVISÃO DA LITERATURA.....   | 9  |
| 4.1. Técnica de troca isotópica Hidrogênio / Deutério acoplada à espectrometria de massas electrospray..... | 9  |
| 4.2. A tuberculose como alvo importante para o estudo de novas drogas antimicrobianas.....                  | 17 |
| 5. OBJETIVOS.....   | 25 |
| 6. MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 27 |
| 6.1. Materiais.....   | 27 |
| 6.1.1. Espectrometria de massas ESI.....  | 27 |
| 6.1.2. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....  | 28 |
| 6.1.3. Outros equipamentos.....   | 28 |
| 6.1.4. Drogas e reagentes.....  | 28 |
| 6.2. Métodos.....   | 29 |
| 6.2.1. Obtenção da enzima EPSPS de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                                  | 29 |
| 6.2.2. Obtenção da enzima Chiquimato Quinase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....                     | 31 |
| 6.2.3. Troca isotópica Hidrogênio / Deutério (H/D).....   | 34 |
| 6.2.4. Análise da proteína intacta: avaliação da extensão total das trocas H/D.....                         | 34 |
| 6.2.5. Análise dos peptídeos gerados pela digestão péptica.....   | 35 |
| 6.2.6. Dicroísmo circular.....  | 36 |
| 6.2.7. Cálculo da Área Acessível ao Solvente e do número de Pontes de Hidrogênio..                          | 38 |
| 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 38 |
| 7.1. Enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) na presença de glifosato.                     | 38 |
| 7.1.1. Troca Hidrogênio / Deutério (H/D) e alterações conformacionais.....                                  | 42 |
| 7.1.1.1. Troca H/D na enzima Mt EPSPS intacta.....  | 42 |
| 7.1.1.2. Troca H/D em fragmentos pépticos.....  | 47 |

|   |     |
|---|-----|
| 7.1.2. Dicroísmo circular.....  | 58  |
| 7.2. Enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato Sintase em presença de fosfoenolpiruvato                    | 60  |
| 7.2.1. Troca Hidrogênio / Deutério (H/D) e alterações conformacionais. ....                               | 60  |
| 7.2.1.1. Troca H/D na enzima MtEPSPS intacta .....  | 60  |
| 7.2.1.2 Troca H/D em fragmentos pépsicos.....   | 65  |
| 7.3. Enzima Chiquimato Quinase em presença e ausência de Ácido Chiquímico, Cloreto de Magnésio e ADP..... | 72  |
| 7.3.1. Troca Hidrogênio / Deutério (H/D) e alterações conformacionais. ....                               | 76  |
| 7.3.1.1. Troca H/D na enzima Chiquimato Quinase intacta .....   | 77  |
| 7.3.1.2. Troca H/D em fragmentos pépsicos.....  | 81  |
| 8. CONCLUSÃO.....   | 90  |
| 9. BIBLIOGRAFIA.....  | 92  |
| 10. APÊNDICE.....   | 107 |



## 1. RESUMO

Hoje em dia, em todo o mundo, existem algumas doenças responsáveis por uma grande taxa de mortalidade em humanos. Dentre essas doenças, pode-se destacar a tuberculose, infecção provocada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, que é a principal causa de morte em humanos devido a um único agente infeccioso. Dentre as prioridades para o combate à tuberculose, o desenvolvimento de novas drogas é premente para o desenvolvimento de um tratamento quimioterápico eficaz.

Sob este aspecto, as enzimas da via do ácido chiquímico, representam bons exemplos da utilidade de tal abordagem aplicada a constituintes enzimáticos de uma rota metabólica. A via do ácido chiquímico é responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos, do ácido *p*-aminobenzóico e outros metabólitos essenciais, tais como ubiquinona, menaquinona e vitamina K. A via do chiquimato, encontrada em plantas, algas,

fungos e bactérias, foi também encontrada recentemente em vários parasitas apicomplexos (Roberts et al.; 1998); entretanto, essa via metabólica não é encontrada em mamíferos. As enzimas Chiquimato Quinase e 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (EPSPS), a quinta e a sexta enzimas, respectivamente, nessa via metabólica, têm sido reconhecidas como alvos importantes para o desenvolvimento de herbicidas e drogas antibióticas.

No presente estudo, a troca isotópica Hidrogênio / Deutério e a espectrometria de massas com ionização electrospray foram usadas para examinar as mudanças conformacionais em solução, sofridas pelas enzimas Chiquimato Quinase e 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (EPSPS) de *Mycobacterium tuberculosis*, tanto na presença como na ausência de alguns de seus ligantes.

A incorporação de deutério foi observada para ambas as enzimas. Para a EPSPS, a apoenzima foi a forma que mais incorporou deutério, seguida das formas complexadas ao fosfoenolpiruvato e ao glifosato, respectivamente. Para a Chiquimato Quinase, a apoenzima também incorporou mais deutério que a forma ligada ao complexo Cloreto de Magnésio-Ácido Chiquímico-ADP. Para ambas as enzimas, as regiões menos dinâmicas foram aquelas que contêm os resíduos de aminoácidos responsáveis pela complexação aos ligantes. Esses resultados sugerem que as alterações conformacionais sofridas por essas enzimas em diferentes condições, refletem diferentes necessidades de ajustes estruturais da enzima, para “acomodar o ligante” numa dada condição fisiológica (ajuste induzido). Esses resultados também demonstram a capacidade da técnica de monitoramento da troca isotópica H/D, seguida por medidas de espectrometria de massas, para monitorar as alterações conformacionais de proteínas em solução.

## 2. ABSTRACT

Nowadays all around the world there are some diseases that cause a high index of human lethality. Among these it should be highlighted the infectious disease tuberculosis, which is the top deadly disease caused by only one agent, the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. As the currently available drugs are not suitable for the control of tuberculosis, it became vital the development of novel drugs for this purpose.

Useful drugs are being developed to inhibit some enzymes of the shikimic acid pathway. This via is responsible for the synthesis of aromatic amino acids, such as the *p*-aminobenzoic acid and other essential metabolites, such as ubiquinone, menaquinone and K vitamin. The shikimate pathway exists in plants, algae, fungi, bacteria and was also found in some apicomplex parasites; however, it is not present in mammals. The Shikimate Kinase and 5-Enol-Pyruvyl-Shikimate-3-Phosphate Synthase (EPSPS), the fifth and sixth

enzymes, respectively, present in this pathway, have been considered as important targets to development of herbicides and antibiotic drugs.

In the present work the isotopic change Hydrogen/Deuterium and the electrospray ionization mass spectrometry were used to investigate the occurrence of conformational in both enzymes, in presence and absence of some of their ligands (substrates /inhibitors).

The deuterium incorporation was observed in both enzymes. The apoenzyme of EPSPS, incorporated more deuterium than the enzyme complexed to phosphoenolpyruvate, which in turn incorporated more deuterium than the enzyme complexed to glyphosate. The apoenzyme of Shikimate Kinase also incorporated more deuterium than the complexed form with magnesium chloride-shiquimic acid-ADP. In both enzymes, the regions less dynamics were those containing the amino acids residues of the binding sites of substrates and/or inhibitors. The experimental results indicate the occurrence of a series of small conformational changes as structural requirements in order to better accommodate the ligands within the enzymes under specific physiological condition (induced fitting). Furthermore, these results show that the monitoring of the isotopic changes H/D through ESI mass spectrometry constitutes a fine technique to detect small conformational changes of proteins in solution.

### **3. INTRODUÇÃO**

O fato das proteínas sofrerem alterações em sua conformação tem sido demonstrado a muito tempo (Linderstrom-Lang, 1955). A representação estrutural de uma proteína veio com a determinação da estrutura cristalina da deoxi e oxihemoglobina por Perutz (1962). Uma importante evidência da flexibilidade de proteínas em solução veio dos experimentos de troca isotópica hidrogênio / deutério (H/D) realizados por Linderstrom-Lang (1955), onde proteínas que foram mantidas em contato com água deuterada por um tempo maior, apresentaram uma taxa de troca isotópica H/D mais elevada que as proteínas que tiveram um tempo menor de exposição ao solvente deuterado. A mobilidade de cadeias laterais em proteínas foi também demonstrada por ressonância magnética nuclear (RMN) (Jardetzky and Jardetzky, 1962). Evidências também têm sido observadas de que anéis

aromáticos localizados em uma estrutura empacotada, podem girar relativamente livres (Jardetzky, 1970). Algumas proteínas, tais como aquela da cápsula do vírus do mosaico do tabaco, podem ser flexíveis (Jardetzky *et al.*; 1978). Em outras proteínas, domínios inteiros se movem independentemente, como por exemplo, no caso do repressor *lac* (Wade-Jardetzky *et al.*; 1979).

Desta forma, como tem sido demonstrado que as estruturas protéicas são mais dinâmicas que estáticas (Nimmegern *et al.*; 1996; Spolar e Record, 1994), tem havido um crescente interesse no estudo da dinâmica conformacional de proteínas, uma vez que esses estudos podem auxiliar a compreender melhor o significado da estabilidade protéica e da relação existente entre as estruturas tridimensionais e as seqüências primárias das proteínas (Dill e Shortle, 1991; Dobson, 1992; Smith *et al.*, 1996). Corroborando isso, a dinâmica protéica também está envolvida em vários processos biológicos importantes, tais como o transporte de partículas através de membranas, a degradação de biomoléculas em diferentes tipos celulares, entre outros processos (Dill e Shortle, 1991; Ptitsyn, 1995). A agregação de proteínas também desempenha um papel relevante na cinética conformacional protéica, processo biológico que possui significativa importância na condição funcional de muitas proteínas (Thomas *et al.*; 1995).

O entendimento da dinâmica conformacional de uma proteína em condições fisiológicas tem sido um desafio, particularmente se os estudos são conduzidos com técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, uma vez que esta técnica fornece dados referentes à média dos diferentes estados conformacionais assumidos por uma proteína (Shortle, 1996b; Smith *et al.*; 1996).

É, portanto de interesse complementar, a investigação de técnicas capazes de determinar a dinâmica conformacional protéica. Isso tem sido realizado com sucesso ao se acoplar três técnicas: a troca entre os isótopos hidrogênio e deutério, digestão pela protease ácida pepsina e a espectrometria de massas com ionização electrospray.

Neste sentido, foi proposto no presente trabalho o estudo da dinâmica conformacional das enzimas Chiquimato Quinase e 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase (EPSPS). Estas são responsáveis pela quinta e pela sexta reações, respectivamente, na via do ácido chiquímico (figura 1), via esta essencial para a síntese dos aminoácidos aromáticos e seus derivados metabólicos em algas, plantas superiores, bactérias e fungos, assim como em parasitas apicomplexos (Roberts *et al.*; 1998).

Assim, se a Chiquimato Quinase ou a EPSPS forem inibidas na via do chiquimato, os aminoácidos aromáticos e uma grande quantidade de compostos aromáticos não serão mais sintetizados, promovendo, provavelmente, a morte das bactérias, parasitas ou plantas superiores. Em função da via do ácido chiquímico estar ausente em mamíferos (Kishore e Shah, 1988), tanto a Chiquimato Quinase quanto a EPSPS tem se tornado alvos atrativos para o desenvolvimento de novos herbicidas e agentes antimicrobianos efetivos contra micobactérias, parasitas e fungos patogênicos (Michael *et al.*; 2003, Schonbrunn, *et al.*; 2001).

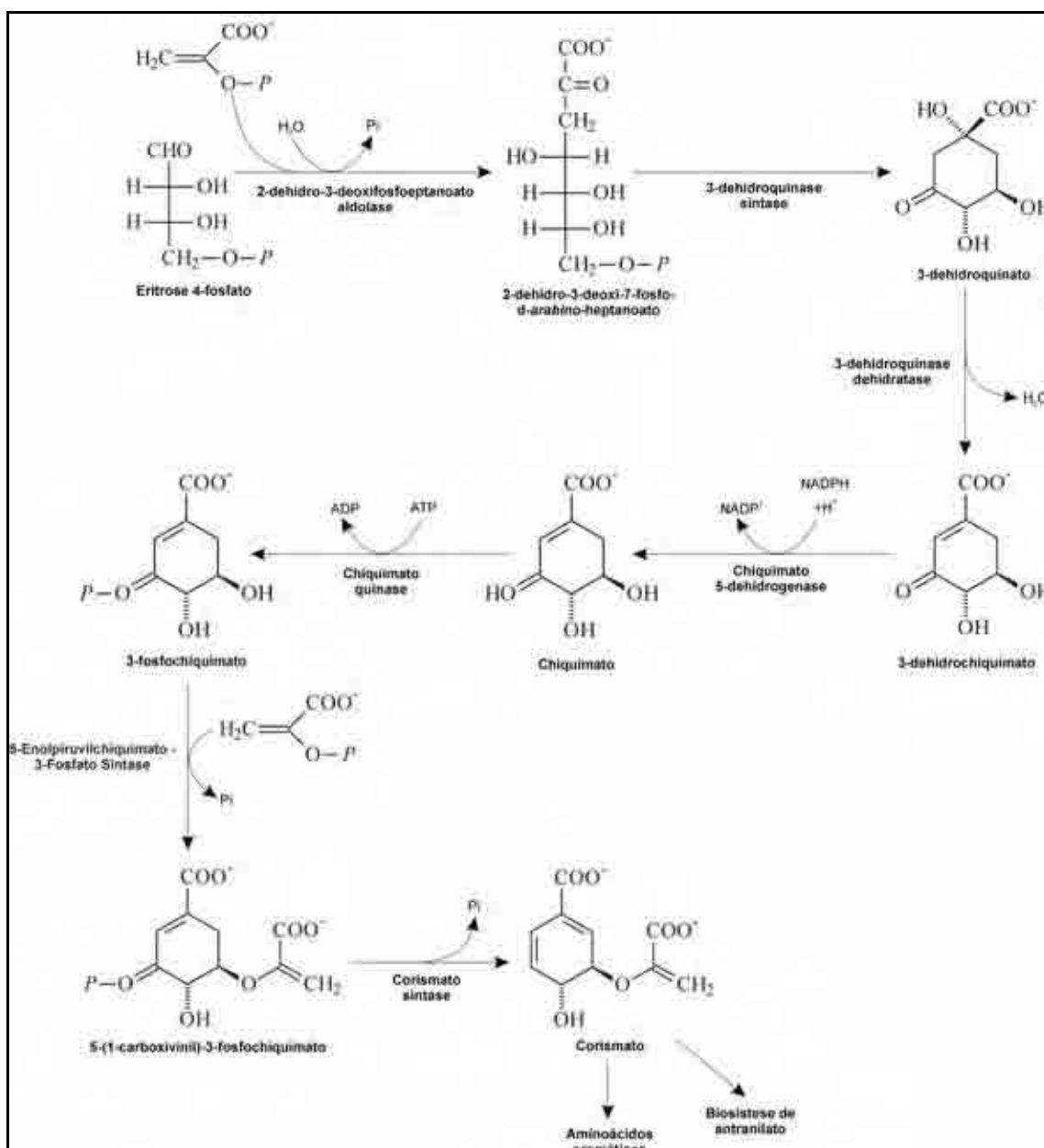


Figura 1: Via do ácido chiquímico.



## **4. REVISÃO DA LITERATURA**

### **4.1. Técnica de troca isotópica Hidrogênio / Deutério acoplada à espectrometria de massas electrospray**

O processo pelo qual uma proteína sofre um enovelamento da cadeia polipeptídica, a fim de atingir a sua estrutura tridimensional biologicamente ativa, ainda não é muito bem entendido. Uma abordagem experimental para entender o processo de enovelamento de uma proteína, tem sido dada pela caracterização dos diferentes estados conformacionais assumidos por um determinado polipeptídeo, numa condição experimental específica. Entretanto, uma das principais dificuldades para se estudar este processo dinâmico é determinar aqueles estados conformacionais, nos quais as proteínas se mantêm por um pequeno período de tempo (Wang e Tang, 1996).

Métodos experimentais usados para determinar um tipo de troca isotópica, (a troca de hidrogênios amidados, ao nível das ligações peptídicas, sem se concentrar em suas localizações), incluem a espectroscopia infravermelho (Hvidt e Nielsen, 1966) e a espectroscopia ultravioleta (Englander *et al.*; 1979). Embora, muitas informações úteis tenham sido obtidas através de numerosas aplicações desses métodos, eles não dão informações sobre as regiões específicas que sofrem alterações estruturais. Para entender melhor a relação estrutura / função das proteínas, deve-se necessariamente conhecer as regiões das mesmas que estão sofrendo alterações conformacionais. Informações altamente detalhadas deste tipo têm sido obtidas com estudos de ressonância magnética nuclear, mas isso se aplica somente para proteínas com massa molecular de até 20kDa (Delepierre *et al.*; 1987). Além desta limitação, esta técnica também exige alguns miligramas de proteína altamente homogênea, o que freqüentemente é difícil de se obter.

Neste sentido, uma metodologia com boa resolução, utilizada tanto para se quantificar a troca isotópica hidrogênio / deutério nos hidrogênios amidados de grandes proteínas, quanto para localizar as posições desta trocas, foi descrita por Zhang e Smith (1993). Quando uma proteína é solubilizada em água deuterada, a troca isotópica pode ser quantificada pela digestão da proteína em estudo com uma protease, seguida pela determinação dos níveis de deutério em cada peptídico gerado pela digestão, através de medidas de espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS) (Zhang e Smith, 1993). Esta abordagem tem sido aplicada para proteínas relativamente grandes e requer quantidades razoavelmente pequenas de amostras (microgramas).

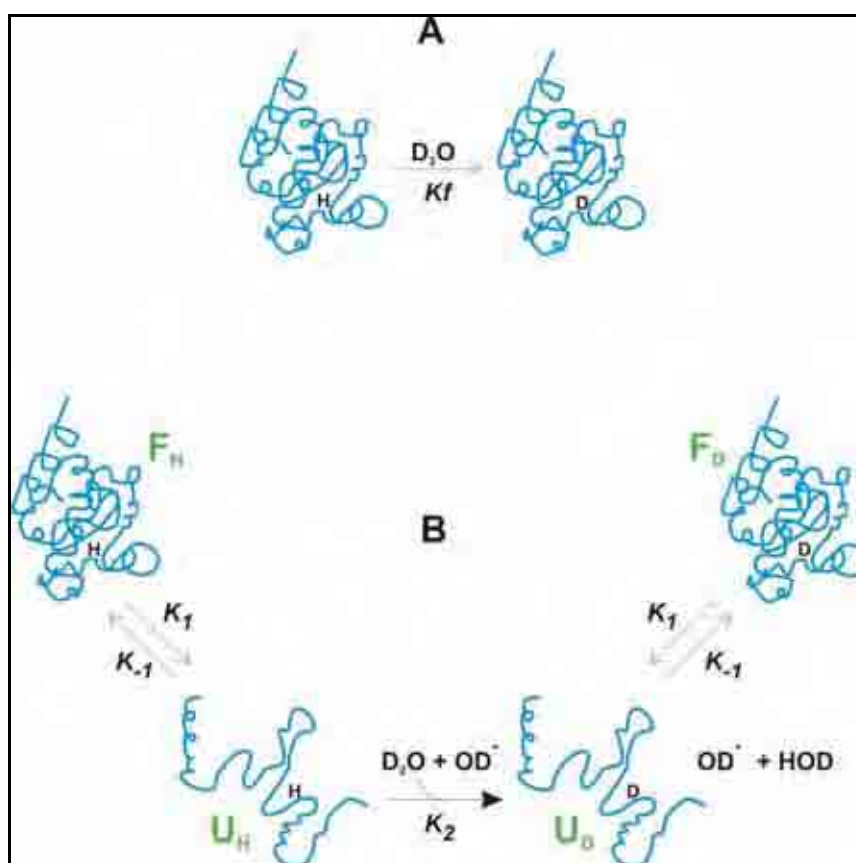
Os detalhes da troca H/D têm sido revistos por Smith *et al.*; (1997). Os prótons localizados nas amidas das ligações peptídicas, quando incubados em água

deuterada a pD 7,0, são substituídos por deutério dentro de 1 a 10s. Em proteínas enoveladas, alguns hidrogênios amidados podem trocar rapidamente, enquanto que outros podem demorar até meses para trocar, em função da inacessibilidade ao solvente deuterado (Engen e Smith, 2000).

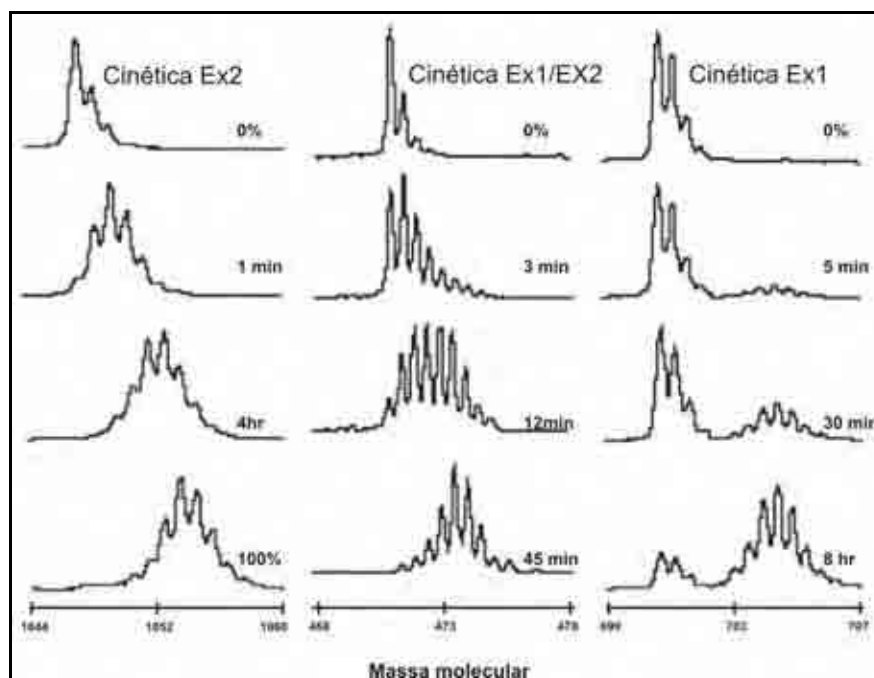
A troca H/D pode ser sumarizada em dois processos básicos, que podem ocorrer diretamente em proteínas enoveladas (figura 2A), ou através de um processo de competição entre diferentes estados conformacionais assumidos momentaneamente pela proteína (figura 2B). No primeiro caso, a troca H/D provavelmente ocorre nos hidrogênios amidados que não estão envolvidos nas pontes de hidrogênio intramoleculares, e que estão localizados próximos à superfície da proteína. No segundo caso, uma movimentação substancial da cadeia principal da proteína é necessária, para que haja exposição dos sítios de troca (Engen e Smith, 2000).

A substituição de hidrogênio por deutério pode ocorrer de maneira localizada em formas desenoveladas ( $U_H$ ) de uma proteína, que se encontram em equilíbrio com formas enoveladas da mesma ( $F_H$ ). As constantes  $K_1$ ,  $K_{-1}$  e  $K_2$  descrevem o desenovelamento, enovelamento e a troca H/D, respectivamente. Formas deuteradas da proteína desenovelada e enovelada são designadas por  $U_D$  e  $F_D$ , respectivamente. A troca isotópica entre hidrogênios das amidas das ligações peptídicas, em proteínas no estado desenovelado, apresenta dois caminhos cinéticos: EX1 e EX2. Quando EX1 prevalece,  $K_{-1} \ll K_2$ , a troca isotópica é completada em regiões desenoveladas, antes que as proteínas enovelem novamente. Sob efeitos da cinética EX2,  $K_{-1} \gg K_2$ , a proteína deve necessariamente assumir várias vezes seu estado desenovelado antes da troca isotópica estar completada. Para proteínas sob condições fisiológicas, a troca H/D usualmente ocorre

pela cinética EX2, mas pode ocorrer pela combinação das duas cinéticas (Engen e Smith, 2000). A distinção entre os mecanismos de troca isotópica hidrogênio/deutério, via EX1 ou EX2, pode ser claramente observada pela proporção de distribuição dos picos isotópicos no espectro de massas. Uma distribuição randômica de deutérios entre as moléculas de uma amostra, detectada como uma única distribuição binomial de picos isotópicos no espectro de massas, indica que a troca H/D se deu por mecanismo do tipo EX2. Distribuições bimodais de picos isotópicos são as maiores evidências de cinética EX1 (Miranker *et al.*; 1993; Kim e Woodward, 1993; Woodward *et al.*; 1982) (Figura 3).



**Figura 2:** Mecanismos gerais para troca isotópica em hidrogênios amidados. (A) A troca pode ocorrer diretamente em proteínas enoveladas e (B) através do desenovelamento da proteína ou ainda através da combinação dos dois processos.



**Figura 3:** Padrões de distribuição isotópica característicos das cinéticas EX1, EX2 e EX1/EX2. Na cinética EX2 um único envelope isotópico é observado. Na cinética EX1/EX2, uma sobreposição de dois envelopes ocorre, enquanto que na cinética EX1 a separação entre dois envelopes é clara (Engen, J. R. and Smith, D. L. 2000).

A combinação das técnicas de digestão protéica e de espectrometria de massas com ionização electrospray é relativamente nova (Zhang e Smith, 1993). Para se determinar a taxa de troca hidrogênio / deutério dentro de regiões pequenas e definidas de uma proteína, a protease ácida pepsina tem sido utilizada para digerir esta proteína em peptídeos. A pepsina é ideal para isso, porque ela tem a sua atividade máxima no intervalo de pH 2 – 3, onde a taxa de troca isotópica é mais lenta, fato de extrema importância neste processo, para que haja tempo suficiente para a determinação dos níveis de deutério nos fragmentos peptídicos, antes que ocorra novamente a reversão parcial desta troca (Zhang e Smith, 1993). Dado o poder da espectrometria de massas em identificar peptídeos em misturas complexas, a baixa especificidade da pepsina é vantajosa porque ela gera um

grande número de fragmentos peptídicos, os quais podem ser facilmente identificados em medidas preliminares (Zhang e Smith, 1996).

Uma vez que as condições para a troca isotópica devem ser mantidas durante a digestão, uma grande quantidade de pepsina é usada para reduzir o tempo deste processo. Os fragmentos resultantes da digestão podem ser então analisados por MS ou por LC-MS, para determinar a massa molecular dos peptídeos-fragmentos, nos quais os níveis de deutério são determinados e então comparados aos fragmentos correspondentes, na respectiva proteína não deuterada (Smith, 1997). Os peptídeos podem ser purificados por cromatografia de fase reversa, entretanto como uma fase móvel aquosa é usada neste processo, os deutérios trocados podem ser rapidamente “destrocados” com prótons, assim como ocorre com os hidrogênios das cadeias laterais dos aminoácidos, ou com aqueles localizados nos grupos N- e C- terminais dos peptídeos, antes mesmo de serem analisados por espectrometria de massas. Desta forma, o aumento de massa molecular observado em cada peptídeo, é devido à deuteração das ligações amida, que se expõem ao meio líquido durante as variações conformacionais (Smith, 1997). Os deutérios das ligações amida também podem ser trocados novamente por prótons, mas em condições ideais de análise (0° C e pH 2,5) esta troca é estável por um período de tempo em torno de 60 a 90 minutos; tempo suficiente para a medida por ESI-MS (Engen e Smith, 2000).

O “electrospray” é uma técnica de ionização branda, que permite a transferência de complexos não covalentes de uma fase líquida para uma fase gasosa (Lorenz *et al.*; 2001). O principal aspecto da ionização electrospray em proteínas é a produção, na fase gasosa, de uma série coerente de íons multiplamente carregados (Fenn *et al.*; 1989). Um espectro de massas ESI padrão, obtido no modo positivo é caracterizado

pela presença de uma série de picos que correspondem a diferentes estados ionizados da mesma proteína intacta, onde cada pico difere de seu vizinho por uma unidade de carga. O número de cargas observado em uma proteína em solução é determinado por vários fatores, incluindo: o número, distribuição e valores de  $pK_a$  dos resíduos de aminoácidos ionizáveis, assim como o estado conformacional da proteína. Proteínas desnaturadas exibem um número consideravelmente maior de estados ionizados, quando comparadas a proteínas no estado nativo (enovelado) (Guevremont *et al.*; 1992).

Kim *et al.*; (2001), demonstraram que o uso da espectrometria de massas ESI-MS/MS pode ser uma excelente ferramenta para monitorar os processos de enovelamento / desenovelamento de proteínas, medindo-se a localização da troca H/D. O uso da espectrometria de massas sequenciais (MS/MS) pode fornecer medidas precisas sobre a localização da troca H/D ao nível dos grupos amida das ligações peptídicas. Estes estudos mostraram que o nível de deuteração dos grupos amida pode ser medido, se forem analisados os valores de  $m/z$  dos íons do tipo “b” e “y” obtidos no modo MS/MS. Além disso, estes autores também demonstraram uma excelente correlação entre as velocidades de troca H/D e a quantidade de deutério medido nos sítios amida, através das diferenças entre os valores de  $m/z$  dos íons-fragmentos do tipo “b”. Esta correlação foi tão boa quanto às medidas de constantes de troca H/D medidas por ressonância magnética nuclear.

O sucesso na aplicação da técnica de troca isotópica, com a espectrometria de massas ESI para uma proteína em particular, requer cuidado ao considerar vários aspectos técnicos, tais como: pH, temperatura, digestão, separação e processamento de uma grande quantidade de dados (Engen e Smith, 2000).

De uma forma geral, através da combinação entre as três técnicas: (1) troca isotópica hidrogênio / deutério; (2) digestão por pepsina e (3) espectrometria de massas com ionização electrospray, tem sido possível estudar vários aspectos conformacionais das proteínas, como por exemplo: i) heterogeneidade conformacional em citocromo *C* oxidado, onde grandes diferenças na taxa de troca H/D foram observadas em hidrogênios amidados localizados distantes das regiões C- e N- terminal, indicando que estas regiões são mais afetadas pelo estado de oxidação do ferro (Dharmasiri e Smith, 1997), ii) os efeitos da mutagenicidade em ferredoxina (Reimigy *et al.*; 1997), arrestina 2 (Carter *et al.*; 2005), ferrocitocromo *C2* (Jaquinod *et al.*; 1996), e citocromo *C553* (Guy *et al.*; 1996), onde se conseguiu determinar as mudanças conformacionais de regiões específicas que sofreram mutações, iii) alterações conformacionais induzidas por pequenas moléculas, assim como a localização do sítio de ligação das mesmas, onde, por exemplo, a ligação de NADPH pode alterar a taxa de troca em proteínas superexpressas, por alterar a conformação destas proteínas (Wang *et al.*; 1998) e iv) alterações na acessibilidade ao solvente induzidas por ligantes (Yan *et al.*; 2004).

A compreensão da relação entre a estrutura e a função de proteínas envolvidas em doenças, como por exemplo, na encefalopatia espongiforme, mais conhecida como a “doença da vaca louca”, poderá ajudar não só a explicar seus mecanismos de ação, mas também o papel de algumas modificações pós-traducionais sobre a dinâmica conformacional de muitas proteínas relacionadas com o aparecimento da doença, possibilitando assim a aquisição de novos conhecimentos sobre as mesmas.



#### **4.2. A tuberculose como alvo importante para o estudo de novas drogas antimicrobianas**

O estudo de dinâmica conformacional de enzimas de interesse para a saúde pública, como aquelas da via do ácido chiquímico (figura 1), presentes em bactérias, plantas superiores, fungos patogênicos e parasitas apicomplexos, deverá se tornar um dos grandes focos de estudos para a bioquímica, biologia estrutural e biologia molecular nos próximos anos.

Dentre os grandes desafios da pesquisa médica moderna, está o desenvolvimento de novas drogas frente a doenças infecciosas causadas por microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, fungos e protozoários, especialmente em países pobres e em desenvolvimento.

Hoje em dia, em todo o mundo, existem algumas doenças responsáveis por uma grande taxa de mortalidade em humanos. Dentre essas doenças, pode-se destacar a tuberculose, infecção provocada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e que é a principal causa de morte em humanos devido a um único agente infeccioso. Em 1997, 1,87 milhões de pessoas morreram desta doença. Segundo o relatório anual da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2001, estima-se que ocorreram cerca de 8,4 milhões de novos casos de tuberculose no mundo em 1999, o que representa um aumento de cerca de 20% em relação ao ano de 1997. Este aumento é devido à ocorrência de tuberculose em pacientes co-infectados com o vírus HIV. Outro fator que está relacionado ao aumento de casos de tuberculose é a emergência de cepas resistentes aos antimicrobianos utilizados para o seu tratamento. Os mecanismos de resistência identificados até o momento são resultantes de

mutações pontuais em genes codificadores das proteínas, que são os alvos destes agentes anti-tuberculose (Basso e Blanchard, 1998).

Cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas anti-tuberculose de primeira linha, tais como a Isoniazida, Rifampicina e Streptomina, têm sido identificadas globalmente. A estimativa anual da tuberculose no Brasil é de 120.000 novos casos. Um aspecto preocupante da situação brasileira é que taxas superiores a 45% de pacientes previamente tratados, apresentam multi-resistência adquirida (definida como resistente a Isoniazida e Rifampicina) (Relatório Anual da Organização Mundial de Saúde, 2001).

Dentre as prioridades para o combate à tuberculose, o desenvolvimento de novas drogas para substituírem aquelas comprometidas pela resistência, é premente para o desenvolvimento de um tratamento quimioterápico eficaz. O principal objetivo da quimioterapia é atacar alvos peculiares aos microrganismos como, por exemplo, vias metabólicas ausentes no organismo humano. Tal fato, teoricamente, minimizaria o efeito tóxico destas drogas antimicrobianas para a espécie humana. Portanto, a identificação de novas moléculas alvos para o desenvolvimento de antibióticos é de extrema importância para o desenvolvimento de uma nova geração de antibióticos para combater patógenos multi resistentes (Du *et al.*; 2000, Park *et al.*; 2004).

Sob este aspecto, as enzimas da via do ácido chiquímico (figura 1), representam bons exemplos da utilidade de tal abordagem aplicada a constituintes enzimáticos de uma rota metabólica. A via do ácido chiquímico é responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos, do ácido *p*-aminobenzóico e outros metabólitos essenciais tais como ubiquinona, menaquinona e vitamina K. Numa seqüência de sete passos metabólicos, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato são convertidos em corismato, o precursor dos

aminoácidos aromáticos e muitos metabólitos aromáticos secundários. A via do chiquimato, que é encontrada em plantas, algas, fungos e bactérias, foi também encontrada recentemente em vários parasitas apicomplexos (Roberts *et al.*; 1998); entretanto, essa via metabólica não é encontrada em mamíferos. O filo Apicomplexa é constituído de protozoários parasitas intracelulares, incluindo *Plasmodium falciparum*, responsável por um grande número de mortes em humanos e também por grandes perdas econômicas (McConkey, 1999). Dentre os apicomplexos, podem ainda ser incluídos parasitas tais como *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum*, responsáveis por infecções oportunistas em pacientes com AIDS (Kohler *et al.*; 1997, McConkey *et al.*; 1997, Rogers *et al.*; 1998, Fichera e Roos, 1997).

A indispensabilidade da via do chiquimato para a sobrevivência de bactérias e protozoários, a grande quantidade de dados literários sobre a clonagem e purificação das sete enzimas a partir de organismos procarióticos e eucarióticos e a ausência dessa via metabólica em mamíferos, tornaram as enzimas da via do chiquimato alvos muito atrativos para o desenvolvimento de inibidores, com grande potencial para se tornar poderosas e seletivas drogas contra patógenos humanos.

A utilização das enzimas da via biossintética do ácido chiquímico, como alvos para o desenvolvimento de inibidores, pode ser plenamente justificada e validada pela inibição específica da EPSPS pelo glifosato [*N* – (fosfometil) glicina], que é um herbicida efetivo e específico (Steinrucken e Amrhein, 1980). Este composto constitui um modelo de sistema molecular para o desenvolvimento racional de outros inibidores para a enzima EPSPS (Stauffer, 2001). Portanto, esta enzima constitui um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas e antiparasitas (O’Callaghan, 1988).

Uma variedade de derivados do glifosato está atualmente sendo usada para elucidar a relação estrutura-função para diferentes inibidores da EPSPS de diferentes fontes microbianas (Brown, *et al.*; 2003), e esforços feitos para entender o modo de ação do glifosato, tem inspirado a pesquisa para outros compostos com capacidade inibitória similar (Campbell *et al.*; 2004, Bornemann *et al.*; 1995, Priestman *et al.*; 2005), a fim de possibilitar o descobrimento de agentes antimicrobianos afetivos contra bactérias e fungos patogênicos (Robert set *al.*; 1998).

No sexto passo da via do chiquimato, a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EC 2.5.2.19) catalisa a reação entre o chiquimato-3-fosfato (S3P) e o fosfoenolpituvato (PEP) para formar o 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato, um intermediário da via do chiquimato, o qual leva à síntese dos aminoácidos aromáticos (Fichera e Roos, 1997, Hermann, 1995, Hermann e Reaver, 1999).

A EPSPS, é uma enzima monomérica de massa molecular 46KDa. Essa enzima tem sido purificada a partir de organismos procariotos e eucariotos, e sua estrutura tridimensional determinada, indicando a existência de dois domínios, com o sítio ativo próximo ao interdomínio no segmento de cruzamento (Pereira *et al.*; 2003). O mecanismo catalítico dessa enzima tem sido objeto de muitos estudos, enquanto o complexo enzima-substrato e diferentes estados intermediários tem sido caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas (Studelska *et al.*; 1996, Coggins *et al.*; 2003, Lewis *et al.*; 1999).

Recentemente, com a publicação do genoma do bacilo *M. tuberculosis*, verificou-se a presença dos genes codificadores das enzimas envolvidas na via do ácido chiquímico: *aroD* (3-Desidroquinato Desidratase), *aroB* (3-Desidroquinato Sintase), *aroK* (Chiquimato Quinase), *aroF* (Corismato Sintase), *aroG* (DAHP Sintase), *aroE*

(Chiquimato Desidrogenase) e *aroA* (EPSPS) (Cole et al.; 1998), oferecendo a oportunidade de clonar e superexpressar essas enzimas para caracterizações estruturais e funcionais.

Uma série de observações experimentais pontuam a importância funcional da EPSPS para a sobrevivência de microrganismos. A deleção do gene *aroA*, codificador da enzima EPSPS, causa atenuação em várias linhagens de *Streptomyces pneumoniae* e *Bordetella bronchiseptica* (McArthur et al.; 2003, McDevitt et al.; 2002).

Genes codificadores dessas enzimas também tem sido encontrados em parasitas apicomplexos (Robert set al.; 1998). Estudos preliminares tem demonstrado que a síntese do *p*-aminibenzoato (pABA) é essencial em *Plasmodium falciparum* (McConkey et al.; 1997). O pABA, é um intermediário chave na produção do folato, composto essencial e sintetizado na via do ácido chiquímico (McConkey, 1999). Além disso, tem sido demonstrado que análogos ao chiquimato têm inibido o crescimento do *Plasmodium falciparum* (Pittard, 1987). Vários parasitas apicomplexos tem apresentado sensibilidade positiva ao glifosato. A inibição do crescimento de parasitas apicomplexos *in vitro* forneceu a primeira evidência da ocorrência da via do ácido chiquímico nesse importante grupo de patógenos (Robert set al.; 1998). Portanto, análogos do chiquimato podem agir como inibidores universais de parasitas apicomplexos tais como *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum*, os quais causam infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos (Roberts et al.; 19998).

A organização molecular e estrutural das enzimas da via do ácido chiquímico varia consideravelmente entre os grupos taxonômicos (Coggins et a.; 1987). As mais bem estudadas enzimas da via do ácido chiquímico são: 3-deoxi-D-arabino-

heptolusonato-7-fosfato sintase (DAHP), a enzima que controla o fluxo de carbono dentro da via do ácido chiquímico e a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), enzima que catalisa a conversão de chiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato (PEP) em 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) (Herrmann, 1995b).

A UDP-*N*-acetilglucosamina enolpiruvil transferase (MurA1; EC 2.5.1.7) e a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS; AroA; EC 2.5.1.19) são membros da família das enzimas enolpiruvil transferases. A MurA catalisa o primeiro passo na síntese da parede celular bacteriana (Van Heijenoort, 1994), enquanto a EPSPS é responsável pelo sexto passo na via do chiquimato em bactérias, fungos, algas, plantas superiores e parasitas apicomplexa (Roberts, 1998; Bentley, 1990). Uma vez que as enzimas enolpiruvil transferases são essenciais para a sobrevivência de microrganismos, essas enzimas têm se tornado alvos promissores no desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos efetivos contra bactérias, parasitas e fungos patogênicos (McDevitt *et al.*; 2002; Roberts *et al.*; 2002). No passado, a MurA conseguiu muita atenção na literatura internacional devido a sua inibição pelo antibiótico de largo espectro, fosfomicina, o qual ataca covalentemente o grupo tiol da cisteína 115 no sítio ativo da MurA de *E. coli*. (Marquardt *et al.*; 1994; Skarzynski *et al.*; 1996).

Em patógenos, a mutação ou a deleção de um dos genes da via do ácido chiquímico, tal como o gene *aroA*, o qual codifica a EPSPS, resulta em linhagens altamente atenuadas e que não são capazes de sobreviver *in vivo* ou causar infecções; esta abordagem tem sido empregada no desenvolvimento de vacinas contra esses patógenos (Hoiseth e Stocker, 1981; Moral *et al.*; 1988).

A enzima chiquimato quinase é a quinta enzima na via do ácido chiquímico, catalisando a fosforilação específica do grupo 3-hidroxil do ácido chiquímico, usando o ATP como co-substrato. A chiquimato quinase pertence à mesma família estrutural das nucleosídeos monofosfato quinases (NMP). Essa classe de proteínas quinases é composta de três domínios, o domínio CORE, o domínio LID e o domínio de ligação do substrato (SB). Um traço característico das NMP é que elas sofrem grandes mudanças conformacionais durante a catálise, havendo necessidade de assumir vários estados conformacionais diferentes para que sua atividade biológica possa ser realizada (Vonnrhein *et al.*; 1995).

Em *E. coli*, a reação de fosforilação do grupo 3-hidroxil do ácido chiquímico, é catalisada por duas isoformas, a Chiquimato Quinase I (codificada pelo gene *aroK*; Whipp e Pittard, 1995) e a Chiquimato Quinase II (codificada pelo gene *aroL*; Millar *et al.*; 1986). Ambas as isoenzimas são monômeros de massa molecular 19500Da, mas compartilham somente 30% de identidade de suas seqüências primárias (Griffin, 1995). Na Chiquimato Quinase, a ligação do chiquimato induz o fechamento da estrutura, com os domínios LID e SB se movendo em direção a completar cataliticamente o sítio ativo da enzima, sendo que essa movimentação pode ser definida numa seqüência de passos ou simultaneamente (Miller *et al.*; 1996).

Para a realização deste trabalho foram escolhidas as enzimas Chiquimato Quinase e 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase. Em relação à EPSPS, estudos cinéticos e de modelagem estrutural sugerem dois estados conformacionais, um fechado e outro aberto, dependendo ou não da presença de um ligante. Isto sugere que a enzima 5-Enolpiruvilchiquimato-3-Fosfato Sintase pode apresentar uma grande movimentação

estrutural, para poder assumir ambos estados conformacionais, sendo assim um interessante e importante objeto para o estudo de dinâmica conformacional de proteínas (Pereira *et al.*; 2003).

Contudo, não há dúvidas que as enzimas da via do chiquimato oferecem muitos alvos importantes para o desenvolvimento de novas drogas contra agentes microbianos. Todos os passos enzimáticos nessa via metabólica apresentam potencial de inibição. Além disto, a disponibilidade de estruturas cristalográficas para a maioria dessas enzimas, abrem a possibilidade do desenvolvimento rápido de novos inibidores racionais para essas enzimas (Wagner, 2000; Carpenter *et al.*; 1998; Krell *et al.*; 2001).



## 5. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

⇒ Implementação da técnica de monitoramento da troca isotópica hidrogênio / deutério por espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI);

⇒ Estudar a dinâmica conformacional global e localizada das enzimas Chiquimato Quinase e 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato Sintase (EPSPS) de *Mycobacterium tuberculosis*, monitorando-se a troca isotópica hidrogênio / deutério através da espectrometria de massas electrospray;

⇒ Este trabalho também objetivou uma compreensão mais abrangente das etapas envolvidas nos processos dinâmicos de mudanças conformacionais das respectivas enzimas com seus substratos e/ou inibidores. Objetivou-se, desta forma, poder contribuir para a utilização de uma abordagem racional voltada para o desenho de quimioterápicos, que possam auxiliar na redução da dependência técnico-científica do país;

⇒ Sob o ponto de vista de formação de recursos humanos, este trabalho serviu para o treinamento, ao nível de doutorado, em técnicas de espectrometria de massas e também em técnicas de química de proteínas. Além disto, este projeto ofereceu grandes possibilidades de qualificação em biologia estrutural, principalmente voltados para estudos da relação existente entre estrutura e função das proteínas.

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1. Materiais**

#### **6.1.1. Espectrometria de massas ESI**

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas ESI, do tipo triploquadrupolo modelo QUATTRO II (Micromass).

O espectrômetro de massas ESI foi equipado com probe padrão, do tipo electrospray (ESI). O software MassLynx (Micromass) foi utilizado para controle de aquisição e tratamento de dados espectrométricos.

### **6.1.2. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).**

Para o isolamento dos peptídeos provenientes da digestão com protease ácida foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-10ADvp constituído por duas bombas modelo LC-10ADvp (bomba A) e LC-10ADvp (bomba B), injetor Rheodyne modelo 7125 com “loop” de 500µL, detector de luz ultravioleta Shimadzu modelo SPD-10A e um sistema controlador Shimadzu modelo SCL-10Avp. Os solventes utilizados foram todos grau HPLC e a água utilizada foi obtida por um bidestilador Marconi modelo MA 078 e filtrada em um sistema purificador Nanopure modelo D4754 da Barnstead.

### **6.1.3. Outros equipamentos**

Liofilizador Heto modelo DW – 3; concentrador de amostras modelo VR – I; microcentrífuga Sanyo modelo BS 4402; agitador de tubos Phoenix modelo AT 60; bidestilador de água Marconi modelo MA 078; purificador de água Nanopure Barnstead modelo D4754; espectropolarímetro Jasco-710 (JASCO International Co. Ltda Tokyo, Japan); colunas com G-25 equilibradas com água deuterada.

### **6.1.4. Drogas e reagentes**

Acetonitrila grau HPLC e ácido trifluoroacético foram adquiridos da Riedel; o ácido fórmico grau analítico foi adquirido da Merck; gás nitrogênio e argônio ultra puros foram adquiridos da White Martins; água deuterada foi adquirida da CIL Chemical Company, com 99% de átomos de deutério. A pepsina foi adquirida da Sigma Chem. Co.;

fosfato de sódio, ácido fosfórico, trifluoroetanol e dodecil sulfato de sódio, foram adquiridos de grau P.A. da melhor procedência nacional.

## 6.2. Métodos

### 6.2.1. Obtenção da enzima EPSPS de *Mycobacterium tuberculosis*

O grupo de Microbiologia Molecular e Funcional do Centro de Biologia Molecular e Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob supervisão do Prof. Dr. Diógenes Santiago dos Santos, executou a clonagem, a superexpressão e a purificação desta enzima, nos fornecendo uma quantidade de 10mg da mesma. A clonagem e superexpressão da EPSPS foram realizadas segundo o seguinte protocolo: Primers de oligonucleotídeos sintéticos (5'-attccatatgaagacatggccagccc-3' e 5'-gcggatcctcaaccgccg-ccggaccctgcc-3', os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* estão sublinhados) foram desenhados com base na sequência genômica completa do *M. tuberculosis* H37Rv. Este par de primers é complementar ao amino terminal codificado e ao carboxil terminal não codificado de seus respectivos genes estruturais, em fitas não complementares. Estes primers foram utilizados para amplificar o gene estrutural *aroA* do DNA genômico de *M. tuberculosis* utilizando condições padrões de PCR (Perkin-Elmer). Os produtos de PCR foram purificados por eletroforese em agarose *low-melting*, digeridos com *NdeI* e *BamHI* e ligados em vetor de expressão pET23a(+) (Novagen) que foi previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. A sequência de DNA do gene *aroA* amplificado foi determinada utilizando-se o kit de sequenciamento de ciclos terminais marcados Thermo Sequence (Amersham Biosciences), para confirmar a identidade dos

genes clonados e para garantir que nenhuma mutação havia sido introduzida pelo passo de amplificação por PCR (Oliveira *et al.*; 2001).

Os plasmídeos recombinantes pET-23a(+):*aroA*, foram transformados em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) e selecionados em placas de ágar contendo 50 µg mL<sup>-1</sup> de carbanicilina. Colônias únicas que foram utilizadas para inoculação de 1,5L de meio LB contendo 50 µg mL<sup>-1</sup> de carbanicilina, crescidas a 37°C até atingirem OD<sub>600</sub> entre 0,4 e 0,6, foram ou não induzidas pela adição de 0,5 mM de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As culturas de células com EPSPS foram crescidas adicionalmente por 23h a 37°C sob agitação constante. As células foram então separadas por centrifugação a 6000g por 20 min a 4°C e estocadas a -80° (Oliveira *et al.*; 2001).

Para análises da superexpressão de proteínas as células estocadas foram ressuspensas em 700 µL de Tris-HCL 50mM, pH 7,8 (40 mg de células/mL de tampão) e lisadas por sonicação. Após centrifugação a 20,800g por 30 min a 4°C o sobrenadante foi coletado e o extrato da fração solúvel de proteínas foi analisado por SDS-PAGE (segundo o método Laemmli) (Laemmli 1970). O extrato de EPSPS para as medidas de atividade da enzima foi preparado com Tris-HCL 50 mM, pH 7,8. Os experimentos controle foram realizados sob as mesmas condições experimentais, exceto as células de *E. coli* que continham o vetor de expressão sem o gene de interesse. A proporção das proteínas solúveis nos géis SDS-PAGE foi estimada utilizando-se um densitômetro de imagem (Bio-Rad) (Oliveira *et al.*; 2001).

Para avaliar a expressão da EPSPS em função da fase de crescimento celular, as células BL21(DE3) de *E. coli* que continham o plasmídeo recombinante pET-

23a(+):*aroA* foram crescidos na ausência de IPTG e alíquotas foram removidas em diferentes tempos para medidas de OD<sub>600</sub> e para análise SDS-PAGE (Oliveira *et al.*; 2001).

O controle de qualidade desta enzima foi realizado em nosso laboratório, medindo-se a massa molecular da mesma por ESI-MS, que revelou um valor de 46 458,10 Da. Além disso, esta enzima foi submetida ao sequenciamento da região N-terminal, sendo que se observou um único resíduo N-terminal, além do fato de que a seqüência primária obtida para os primeiros 15 resíduos de aminoácidos confirmaram a identidade e elevada pureza desta preparação.

### **6.2.2. Obtenção da enzima Chiquimato Quinase de *Mycobacterium tuberculosis***

O grupo de Microbiologia Molecular e Funcional do Centro de Biologia Molecular e Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob supervisão do Prof. Dr. Diógenes Santiago dos Santos, executou a clonagem, a superexpressão e a purificação desta enzima, nos fornecendo uma quantidade de 5mg da mesma. A clonagem e superexpressão da Chiquimato Quinase foram realizadas segundo o seguinte protocolo: primers sintéticos de oligonucleotídeos (5'-attccatgatggcaccacaaagcggttctc-3' e 5'-gcggatcctcatgtggccgcctcgctggg-3') foram desenhados baseando-se na seqüência genômica completa de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*; 1998). Estes primers foram complementares às regiões amino-terminal, codificadora e carboxi-terminal, não-codificadora das fitas de seus respectivos genes estruturais contendo os sítios de restrição 5' *Nde*I e 3' *Bam*HI, que estão sublinhados, em braços não-complementares. Estes primers foram utilizados para amplificar o gene estrutural *aroK* a partir de DNA genômico utilizando condições padrão de PCR (Perkin-Elmer). Os produtos de PCR foram

purificados por eletroforese em agarose 1% e corado com brometo de etídio a 0,5 % para análise da eficiência da purificação (quantidade de DNA), digeridos com NdeI e BamHI e inseridos no vetor de expressão pET23a (+) (Novagen) previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. A seqüência de DNA do gene *aroK* foi determinada utilizando-se o “Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham Biosciences) para confirmar a identidade do gene clonado e certificar que nenhuma mutação havia sido inserida durante o passo de amplificação da PCR.

Os plasmídeos recombinantes, pET-23a(+):*aroK*, foram transformadas em células eletrocompetentes de *Escherichia coli*, cepa BL21(DE3) e selecionadas em placas com meio LB-ágar contendo 50 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de carbenicilina. Colônias isoladas foram transferidas para 1,5L de meio LB líquido contendo 50 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de carbenicilina, incubadas a 37°C até que a leitura OD<sub>600</sub> atingisse entre 0,4 e 0,6, podendo ou não ser induzidas pela adição de 0,5mM de isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As culturas de células de Chiquimato Quinase foram incubadas por mais 23 horas a 37°C sob agitação. As células foram então separadas por centrifugação a 6000g por 20 minutos a 4°C e estocadas a -80°C.

Para análise da superexpressão da proteína as células estocadas foram ressuspensas em 700 $\mu$ L de Tris-HCl 50mM, pH 7,8 (40mg de células por mL de tampão), lisadas por sonicação e o *debris* celulares foram removido por centrifugação a 20.800g (30 minutos a 4°C). As massas moleculares dos extratos de proteína solúveis foram analisadas por SDS-PAGE (método Laemmli) (Laemmli,1970). O extrato de células de Chiquimato Quinase para análise de atividade foi ressuspense em KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, pH 7,5. Experimentos controle foram realizados sob as mesmas condições experimentais exceto que as células transformadas de *E. coli* continham apenas o vetor de expressão, sem o gene



de interesse. A proporção de Chiquimato Quinase solúvel total presente no gel de SDS-PAGE foi estimada utilizando um densitômetro de imagens GS-700 (Bio-Rad).

O ensaio de atividade da Shikimato Quinase foi realizado na direção 5' - 3', através do acoplamento da formação do produto do ADP à piruvato quinase (PK; EC 2.7.1.40) e às reações de lactato desidrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) seguindo o protocolo descrito por Millar *et al.* 1986. A oxidação da NADH dependente de Chiquimato foi monitorada continuamente em 340 nm ( $\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Todas as reações foram realizadas a 25°C e iniciadas com a adição de extratos de Chiquimato Quinase. A mistura da reação continha tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, de KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ácido chiquímico 1,6 mM, ATP 2,5 mM, fosfoenolpiruvato 1 mM, NADH 0,1 mM, 3U mL<sup>-1</sup> de piruvato quinase, e 2,5 U mL<sup>-1</sup> de lactato desidrogenase. As taxas iniciais de estado basal foram calculadas a partir da porção linear da reação da curva relativa às taxas obtidas de forma semelhante com extratos de células de *E. coli*, cepa BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-23a(+). Enzimas PEP, (-) chiquimato, LDH e PK, ATP e NADH eram todas Sigma. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima catalisando a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto.

O controle de qualidade desta enzima foi realizado em nosso laboratório, medindo-se a massa molecular da mesma por ESI-MS, que revelou um valor de 18583,10 Da. Além disso, esta enzima foi submetida ao sequenciamento da região N-terminal, sendo que se observou um único resíduo N-terminal, além do fato de que a seqüência primária obtida para os primeiros 15 resíduos de aminoácidos confirmaram a identidade e elevada pureza desta preparação.

### **6.2.3. Troca isotópica Hidrogênio / Deutério (H/D)**

Os experimentos de troca H/D foram realizados conforme descrito por Zhang e Smith, 1993; Engen e Smith, 2000. Para as análises de troca H/D, foram preparadas duas soluções principais equilibrando-se 100 nanomoles de enzima em 10 $\mu$ L de tampão fosfato 5mM, pH 6.9 a 22°C por até 100 minutos. A troca H/D foi iniciada através de uma diluição de 20 vezes da solução principal em tampão fosfato 5mM, pH 6.9 em água deuterada a 25°C. Em intervalos de tempos pré-determinados, aproximadamente 3 nanomoles de enzima (solução principal) foram removidos e diluídos 8 vezes em tampão fosfato 100mM, pH 2.5 em água normal para amortizar a troca isotópica, e então preservada a -70°C até ser analisada.

### **6.2.4. Análise da proteína intacta: avaliação da extensão total das trocas H/D**

O conteúdo de deutério na proteína intacta foi medido com o auxílio de um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplado a um espectrômetro de massas (ESI-MS). Cada alíquota a ser analisada (coletada num diferente tempo de incubação) foi injetada em coluna de perfusão 100mm x 0.25mm (POROS 10R2 de fase reversa média, PesSeptive Biosystem) sob um fluxo de 50 $\mu$ l/minuto. A proteína foi eluída diretamente para o espectrômetro de massa através de um gradiente de 2-98% de acetonitrila em 8 minutos. Ambas as fases móveis continham 0,05 (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). Para minimizar a troca reversível hidrogênio / deutério (H/D), o injetor, a coluna e todos os tubos associados ao sistema HPLC foram mantidos a 0°C (Zhang e Smith, 1993). Os níveis de deutério não foram corrigidos para a troca H/D

reversível, portanto relatados como níveis relativos de deutério. A quantidade média de troca H/D reversível para a instrumentação utilizada variou entre 12-15% para proteínas, conforme determinado para o citocromo *c* e para a mioglobina (Carter *et al.*; 2005). Todas as amostras foram analisadas sob condições idênticas num mesmo dia, tendo como finalidade a minimização de variáveis de troca não-protéicas. Em função do deutério nas cadeias laterais e no N-terminal trocar com uma velocidade muito maior do que nas ligações amida (Smith *et al.*; 1997), esses átomos de deutério realizam troca reversível com os prótons do solvente aquoso durante o passo de cromatografia. Os aumentos de massa, portanto, podem ser relacionados diretamente às trocas realizadas pelos hidrogênios amida das ligações peptídicas. O nível de deutério para cada tempo utilizado no experimento foi determinado três vezes independentemente, a partir de preparações protéicas separadas. Os conteúdos de deutério na proteína intacta foram determinados através da deconvolução dos espectros de massa obtidos para os diferentes tempos de incubação, e subtraídos do resultado obtido para a proteína não deuterada, em presença e ausência de seus ligantes.

#### **6.2.5. Análise dos peptídeos gerados pela digestão pepsica**

A troca H/D foi realizada como descrito no item 6.2.3. Antes das análises, 10 $\mu$ L da amostra (~4 $\eta$ moles) foram incubados com 5 $\mu$ L de uma solução de pepsina (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) por 5 minutos a 0°C. Os peptídeos fragmentos gerados foram fracionados numa coluna C18 (Michorm BioResources, Inc) e eluídos diretamente para o espectrômetro de massas num gradiente de 2-65% de acetonitrila em água, em 6 minutos. O injetor, a coluna e todos os tubos foram mantidos a 0°C, como descrito no item 6.2.4. Assim como para a

proteína intacta, nenhuma correção foi realizada para a troca H/D reversível. A quantidade média de troca reversível para peptídeos na instrumentação utilizada variou de 15-18%, como medido para vários peptídeos totalmente deuterados (Carter *et al.*; 2005). As distribuições isotópicas correspondentes aos íons +2 e +3 dos peptídeos pépsicos foram centróides e obtidas pelo software MaxEnt 3. A massa de uma forma não deuterada para cada peptídeo foi subtraída da massa obtida para o mesmo peptídeo nos diferentes tempos de incubação em suas formas centróide, a fim de obter o conteúdo relativo de deutério.

#### **6.2.6. Dicroísmo circular**

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro Jasco (modelo 710) com temperatura controlada, junto ao Departamento de Física, do IBILCEUNESP, São José do Rio Preto/SP, sob coordenação do Prof. Dr. João Ruggiero Neto.

Os espectros de dicroísmo circular para as enzimas Chiquimato Quinase e 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase foram obtidos a 20° usando celas com caminho óptico de 0,1 mm. Os dados foram adquiridos com uma velocidade de leitura de 100 nm/min, utilizando-se uma largura de banda de 1,0 nm, 1,0s como tempo de resposta e 0,1 nm de resolução.

Um total de cinco acumulações foram realizadas para obtenção de um espectro médio final. A deconvolução dos dados foi feita utilizando o programa CDNN Deconvolution (Böhm *et al.*, 1992).

### **6.2.7. Cálculo da Área Acessível ao Solvente e do número de Pontes de Hidrogênio**

A área acessível ao solvente foi calculada pelo programa Getarea 1.1 ([http://www.scsb.utmb.edu/cgi-bin/get\\_a\\_form.tcl](http://www.scsb.utmb.edu/cgi-bin/get_a_form.tcl)) (Fraczkiewicz e Braun, 1998) e as pontes de hidrogênio calculadas através do programa WHAT IF (<http://swift.cmbi.kun.nl/WIWWWI/>) (Vriend, 1990).

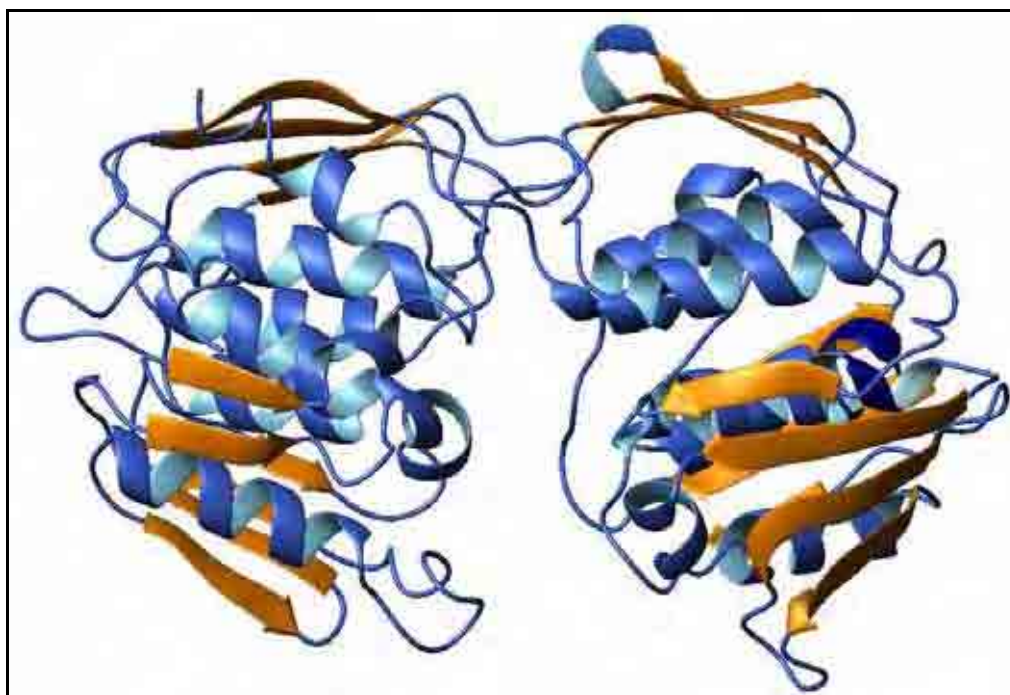
## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1. Enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) na presença de glifosato

A figura 4 revela que a EPSPS de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) é uma proteína do tipo  $\alpha/\beta$  que consiste de uma mistura de elementos de estrutura secundária do tipo fitas- $\beta$  circundadas por hélices- $\alpha$ . A estrutura dessa enzima revela dois domínios similares, que são aproximadamente hemisféricos, cada um com raio de aproximadamente 21 Å, sendo esses domínios ligados por duas cadeias. As duas superfícies planas dos hemisférios, que em projeção formam uma “fenda”, acomodam o ultimo resíduo da região amino de seis hélices em cada domínio. Os efeitos helicoidais macrodipolares criam uma cavidade que facilita a ligação do glifosato (Stallings *et al*, 1991). Os domínios são compostos de três cópias de uma unidade  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$  de enovelamento (figura 5). As quatro

estruturas em folha- $\beta$  contêm fitas paralelas e antiparalelas e as hélices são paralelas (figura 5). Na estrutura complexada com o glifosato e o chiquimato-3-fosfato, os mesmos estão ligados na fenda interdomínio, fazendo com que ocorra uma movimentação de aproximadamente 4.6 Å, promovendo o fechamento da estrutura.

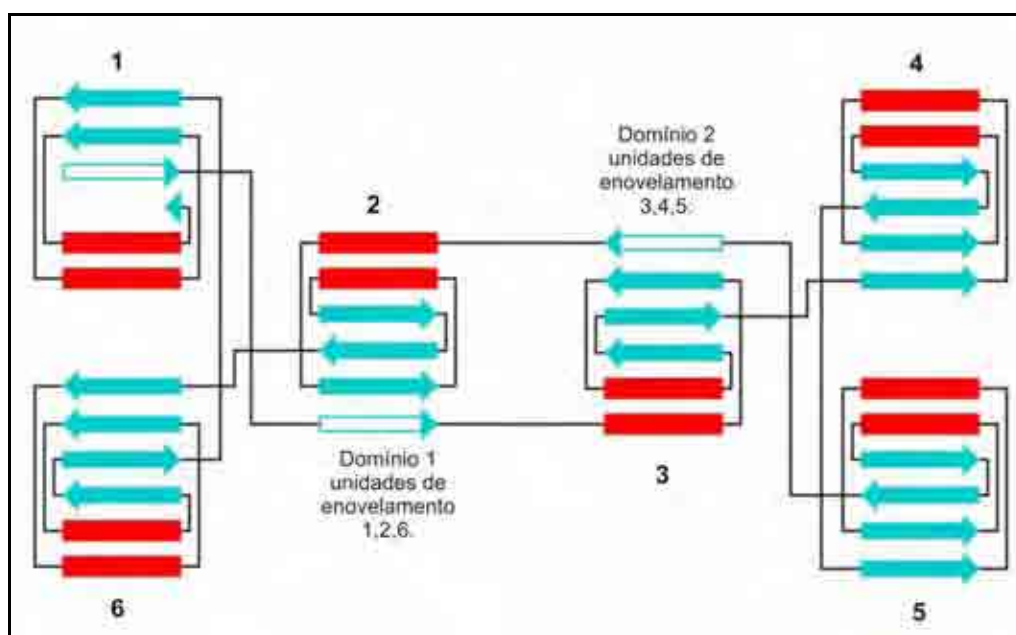
Dessa forma, para a EPSPS, é comum se adotar a conotação de estrutura aberta quando a enzima se encontra livre, na forma apoenzimática (figura 6A) e fechada quando a mesma se encontra complexada com o glifosato ou outro ligante (figura 6B).



**Figura 4:** Diagrama *em Ribbon* da estrutura molecular da MtEPSPS gerado pelo programa MolMol (Koradi, 1996).

A análise do complexo MtEPSPS-glifosato indica um total de 22 pontes de hidrogênio entre a enzima e o inibidor. Os resíduos de aminoácidos responsáveis por essas

pontes de hidrogênio correspondem a Lys23, Leu94, Gly96, Arg124, Gln169, Glu311, Glu341, Arg344, His384, Arg385 e Lys410 (Pereira *et al.*; 2003). O alinhamento de 69 seqüências de EPSPS indica que os principais resíduos envolvidos nas pontes de hidrogênio intermoleculares, entre o glifosato e a enzima MtEPSPS, são conservados em todas as seqüências. Tais observações sugerem que os inibidores derivados do glifosato serão capazes de inibir a maioria, ou até mesmo todas as EPSPSs, já que a especificidade e a afinidade entre a enzima e seu inibidor depende de pontes de hidrogênio direcionais e interações iônicas, bem como da complementaridade de cargas entre os componentes participantes da interação enzima-inibidor (Pereira *et al.*, 2003).

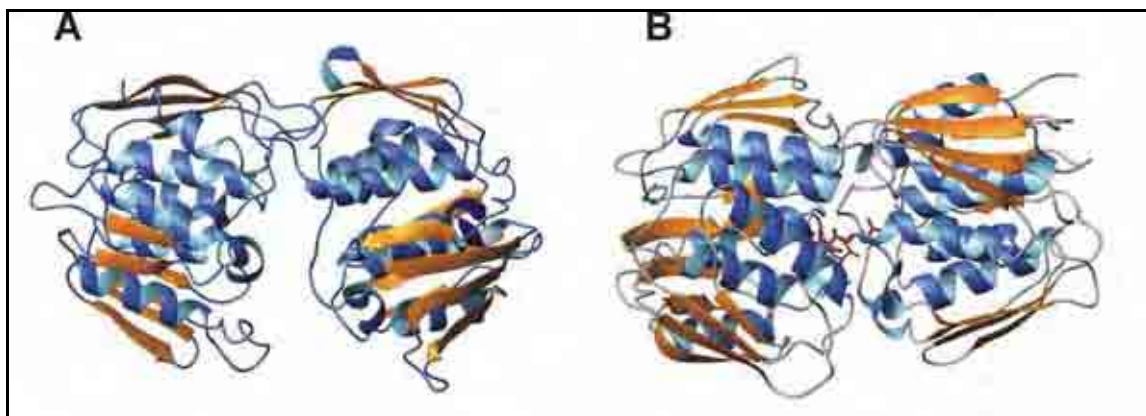


**Figura 5:** representação esquemática da cadeia da MtEPSPS, evidenciando a organização da estrutura secundária

Uma comparação entre as estruturas apresentadas na figura 6, permitiu a observação de alguns rearranjos ao nível de estrutura secundária da enzima, que podem ser



melhor visualizados quando se compara tais estruturas nas representações mostradas nas figuras 10A e 10B. Assim, observa-se a formação de duas fitas- $\beta$  entre os resíduos 1-21 da enzima complexada com o glifosato, onde existia uma única dessas estruturas na apoenzima. Além disso, na região de 61-91 da apoenzima havia três fitas- $\beta$  que se transformaram em duas fitas- $\beta$  na enzima complexada com glifosato. Outro rearranjo importante que foi observado se refere à hélice- $\alpha$  existente entre os resíduos 201-211 na apoenzima, que se estendeu dos resíduos 198-211 na enzima associada ao seu inibidor. Entre os resíduos 211-240 existiam duas fitas- $\beta$  na apoenzima, que se transformaram em três destas estruturas na enzima associada ao glifosato. Ainda pode-se observar a formação de pequenos trechos de hélice- $\alpha$  entre os resíduos 333-340 e 393-396 na enzima complexada com glifosato, que não existiam na apoenzima.



**Figura 6:** Diagrama em ribbon para a MtEPSPS na ausência de ligantes (A) e na presença de ligantes (B). Nota-se que em B ocorre um “fechamento” da estrutura molecular. Esse fechamento promove uma diminuição, de maneira geral, da área acessível ao solvente dos resíduos de aminoácidos que interagem com o glifosato e um aumento no número de pontes de hidrogênio na molécula.

A extensão de algumas regiões de hélice- $\alpha$ , bem como a “fusão” e/ou formação de fitas- $\beta$  parecem ser importantes para permitir à enzima realizar o “ajuste-induzido” (induced-fit) ao ligante, a fim de que as cadeias laterais dos resíduos de

aminoácidos dos sítios de ligação com o inibidor, se orientem adequadamente no espaço. Fenômenos como este também já haviam sido descritos anteriormente na interação da arrestina-2 com seu receptor de alta afinidade (Carter *et al.*; 2005).

Assim, pode-se dizer que de uma maneira geral, a MtEPSPS complexada com glifosato possui um maior nível de organização de estrutura secundária que a apoenzima.

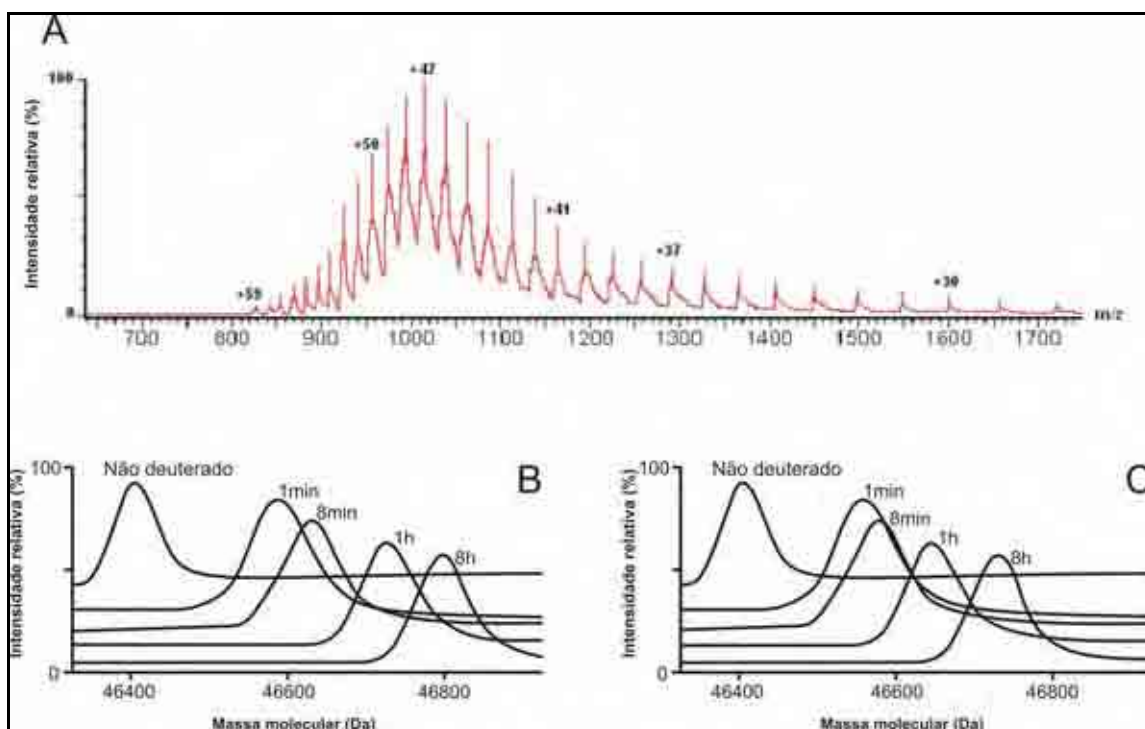
### **7.1.1. Troca Hidrogênio / Deutério (H/D) e alterações conformacionais**

Os mecanismos e detalhes da troca isotópica H/D tem sido revistos extensivamente (Woodward *et al.*; 1982; Smith *et al.*; 1997). Em resumo, os prótons que estão localizados nas ligações amidas em peptídeos são substituídos por deutérios dentro de um intervalo de tempo que varia de 1 a 10 segundos, quando na presença de água deuterada a pH 7.0. Em proteínas enoveladas, entretanto, a taxa de troca dos hidrogênios amida pode ser reduzida drasticamente como resultado de um acesso restrito ao solvente e de pontes de hidrogênio intramoleculares. Mudanças conformacionais em proteínas podem causar quebra dessas pontes de hidrogênio intramoleculares ou alterar a acessibilidade dos hidrogênios amida ao solvente, podendo alterar dessa forma as taxas de troca H/D. Monitorando-se as trocas H/D em diferentes estados de uma mesma proteína (ativo, inativo, ligado, não ligado, etc), informações podem ser obtidas a respeito de alterações na conformação protéica entre esses diferentes estados conformacionais (Carter *et al.*; 2005).

#### 7.1.1.1. Troca H/D na enzima Mt EPSPS intacta

A incorporação de deutério na apoenzima MtEPSPS e na sua forma complexada com glifosato foi monitorada por espectrometria de massas, e os resultados comparados entre si. Para assegurar que a MtEPSPS fosse passível de suportar as condições de análises da espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS), e conseqüentemente permitir a detecção da incorporação de deutérios, análises ESI-MS foram realizadas para a enzima não deuterada a fim de otimizar as condições de análises. A figura 7A mostra um espectro ESI-MS típico obtido para a apoenzima MtEPSPS, medindo uma massa molecular de 46428 Da (massa teórica 46426 Da). Os estados ionizados de +30 a +59 foram claramente visíveis. Esse resultado demonstrou que a MtEPSPS era passível de suportar as condições físico-químicas de análise ESI-MS e conseqüentemente ter sua dinâmica de conformação estudada através da troca H / D. É importante salientar que espectros ESI-MS também foram obtidos para a MtEPSPS em presença e ausência de glifosato, em análises com até 8 horas de exposição ao solvente deuterado, a 25°C, nos fornecendo assim dados experimentais sobre a dinâmica de conformação total da MtEPSPS.

Experimentos com tempo de curso de até 8 horas foram realizados para a MtEPSPS, tanto na ausência como na presença do seu inibidor, o herbicida glifosato. Os espectros de massa ESI-MS deconvoluídos para ambas as formas da enzima (apoenzima e enzima com glifosato), obtidos durante os experimentos de exposição ao solvente deuterado estão mostrados nas figuras 7B e 7C, respectivamente. A massa molecular da enzima (tanto a apoenzima como a forma complexada) em cada tempo de incubação no solvente deuterado foi determinada (figura 8).



**Figura 7:** (A) Espectro de massa ESI-MS da MtEPSPS. Os valores de  $m/z$  referentes aos diferentes estados de ionização da molécula vão de 850 a 1600. (B) Espectros ESI-MS deconvoluídos obtidos para a apoenzima MtEPSPS em diferentes tempos de exposição ao solvente deuterado. O tempo nesses experimentos variou de 1 minuto a 8 horas. (C) Espectros ESI-MS deconvoluídos obtidos para a enzima MtEPSPS complexada com glifosato nas mesmas condições de tempos de exposição ao solvente deuterado de B.

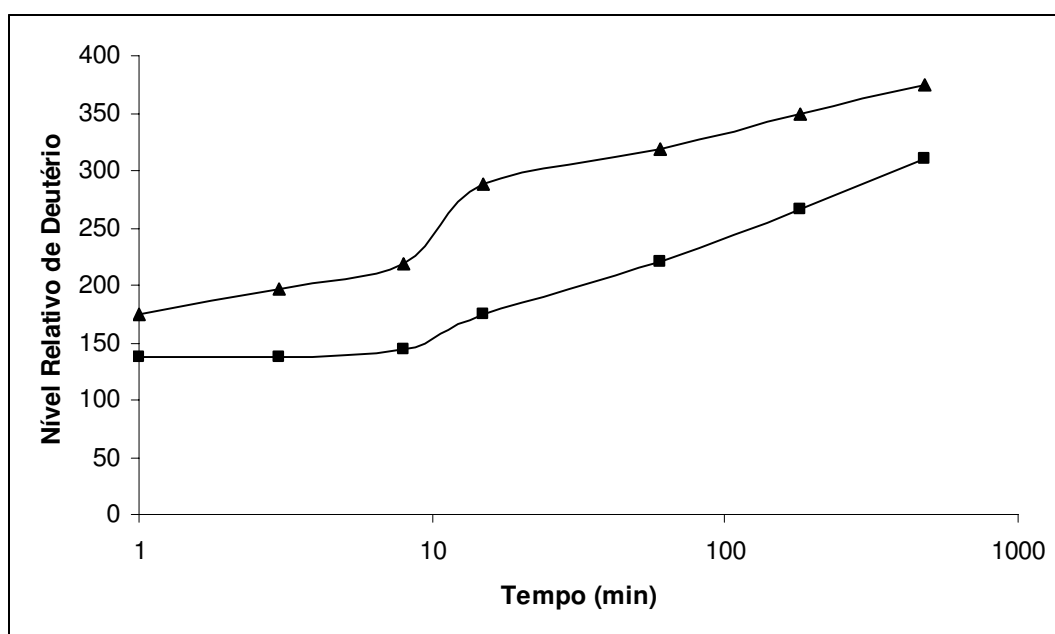
Um aumento de 174 Da para a apoenzima e de 137Da para a forma complexada com o inibidor foi observado após 1 minuto de deuteração. Esse aumento de massa molecular observado está relacionado aos átomos de hidrogênios amida no esqueleto de carbonos- $\alpha$  que foram trocados por deutério. Esses valores não levam em consideração as perdas de deutério durante as análises devido à troca reversível (vide materiais e métodos, item 6.2.4). Uma vez que a perda na troca H/D reversível foi de 12 a 15% nas proteínas intactas, para a apoenzima MtEPSPS um número de aproximadamente 197 hidrogênios amida devem ter trocado com deutério, enquanto que na MtEPSPS complexada

com glifosato esse número ficou em torno de 152. Os átomos de hidrogênios amida que trocam dentro do espaço de tempo de 1 minuto a pD 7.0, provavelmente são aqueles que estão expostos ao solvente e comumente não participam das pontes de hidrogênio intramoleculares (Dharmasiri e Smith, 1997). Esse aumento de massa observado após 1 minuto de exposição ao solvente deuterado, provavelmente está relacionado com resíduos de aminoácidos pertencentes a uma região altamente dinâmica da molécula. Uma análise comparativa das figuras 7B e 7C permite facilmente a observação de que à partir de 1 minuto de incubação a 25°C, a apoenzima apresenta massas moleculares maiores que a enzima ligada ao inibidor; isso sugere que a extensão das trocas H/D é muito maior na apoenzima, que na enzima complexada ao glifosato.

Percebe-se ainda na figura 8 que durante todo o tempo de curso da experimentação, sempre houve uma diferença no nível de deutério incorporado entre as duas formas enzimáticas, refletindo as diferenças conformacionais entre a apoenzima e a sua forma complexada com o inibidor.

A massa molecular da MtEPSPS continuou a aumentar durante o tempo de curso do experimento, apresentando um aumento de 365 Da após 8 horas para a apoenzima, e de 301 Da para a forma complexada ao glifosato. Considerando-se a correção da troca H/D reversível para ambas as formas da enzima, o aumento pode atingir em torno de 400 Da para a apoenzima e 330 Da para a enzima complexada ao inibidor. O aumento máximo em massa hipoteticamente admissível, devido à deuteração de todos os nitrogênios amida do esqueleto de carbonos-(na molécula de MtEPSPS é de 415 Da. Isso ocorre porque a molécula da MtEPSPS apresenta 450 resíduos de aminoácidos na sua seqüência primária, e desse número devem ser descontados 33 resíduos de prolina (que

não permitem trocas H/D), mais os grupos N-terminal e C-terminal, os quais sempre perdem o átomo de deutério incorporado durante as análises, devido à rapidez da troca reversível (Smith *et al.*; 1997). Há portanto, 50 resíduos de aminoácidos na apoenzima que não realizam troca H/D durante 8 horas; esse número é de 114 para a MtEPSPS complexada com glifosato. Esses valores, juntamente com os resultados apresentados na figura 8, fornecem uma forte evidência de que a MtEPSPS complexada com glifosato é menos acessível ao solvente, quando comparado à apoenzima. O fato de ambas as curvas serem mais ou menos paralelas durante todo o experimento (figura 8) sugere que ambas as formas da enzima sofrem processos dinâmicos semelhantes, porém em diferentes proporções, respeitando as características estruturais de cada forma enzimática.



**Figura 8:** Comparação do nível relativo de deutério encontrado na MtEPSPS complexada com o herbicida glifosato (■) e na apoenzima (▲). O número máximo de hidrogênios trocáveis no esqueleto de carbonos- $\alpha$  da MtEPSPS é 415. Nota-se que a enzima complexada sempre incorporou menos deutério do que a forma apoenzimática. Esses resultados não foram ajustados para a troca H/D reversível.

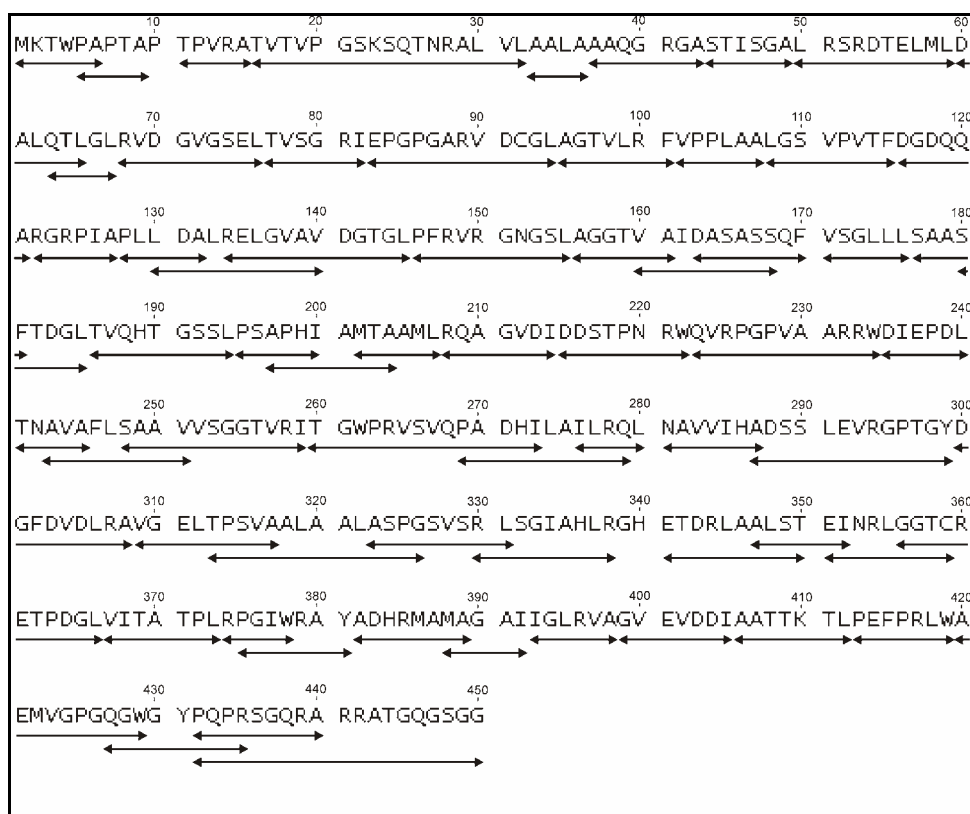
A troca H/D foi realizada para ambas as formas da enzima MtEPSPS em condições idênticas, o que nos permitiu uma comparação direta das curvas de troca entre as formas enzimáticas, sem a necessidade da correção da troca (H/D) reversível.

Os resíduos de aminoácidos que não realizaram troca H/D durante o tempo de experimentação podem estar relacionados com resíduos altamente protegidos dentro da molécula, e/ou com resíduos que participam de pontes de hidrogênio intramoleculares, onde o solvente provavelmente não pode ter o acesso necessário para que ocorra a troca H/D. Tais resíduos normalmente trocam via cinética EX2, onde muitos processos de desenovelamento e enovelamento localizados (de forma muito rápida) devem ocorrer para que ocorra a troca H/D (Engen e Smith, 2000).

#### **7.1.1.2. Troca H/D em fragmentos pépticos**

A diferença no nível relativo de deutério entre as duas curvas de incorporação para as duas formas enzimáticas da MtEPSPS (figura 8) foi em média de 78 resíduos, não considerando a troca H/D reversível. As incorporações de deutério nas formas enzimáticas intactas nos forneceram diferenças globais entre a apoenzima e a enzima complexada ao glifosato. Porém, esse dado não nos fornece informações a respeito de regiões específicas dentro da estrutura da enzima que sofreram troca H/D. Para determinar quais regiões sofreram troca isotópica na estrutura protéica, uma digestão péptica foi realizada em ambas as formas da MtEPSPS (apoenzima e enzima complexada), após as mesmas terem sido submetidas à trocas H/D. O uso da pepsina nos estudos de troca H/D tem sido extensivamente descritos (Zhang e Smith, 1993; Smith et al.; 1997; Engen e Smith, 2000). Tendo por finalidade a localização da troca H/D em regiões específicas da

enzima, os fragmentos peptídicos produzidos durante a digestão foram identificados inicialmente por LC-MS, e posteriormente por LC-MS/MS. A massa desses peptídeos foi analisada e o nível de deutério incorporado nos diferentes tempos de incubação determinados, tanto para a apoenzima como para a MtEPSPS complexada com glifosato. Esses resultados foram utilizados para localizar os sítios de incorporação de deutério, e permitir uma avaliação comparativa de onde a incorporação de deutério entre as duas formas enzimáticas foi diferente. A digestão péptica produziu 67 fragmentos peptídicos (figura 9), os quais cobriram aproximadamente 98,44% da seqüência primária da enzima.



**Figura 9:** Seqüência de aminoácidos da MtEPSPS com seu respectivo padrão de clivagem péptica. Cada peptídeo fragmento está identificado com uma linha sob a seqüência da proteína.



O percentual de troca H/D nas duas formas enzimáticas em função do tempo (1, 3, 8, 15, 60 minutos, 3 e 8 horas) é claramente diferente entre a apoenzima e a enzima complexada com glifosato, como mostrado nas figuras 10A e 10B, respectivamente. A região N-terminal para ambas as formas da enzima (fragmentos de 1-6 e de 5-10) trocou muito rapidamente, com aproximadamente 80% de seus átomos de hidrogênios amida sendo trocados por deutérios dentro do primeiro minuto (figura 10A e 10B). Essa troca rápida é justificada, provavelmente, pelo fato do N-terminal em ambas as formas enzimáticas, estar localizado numa região de estrutura secundária bastante acessível ao solvente do meio.

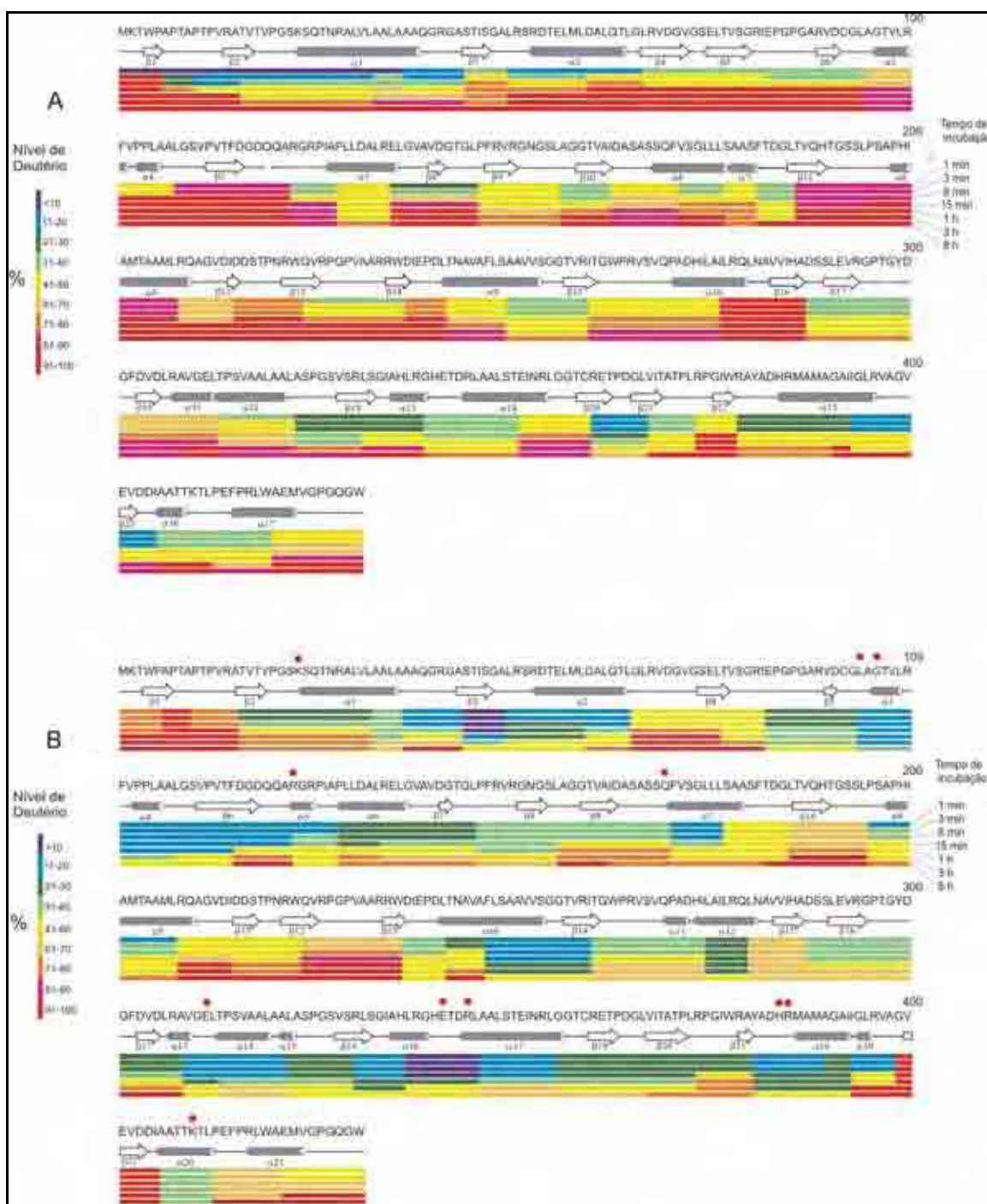
Utilizando-se dos dados de deuteração para cada peptídeo (resultados apresentados nos anexos 1 e 2), obtidos para a MtEPSPS em ausência e presença do inibidor, foi criado um padrão de cores para representar os níveis de deuteração de cada trecho de seqüência primária e de estrutura secundária, para as duas formas da enzima, conforme mostrado na figura 10. A imagem respeita o padrão de coloração comumente utilizado na literatura. As regiões menos acessíveis ao solvente (menos susceptíveis às trocas H/D) estão representadas em cor azul escuro, enquanto que as regiões mais acessíveis ao solvente estão representadas na cor vermelha (Yan *et al.*; 2004).

Uma análise detalhada da figura 10A revela que diferentes regiões da apoenzima apresentam diferentes dinâmicas conformacionais, como por exemplo: o peptídeo 16-32 mostra-se bastante resistente à troca H/D e assim se mantém até os 60 minutos de incubação. Algo semelhante ocorre com os peptídeos 313-326 e 367-373, que se mostraram medianamente susceptíveis à troca H/D durante a incubação à 25°C; enquanto isso, outras regiões da apoenzima que inicialmente apresentavam-se

medianamente rígidos, tornam-se altamente susceptíveis á troca H/D em função do tempo de incubação. Entre esses peptídeos, incluem-se os fragmentos 186 - 194, 208 - 214, 215 - 222, 223 -234, 276 - 280 e 281 – 287, os quais contém resíduos de aminoácidos que devem provavelmente, ter sua exposição ao solvente deuterado aumentada ao longo do tempo de curso do experimento.

Ainda para a apoenzima (figura 10A), observa-se que os fragmentos 108 – 115, 116 – 121, 186 – 194, 208- 214, 223 – 234, 276 – 280 e 281 – 287 mantiveram-se sempre com elevada velocidade de troca H/D durante todo o experimento. Tais regiões apresentam elevadas superfícies de contato com o solvente, sendo bastante dinâmicas em termos de susceptibilidade a mudanças conformacionais (dados não mostrados). Inclusive, uma análise minuciosa dos envelopes de picos (com resolução monoisotópica) de cada um desses fragmentos, observados durante os procedimentos de LC-MS (dados não mostrados) revela que os mesmos sofrem mecanismos de troca do tipo EX1, onde tais regiões da molécula passam grande parte do tempo no estado “parcialmente desenovelado”.

Analisando-se detalhadamente a figura 10B, tornam-se claras as evidências de que em presença do inibidor glifosato, a enzima MtEPSPS troca os hidrogênios amida do esqueleto de carbonos- $\alpha$  de forma mais lenta. Isto sugere que, de maneira geral, ocorrem várias mudanças conformacionais na MtEPSPS, quando da complexação com o glifosato. Esse resultado indica que o complexo MtEPSPS-glifosato se tornou mais rígido que a apoenzima.



**Figura 10:** Representação dos níveis de deutério da apoenzima EPSPS (A) e da EPSPS complexada com glifosato (B), baseado num padrão de cores em sete diferentes tempos de incubação a 25°C (1, 3, 8, 15, 60 minutos, 3 e 8 horas). A figura também mostra a seqüência primária e as estruturas secundárias de cada forma da enzima. Os resíduos de aminoácidos que participam do sítio de ligação com o inibidor (glifosato) estão assinalados por pontos vermelhos no esquema da figura 10B.

As regiões da MtEPSPS que interagem com glifosato mostram uma baixa velocidade de troca e isso se deve provavelmente a uma diminuição da área acessível ao solvente, e um aumento no número de pontes de hidrogênio nessas regiões. Schonbrunn *et al.*; 2001 têm mostrado que em presença de glifosato, a enzima MtEPSPS sofre importantes mudanças conformacionais, porém as identificações dessas mudanças não foram realizadas. Algumas dessas mudanças conformacionais puderam ser descritas à partir dos resultados experimentais deste trabalho, da seguinte maneira:

⇒ O fragmento 10 - 15 que se apresentava com trocas rápidas na apoenzima, tornou-se pouco susceptível ao solvente na enzima complexada com seu inibidor;

⇒ O fragmento 16-32, que na apoenzima se apresentou medianamente exposto ao solvente após 15 minutos de incubação à 25°C, tornou-se resistente às modificações conformacionais, mesmo após 60 minutos de incubação com o solvente deuterado, na enzima complexada com glifosato;

⇒ Várias regiões da apoenzima que eram mais dinâmicas, tornaram-se mais protegidas contra tal exposição e, portanto, menos susceptíveis à troca H/D, em consequência da complexação da enzima com seu inibidor. Tais regiões foram: 63 – 67, 68 – 77, 83 – 94, 102 – 107, 108 – 115, 116 – 121, 122 – 127, 202 – 207, 223 – 234, 276 – 280, 281 – 287, 330 – 338, 335 – 345 e 374 – 378;

⇒ Uma única região da MtEPSPS complexada ao inibidor tornou-se mais susceptível à troca H/D, em comparação com a apoenzima, representada pelo fragmento 399 – 405.

É importante salientar que os peptídeos fragmentos que possuem resíduos de aminoácidos que participam do sítio de ligação com o inibidor (glifosato), estão entre aqueles que se tornaram menos susceptíveis a sofrer processos de desenovelamento e enovelamento e, portanto, mais resistentes à troca H/D em função da ligação da enzima ao inibidor, conforme se pode observar na figura 10B. Tais resíduos de aminoácidos encontram-se nos fragmentos 16 – 32, 83 – 94, 95 – 101, 122 – 127, 163 – 170, 309 – 317, 335 – 340, 382 – 389 e 406 – 412 (representados por pontos vermelhos na figura 10B). Uma análise cuidadosa da forma, distribuição e deslocamento dos envelopes de picos de íons moleculares (com resolução monoisotópica) para cada um desses peptídeos, observados nos procedimentos de LC-MS, revela que os mesmos sofrem mudanças conformacionais por processos de desenovelamento e enovelamento que levam a trocas H/D do tipo EX2. Nesse processo, a região se desenovela parcialmente, voltando a se enovelar muito rapidamente, sendo comuns sob condições fisiológicas. Fenômeno semelhante foi relatado nos estudos de dinâmica conformacional do receptor retinóide-X em presença de seu ligante, o ácido retinóico (Yan *et al.*; 2004).

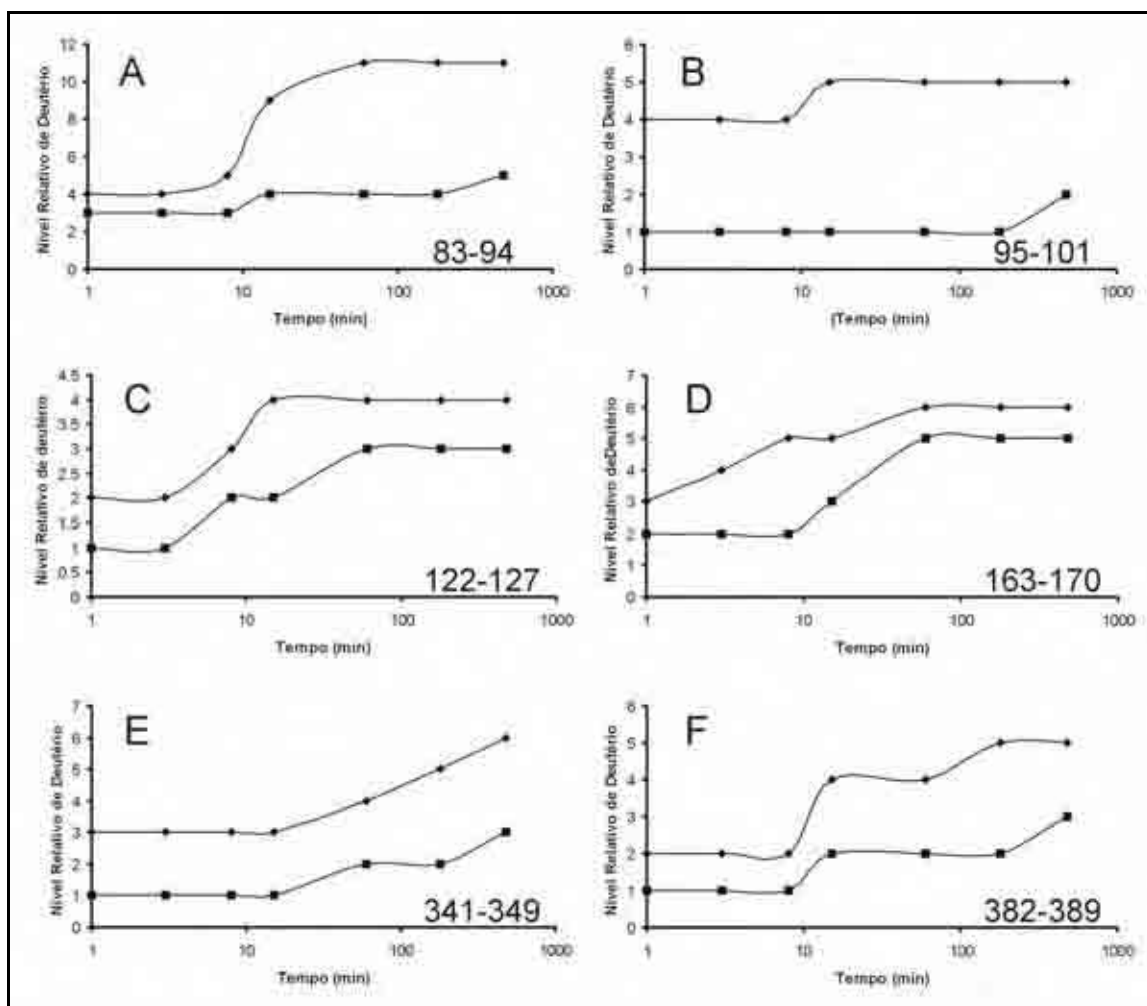
Os resultados para a troca H/D em peptídeos pépsicos na presença e ausência de glifosato estão mostrados na figura 11 para um grupo representativo de peptídeos obtidos a partir da digestão pépsica da MtEPSPS. Os níveis de deutério nesses peptídeos foram analisados diretamente por LC-MS. Os resultados mostrados na figura 11 evidenciam que os fragmentos peptídicos que apresentam resíduos de aminoácidos, que interagem com o glifosato (peptídeos 83 – 94, 95 – 101, 122 – 127, 163 – 170, 341 – 349, 382 – 389), exibem uma diminuição significativa na quantidade de deutério incorporado. Portanto, parece coerente que algum tipo de alteração conformacional resulte numa

proteção contra a troca H/D nessas regiões após a ligação do inibidor, provavelmente com a finalidade de aproximar e orientar adequadamente os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do glifosato.

Esses resultados indicam que a interação do ligante com o sítio ativo da enzima provoca uma diminuição do acesso ao solvente em torno dos resíduos que realizam as pontes de hidrogênio entre a enzima e o inibidor. A proteção contra a troca H/D dos hidrogênios amida é, entretanto, também evidente em outras regiões do complexo enzima-inibidor (figura 10).

Os fragmentos pépticos representados na figura 11 contêm alguns daqueles peptídeos que apresentam resíduos de aminoácidos envolvidos na interação do glifosato com a enzima MtEPSPS. Essas regiões geralmente apresentam uma velocidade de troca H/D mais rápida quando o inibidor está ausente, indicando que as ligações amida do esqueleto de carbonos- $\alpha$  estão mais acessíveis ao solvente e/ou estão sob a ação de fracas pontes de hidrogênio. Muitas dessas regiões apresentaram uma diferença na incorporação de deutério já no primeiro minuto em torno de 50%, como no fragmento 95-101 (figura 11B). Esses resultados podem ser explicados com base na taxa diferencial de troca na apoenzima e na enzima complexada com o ligante. Para a apoenzima, há inicialmente um rápido aumento no nível de deutério. Na enzima complexada, essa taxa de troca é reduzida (figura 8). De uma maneira geral, a maioria desses peptídeos apresentam curvas de deuteração relativamente paralelas, na maior parte do tempo de incubação, para ambas as formas da enzima (apoenzima e enzima complexada com glifosato), indicando que em

ambas as condições a dinâmica de mudanças conformacionais é do mesmo tipo, exceto pelas diferenças de intensidade.



**Figura 11:** Nível Relativo de deutério em função do tempo para seis fragmentos representativos da digestão péptica da MtEPSPS: (A) 83-94, (B) 95-101, (C) 122-127, (D) 163-170, (E) 341-349 e (F) 382-389. (■) representa a enzima EPSPS complexada ao glifosato e (◆) representa a apoenzima. Nota-se que a enzima complexada sempre incorporou menos deutério do que a forma apoenzimática. Esses resultados não foram ajustados para a troca H/D reversível.

Resíduos que fazem parte do sítio de ligação com o inibidor e resíduos adjacentes, que trocam rapidamente, sugerem uma flexibilidade estrutural necessária para a ocorrência de uma mudança conformacional quando na presença desse ligante.

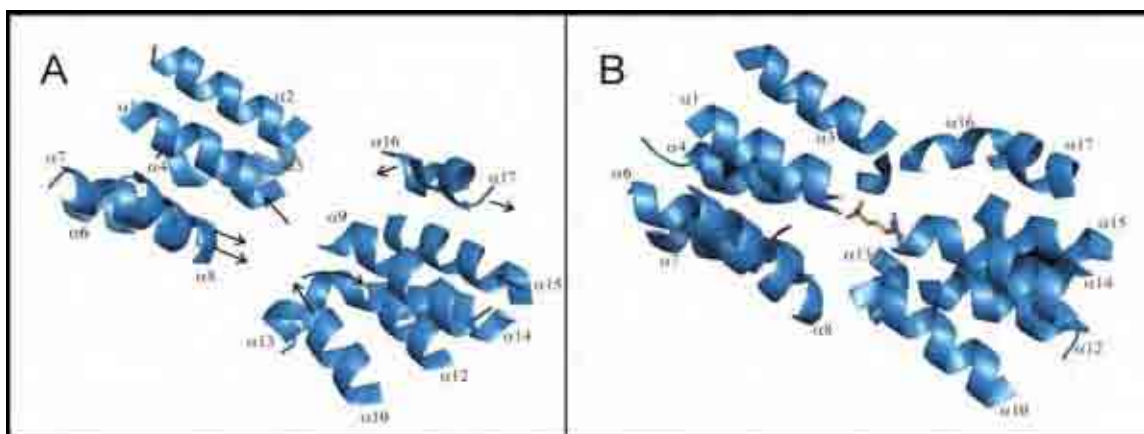
Resultados comparativos de modelagem molecular entre a apoenzima e a enzima complexada ao inibidor, sugerem que a interação da enzima com o glifosato induz extensas mudanças conformacionais na molécula de MtEPSPS, tornando-a mais estruturada, mais organizada ao nível de estrutura secundária e conseqüentemente mais compacta. Isto é coerente com o atributo que lhe foi conferido na literatura de forma “aberta” na ausência de ligantes, e forma “fechada” em presença de ligantes (Pereira *et al.*; 2003).

Considerando-se que a estrutura de grande parte da apoenzima sofre mudanças conformacionais para se “ajustar” à presença de um ligante (glifosato), decidiu-se examinar em detalhes as regiões da molécula que constituem o sítio de ligação do inibidor e sua vizinhança, ao nível de estrutura tridimensional, de ambas as formas da enzima. O inibidor se liga à enzima ocupando todos os sítios de ligação do fosfoenolpiruvato (PEP) e alguns dos sítios de ligação do chiquimato-3-fosfato (S-3-P). Assim, os resíduos de aminoácidos envolvidos na complexação do glifosato pela MtEPSPS são: Lys 23 (fragmento 16 – 32;  $\alpha$ 1), Leu 94 (fragmento 83 – 94; coil), Gly 96 (fragmento 95 – 101;  $\alpha$ 3), Arg 124 (fragmento 122 – 127;  $\alpha$ 5), Gln 169 (fragmento 163 – 170;  $\alpha$ 7), Glu 311 (fragmento 309 – 317, coil), Glu 341 / Arg 344 (fragmento 341 – 349, coil /  $\alpha$ 17), His 384 / Arg 385 (fragmento 382 – 389; coil /  $\alpha$ 18) e Lys 410 (fragmento 406 – 412;  $\alpha$ 20) (Pereira *et al.*; 2003).



Pode-se observar que sete desses resíduos localizam-se em regiões que apresentam estrutura secundária em hélice- $\alpha$  e que tais regiões estão entre aquelas que sofreram mudanças conformacionais, no sentido de se orientarem melhor no espaço, para permitir interações otimizadas entre a enzima e seu inibidor, tornando a molécula de MtEPSPS mais compacta e menos susceptível à troca H/D.

Procurando detalhes da estrutura tridimensional de cada forma da MtEPSPS (aberta e fechada), escolheu-se o mesmo ângulo de visão, representado na figura 12, onde estão representadas somente as estruturas em hélices- $\alpha$  em torno do sítio de ligação do glifosato, tanto para a apoenzima (figura 12A), como para a enzima complexada com glifosato (figura 12B). Nestas figuras estão identificadas cada hélice- $\alpha$  e na figura 12A, as setas estão indicando as direções dos movimentos a serem realizados por algumas dessas hélices- $\alpha$ . Uma comparação entre essas duas representações (figuras 12A e 12B), as quais estão na mesma escala, revela que a maioria das hélices- $\alpha$  se deslocam na direção do glifosato, sendo que várias delas aparentam ter se alongado (tornaram-se mais extensas), isto é, apresentam um número maior de passos. Esta observação pode sugerir que estaria ocorrendo um afinilamento das hélices- $\alpha$  em direção ao inibidor, acompanhado de um aumento no percentual dessas estruturas em hélice- $\alpha$ , ao longo da seqüência primária da enzima.

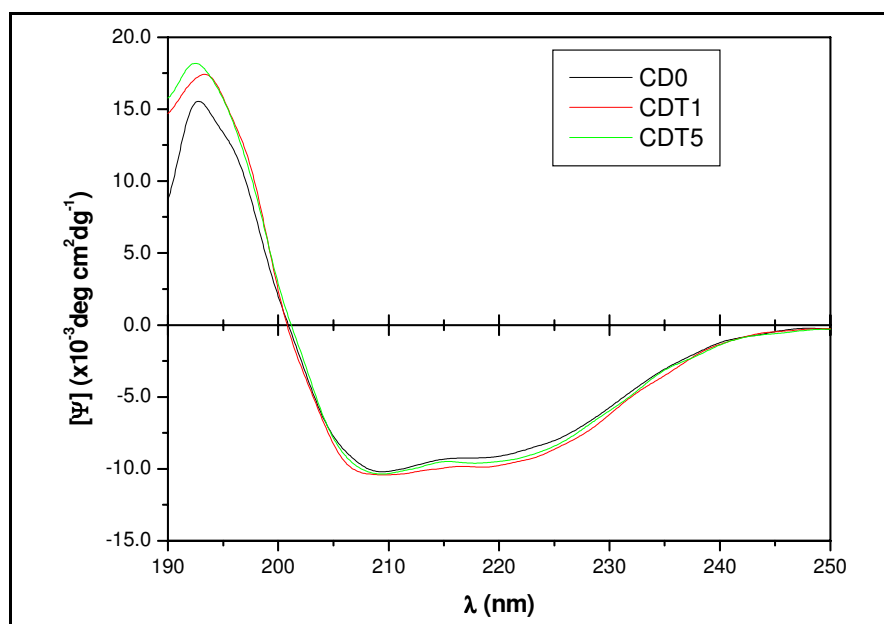


**Figura 12:** (A) Hélices- $\alpha$  na apoenzima MtEPSPS e (B) hélices- $\alpha$  na MtEPSPS na presença de glifosato.

### 7.1.2. Dicroísmo circular

Com a finalidade de checar tal observação, a MtEPSPS foi submetida à análises de dicroísmo circular, tanto na presença no como na ausência de glifosato.

As frações de estruturas secundárias foram calculadas a partir da deconvolução dos espectros CD, utilizando-se como referencia os espectros padrões de randon-coil, hélice- $\alpha$  e folha  $\beta$ , obtidos a partir de soluções de poli-L-lisina em solução aquosa e pH neutro (randon coil), pH=11 (hélice- $\alpha$ ) e a mesma aquecida até 50°C, seguida por posterior resfriamento (folha  $\beta$ ), respectivamente. Os resultados obtidos da deconvolução espectral mostram que a MtEPSPS em ausência de glifosato é composta por 40% de hélice- $\alpha$ ; 30% de folha- $\beta$  e 30% de randon-coil (espectro CD0) (figura 13).



**Figura 13:** Espectro de dicroísmo circular obtido para a EPSPS na presença e ausência de glifosato onde CD0 = amostra sem ligante (—); CDT1 = amostra mais glifosato após 1 minuto da adição do ligante à solução (—); CDT5 = amostra mais glifosato após 1 hora da adição do ligante à solução (—).

Logo após a adição de glifosato à solução (espectro CDT1) observa-se um aumento da fração de hélice- $\alpha$  (49%) com a diminuição de folhas- $\beta$  (26%) e randon-coil (25%), e após uma hora (CDT5) observa-se que a fração de hélice- $\alpha$  estabiliza-se em 57%, a fração de folha  $\beta$  em 23% e a de randon-coil em 21%. Estes dados mostram que houve interação entre o inibidor e a enzima produzindo um acentuado aumento na fração de hélice- $\alpha$ , de 40% para 57%, acompanhado de uma diminuição da fração de folha- $\beta$  de 30% para 23% e de randon-coil de 30% para 21%, uma hora após a adição de glifosato à solução de MtEPSPS. Estes resultados indicam fortemente que a interação da enzima com o inibidor foi acompanhada de um aumento das estruturas secundárias em hélice- $\alpha$ , tornando

a forma fechada mais organizada estruturalmente que a forma aberta, corroborando as observações feitas mais acima, sobre a importância funcional destas mudanças conformacionais.

## **7.2. Enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato Sintase em presença de fosfoenolpiruvato**

### **7.2.1. Troca Hidrogênio / Deutério (H/D) e alterações conformacionais**

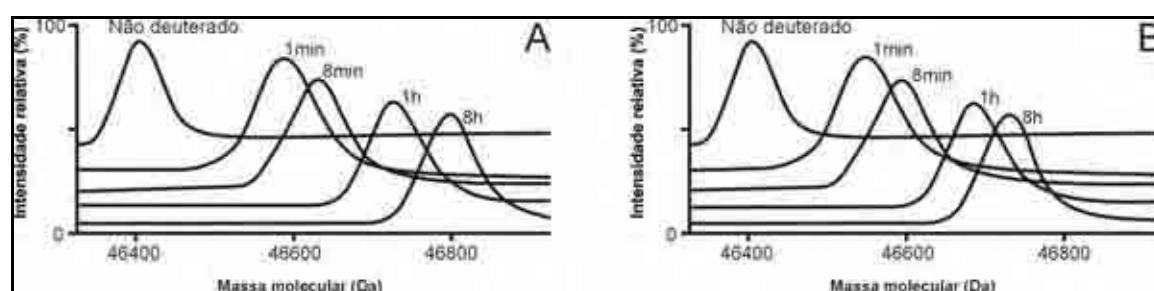
#### **7.2.1.1. Troca H/D na enzima MtEPSPS intacta**

A troca dos hidrogênios amida na apoenzima MtEPSPS e na sua forma complexada com o substrato fosfoenolpiruvato (PEP) foi medida através da incubação da enzima em diferentes tempos de incubação em água deuterada, tanto na presença quanto na ausência de fosfoenolpiruvato. O tempo máximo de exposição ao solvente deuterado foi de 8 horas.

A incorporação de deutério na apoenzima MtEPSPS e na sua forma complexada com o fosfoenolpiruvato (PEP), ambas intactas, foi comparada por espectrometria de massas. Experimentos com tempo de curso de até 8 horas foram realizados para a MtEPSPS, tanto na ausência como na presença do seu substrato, o fosfoenolpiruvato (PEP). A figura 14 mostra os espectros deconvoluídos para cada uma das situações.

A cada intervalo de tempo pré-determinado, alíquotas tanto da apoenzima quanto da forma complexada ao fosfoenolpiruvato tiveram suas reações de deuteração amortizadas através da diminuição do pH e da temperatura. Essas alíquotas foram então digeridas com pepsina e os peptídeos resultantes analisados por LC-MS e LC-MS/MS.

Estas análises de espectrometria de massas tiveram por objetivo monitorar o aumento tempo-dependente em massa dos peptídeos analisados. Esses resultados relatam diferentes níveis de troca isotópica H / D dentro de diferentes regiões da enzima.



**Figura 14:** (A) Espectros ESI-MS deconvoluídos obtidos para a apoenzima MtEPSPS em diferentes tempos de exposição ao solvente deuterado. Os tempos nesses experimentos variaram de 1 minuto a 8 horas. (B) Espectros ESI-MS deconvoluídos obtidos para a enzima MtEPSPS complexada com fosfoenolpiruvato nas mesmas condições de tempos de exposição ao solvente deuterado de A.

Os valores de massas médias para a enzima MtEPSPS tanto na ausência como na presença do fosfoenolpiruvato em cada tempo de incubação no solvente deuterado, foi determinada e estão apresentados na figura 15.

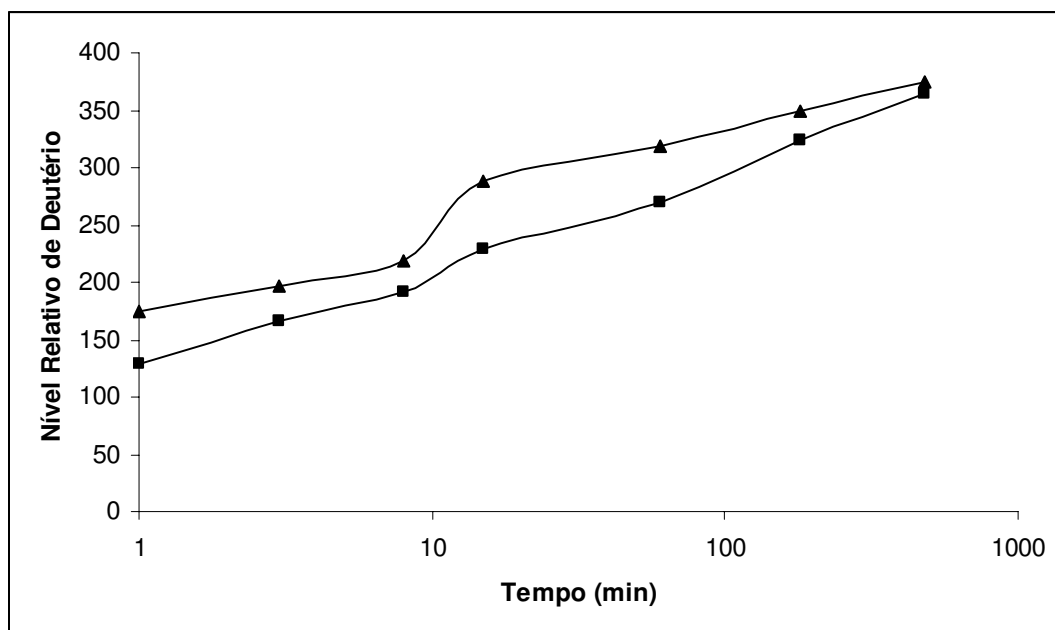
Após 1 minuto de exposição ao solvente deuterado, a massa molecular da apoenzima aumentou em 174 Da e para o complexo enzimático EPSPS-PEP, esse aumento foi de 129 Da, ou seja, 41,8% dos hidrogênios amida da apoenzima e 31% dos hidrogênios amida na MtEPSPS complexada com fosfoenolpiruvato foram acessíveis ao solvente deuterado. Os hidrogênios amida que trocam dentro do espaço de tempo de 1 minuto a pD 7.0 provavelmente são aqueles que estão expostos ao solvente e comumente não participam das pontes de hidrogênio intramoleculares (Dharmasiri e Smith, 1996). Esse aumento de massa observado após 1 minuto de exposição ao solvente deuterado está relacionado,

provavelmente, com a exposição ao solvente dos resíduos de aminoácidos pertencentes a regiões de estrutura secundária desorganizada e que são mais flexíveis na estrutura terciária da enzima.

Após 8 horas de deuteração, a massa molecular para a apoenzima aumentou em 365Da, enquanto que no complexo EPSPS-PEP, o aumento observado foi de 363 Da, ou seja, 87,54% dos hidrogênios amida da apoenzima sofreram deuteração enquanto que na enzima ligada ao fosfoenopiruvato, esse percentual ficou em torno de 87,25%. Esse aumento de massa molecular observado está relacionado à troca H/D dos átomos de hidrogênios amida no esqueleto de carbonos- $\alpha$ . Esses valores não levam em consideração as perdas de deutério durante as análises devido à troca reversível. Entretanto e uma vez que a perda na troca H / D reversível pode ter ficado em torno de 12 a 15% nas proteínas intactas, para a apoenzima MtEPSPS um número de aproximadamente 197 hidrogênios amida devem ter trocado com deutério após um minuto, enquanto que na MtEPSPS complexada com o fosfoenolpiruvato esse número ficou em torno de 149.

Após 8 horas de exposição ao solvente deuterado, valores de deuteração muito parecidos foram apresentados tanto para a apoenzima MtEPSPS quanto para a forma complexada ao fosfoenolpiruvato. Isso sugere, provavelmente, que a MtEPSPS complexada ao fosfoenolpiruvato apresenta alterações conformacionais mais amplas que a EPSPS na presença do inibidor glifosato, no sentido de proporcionar a catálise da reação entre o chiquimato-3-fosfato (S3P) e o fosfoenolpituvato (PEP), formando o 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato. Esses resultados demonstram claramente a maior rigidez e estabilidade do complexo EPSPS-glifosato em relação ao complexo EPSPS-fosfoenolpiruvato e à apoenzima, respectivamente.

Considerando-se a correção da troca H/D reversível para a apoenzima e para o complexo EPSPS-PEP, o aumento, para ambas as formas enzimáticas pode atingir algo em torno 400 Da.



**Figura 15:** Comparação do nível relativo de deutério encontrado na MtEPSPS complexada com o substrato fosfoenolpiruvato (■) e na apoenzima (▲). O número máximo de hidrogênios trocáveis no esqueleto de carbonos- $\alpha$  da MtEPSPS é 415. Nota-se que a enzima complexada sempre incorporou menos deutério do que a forma apoenzimática. Esses resultados não foram ajustados para a troca H/D reversível.

Como mostra a figura 15, tanto a apoenzima, com a forma complexada ao fosfoenolpiruvato, apresentam pequenas diferenças nas formas das curvas de deuteração. Nota-se, entretanto, que de forma geral houve uma semelhança nas curvas para ambas as formas enzimáticas, as quais são de maneira geral paralelas, evidenciando processos dinâmicos semelhantes, porém em pequenas e diferentes proporções, pois ao longo de todo o experimento a apoenzima sempre apresentou uma incorporação maior de deutério, refletindo uma maior acessibilidade ao solvente e também um número menor de pontes de

hidrogênio nesta forma. Essas pontes de hidrogênio podem também ser fracas, possibilitando, assim, uma maior mobilidade da estrutura terciária apoenzimática. Portanto, é coerente inferir que a apoenzima parece ser um pouco menos estruturada que o complexo EPSPS-PEP, sugerindo que a ligação do fosfoenolpiruvato à enzima causou certa compactação da estrutura tridimensional da MtEPSPS, diminuindo o acesso do solvente ao interior da proteína.

Após 8 horas de exposição ao solvente deuterado, apesar da pequena diferença observada entre os níveis totais de deutério incorporado entre ambas as formas enzimáticas, é importante evidenciar que maior a diferença na incorporação de deutério entre a apoenzima e o complexo EPSPS-PEP ocorreu no intervalo de 1 a 60 minutos. Em proteínas enoveladas, alguns resíduos de aminoácidos estão envolvidos na formação de pontes de hidrogênio intramoleculares que impossibilitam a acessibilidade do solvente deuterado ao esqueleto de carbonos- $\alpha$ , impossibilitando a troca H/D (Engen & Smith, 2000). Portanto, a diferença na incorporação de deutério observada neste intervalo de tempo é, provavelmente, ocasionada por uma maior rigidez do complexo EPSPS-PEP, resultado do maior número de pontes de hidrogênio induzidas pela ligação do substrato fosfoenolpiruvato à enzima. Os resíduos de aminoácidos envolvidos neste tipo de ligação geralmente estão sob efeitos da cinética EX2, onde a proteína deve necessariamente assumir várias vezes seu estado desenovelado, antes da troca isotópica estar completada. Assim, após 60 minutos, algumas destas ligações devem ter se rompido, aumentando a acessibilidade do solvente ao complexo EPSPS-PEP, que passa posteriormente a apresentar uma incorporação de deutério semelhante à apoenzima, devido à ocorrência de novas mudanças conformacionais localizadas.



A troca H/D foi realizada para ambas as formas da enzima MtEPSPS em condições idênticas, o que nos permitiu uma comparação direta das curvas de troca entre as duas formas enzimáticas, sem a necessidade da correção da troca (H/D) reversível.

Os resíduos de aminoácidos que não realizaram troca H/D durante o tempo de experimentação, podem estar relacionados com resíduos altamente protegidos dentro da molécula, e/ou com resíduos que participam de pontes de hidrogênio, onde o solvente provavelmente não tem o acesso necessário para que ocorra a troca H / D.

Para a MtEPSPS complexada ao fosfoenolpiruvato não foi possível relacionar os dados de troca isotópica hidrogênio / deutério com a estrutura secundária da enzima e também com traços da estrutura terciária em função de não existir, para a MtEPSPS na presença de fosfoenopituvato, nenhuma estrutura cristalográfica com as coordenadas tridimensionais depositadas no Protein Data Bank (PDB).

#### **7.2.1.2. Troca H/D em fragmentos pépsicos**

A diferença entre as curvas de incorporação de deutério apresentadas na figura 15 foi em média de 35Da, não considerando a troca parcial reversível. Como já citado anteriormente, esse resultado fornece uma informação a respeito de mudanças conformacionais globais que ocorrem na estrutura da enzima, mas não fornece dados a respeito de alterações localizadas na estrutura terciária da enzima.

Para determinar as regiões específicas que sofreram troca isotópica ao longo da estrutura protéica, uma digestão péptica foi realizada em ambas as formas da *MtEPSPS* (apoenzima e forma complexada ao PEP), após as mesmas terem sido submetidas a trocas H/D em diferentes tempos de incubação. Com o uso da pepsina e sob as condições de

amortização da reação de deuteração, a pH 2,5, é possível digerir as proteínas já deuteradas em peptídeos que podem ter de cinco a vinte resíduos de aminoácidos. Não é possível prever, somente com base na sequência primária da proteína, os sítios de clivagem da pepsina. Entretanto esta enzima apresenta uma atividade digestória altamente reprodutível quando as mesmas condições físico-químicas são mantidas.

Os fragmentos pépticos produzidos durante a digestão foram identificados por LC/MS e posteriormente por LC-MS/MS. A massa molecular desses peptídeos foi analisada e o nível de deutério determinado.

Utilizando-se dos dados da incorporação de deutério de cada fragmento peptídico identificado (resultados apresentados nos anexos 1 e 3), obtidos para a MtEPSPS na ausência e presença do seu substrato, foi criado um padrão de cores para representar os níveis de deuteração de cada trecho de sequência primária e de estrutura secundária, para as duas formas da enzima, conforme mostrado na figura 16.

A figura 16 mostra algumas importantes diferenças no padrão geral entre a apoenzima (figura 16A) e a enzima complexada ao substrato (PEP) (figura 16B). Algumas regiões da MtEPSPS complexada com o substrato fosfoenolpiruvato apresentaram uma maior proteção contra o acesso do solvente, se comparado à apoenzima. O peptídeo 44-49 mostra-se bastante resistente a deuteração no complexo MtEPSPS-PEP, especialmente nos primeiros 60 minutos de incubação. O mesmo ocorre nos peptídeos 102-107, 108-115, 116-121, 122-127, 128-132, 134-145, 146-155, 156-161 e 163-170, que formam uma longa região da molécula com resistência ao acesso do solvente deuterado e também nos fragmentos 202-207, 215-222, 235-240, 281-287 e 300-308. Essa resistência ao processo de deuteração, provavelmente é resultado de uma diminuição da área acessível ao solvente e

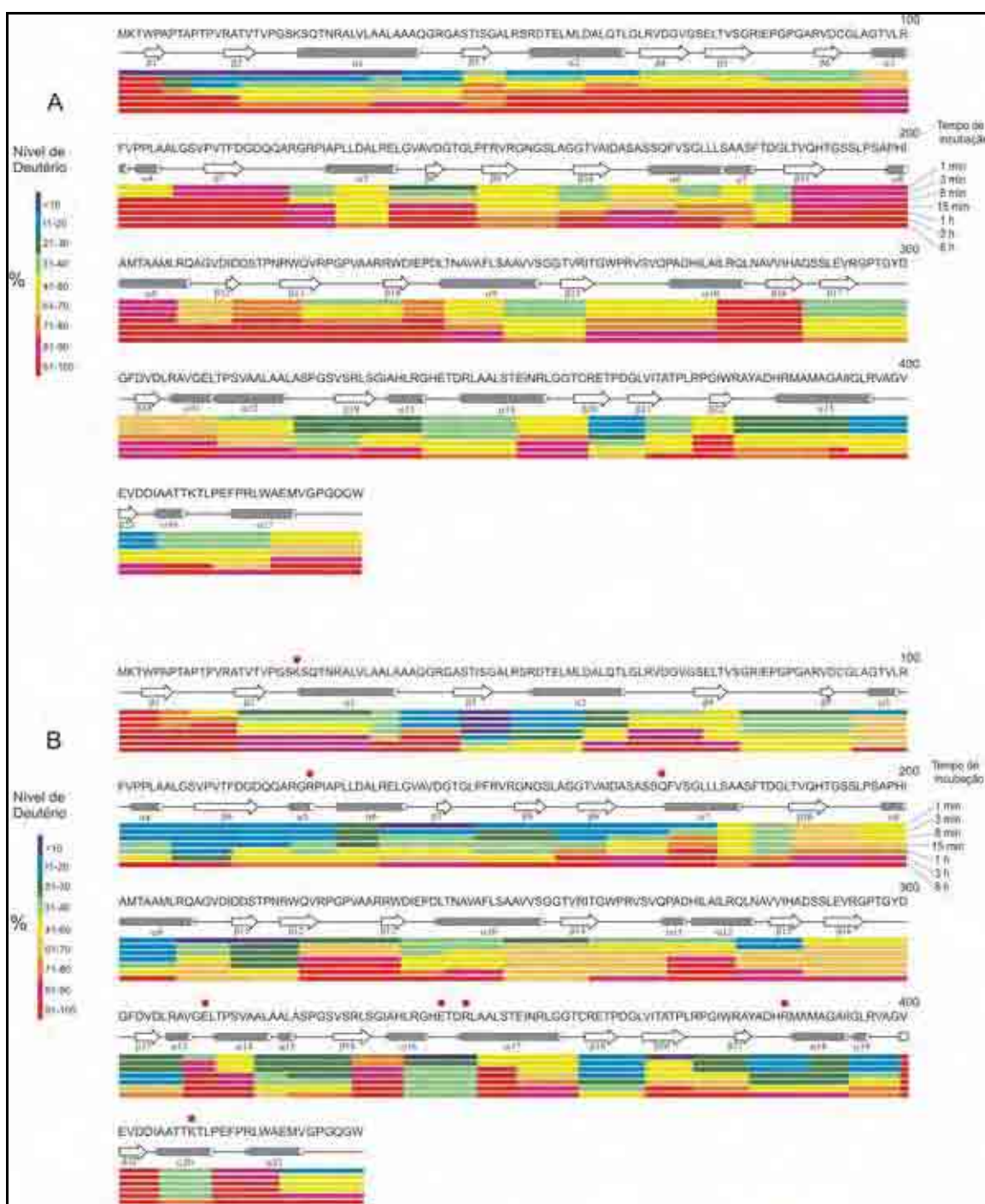
um aumento no número de pontes de hidrogênio nessas regiões, devido às modificações conformacionais induzidas pela complexação do PEP ao seu sítio de ligação na enzima.

Apesar das hélices- $\alpha$  serem na maioria dos casos mais resistentes às trocas, grande parte dos peptídeos que apresentaram uma maior rigidez no complexo enzima-substrato em relação à apoenzima, estão situados em regiões de estrutura secundária em folha- $\beta$ , localizadas na superfície da molécula.

Provavelmente as interações intramoleculares do fosfoenolpiruvato ao seu sítio catalítico conferem uma maior estabilidade ao interior da enzima, o que se reflete em um aumento das interações intramoleculares das regiões superficiais com o núcleo enzimático, aproximando fisicamente estas regiões, e conseqüentemente diminuindo a superfície de contato com o solvente deuterado, formando uma superfície mais rígida que serve como escudo de proteção contra entrada de solvente.

No entanto, algumas regiões do complexo enzima-substrato mostraram-se mais susceptíveis ao solvente, como no caso dos peptídeos 5-9, 10-15, 16-32, 260-273, 286-299, 313-319, 330-338, 347-352 (resultados não mostrados), 399-405 (figura 17E) e 413-419 (Figura 17F). Nas figuras 17E e 17F estão apresentados dois exemplos onde a incorporação de deutério foi maior no complexo MtEPSPS-PEP se comparado à apoenzima. É provável que a complexação da enzima ao fosfoenolpiruvato provavelmente expôs rapidamente estas regiões ao solvente deuterado, apresentando nos primeiros 15 minutos uma grande porcentagem de deuteração. Provavelmente, no complexo enzima-substrato, essas regiões da proteína aumentaram sua superfície de contato com o solvente, permitindo a rápida troca H/D.

A análise dos gráficos apresentados na figura 17 revela de maneira geral três grupos de fragmentos da digestão pepsica, com diferentes características. O primeiro grupo é formado pelos fragmentos que apresentaram comportamento semelhante entre si, onde o nível relativo de deuteração foi maior na apoenzima o tempo todo, porém sempre crescente nas duas formas da enzima. São pertencentes a esse grupo os peptídeos: 50-59 (Figura 17A), 122-127 (figura 17C), 63-67, 83-94, 102-107, 134-145, 146-155, 163-170, 186-194, 197-204, 195-200, 202-207, 235-240, 243- 251, 300-308, 341-349 e 382-389 (resultados não mostrados). Como esses casos foram muito repetitivos, apenas dois exemplos estão apresentados nas figuras 17A e 17C. O segundo destes grupos de peptídeos estão representados pelos fragmentos 5-9, 10-15, 286-299, 330-338, 347-352 (resultados não mostrados), 399-405 (figura 17E) e 413-419 (figura 17F) onde, durante o tempo todo do experimento, a apoenzima apresentou menor nível de deuteração em relação ao complexo EPSPS-PEP. Por último, os peptídeos 1-6, 16-32, 37-43, 68-76, 160-168, 177-181, 180-185, 223-234, 241-245, 260-273, 313-319, 322-331, 351-359, 356-366, 367-373, 374-378, 420-429 (resultados não mostrados) e 393-398 (figura 17D) representam regiões da enzima que apresentaram mudanças conformacionais constantes, sendo ora mais deuturada a apoenzima, ora a forma complexada com PEP.



**Figura 16:** Representação dos níveis de deutério da apoenzima (A) e da enzima complexada com fosfoenolpiruvato(B), baseado num padrão de cores em sete diferentes tempos de incubação a 25°C (1, 3, 8, 15, 60 minutos, 3 e 8 horas). A figura também mostra a seqüência primária e as estruturas secundárias de cada forma da enzima. Os resíduos de aminoácidos que participam do sítio de ligação com o substrato (PEP) estão assinalados por pontos vermelhos no esquema da figura 16B.

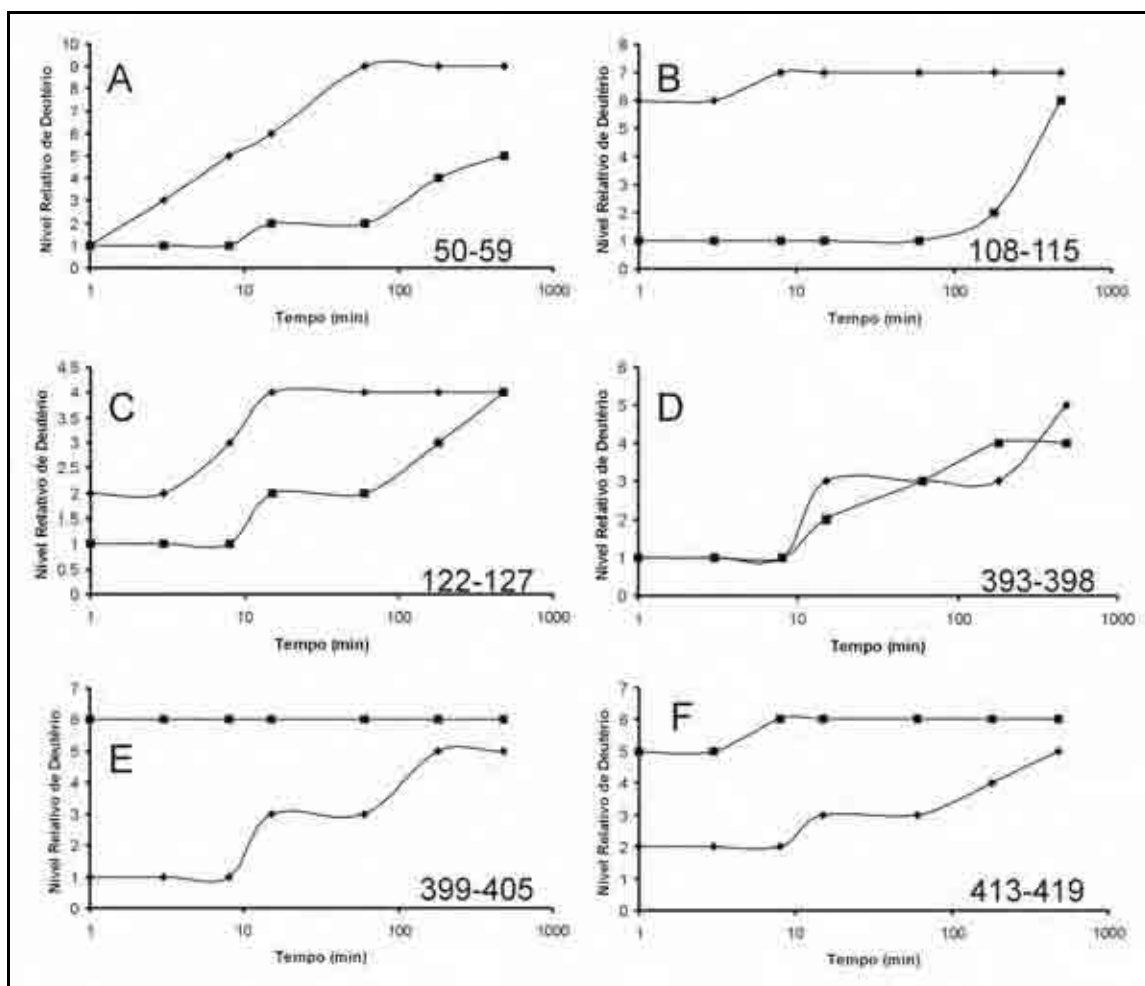
De uma maneira geral, a maioria dos peptídeos de ambas as formas da enzima, apresentou curvas de deuteração relativamente paralelas entre si, exceto pelas diferenças de intensidade. No entanto, alguns fragmentos revelaram um comportamento específico, não se encaixando em nenhum grupo anteriormente citado. Por exemplo, o peptídeo 108-115 (figura 17B) mostrou, na apoenzima, uma grande incorporação de deutério logo no início do experimento, diferente da curva do complexo EPSPS-PEP, que subiu rapidamente apenas no final do experimento. Essa mesma diferença inicial também foi observada no peptídeo 399-405 (figura 17 E), que no complexo EPSPS-PEP se mostra totalmente deuturado logo no início da incubação. Esse mesmo peptídeo, na apoenzima, tem uma curva de incorporação lenta e em duas etapas, evidenciando dois diferentes momentos de alterações conformacionais mais acentuadas em diferentes momentos da incubação (figura 17E). Já para o fragmento 50-59, observa-se, para a apoenzima, que logo no início da incubação ocorre uma subida acentuada e constante na incorporação de deutério, enquanto a curva do complexo EPSPS-PEP sobe lentamente e em etapas (figura 17A), evidenciando que para essa região, uma diferença no padrão dinâmico molecular da enzima, ocorre entre as duas situações analisadas.

Utilizando-se como base os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do fosfoenolpiruvato em EPSPS de *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa (Priestman *at. el.*, 2005), foi possível encontrar nove possíveis regiões bastante conservadas quando comparadas com a enzima de *M. tuberculosis*, contendo prováveis resíduos participantes do sítio de ligação do fosfoenolpiruvato na MtEPSPS. Os resíduos de aminoácidos potencialmente participantes do sítio de ligação do fosfoenolpiruvato na MtEPSPS são: Lys 23 (fragmento 16 – 32;  $\alpha 1$ ), Arg 124 (fragmento 122 – 127;  $\alpha 5$ ), Gln 169 (fragmento

163 – 170;  $\alpha 7$ ), Glu 311 (fragmento 309 – 317, coil), Glu 341/ Arg 344 (fragmento 341 – 349, coil /  $\alpha 17$ ), His 384 / Arg 385 (fragmento 382 – 389; coil /  $\alpha 18$ ) e Lys 410 (fragmento 406 – 412;  $\alpha 20$ ) . Estes resíduos estão assinalados com um círculo vermelho na figura 16B.

Pode-se notar que seis dos resíduos do sítio de ligação estão em regiões com estrutura secundária em hélice- $\alpha$  (localizadas no interior da apoenzima), que sofrem mudanças conformacionais para a acomodação do ligante (figura 16A e 16B). Com o fechamento da apoenzima, os dois domínios aproximam-se em um movimento de torção, fazendo com que a região do sítio de ligação do fosfoenolpiruvato torne-se mais organizada e compacta, diminuindo área acessível ao solvente deuterado. Isso é claramente observado nas diferenças de cores entre as figuras 16A e 16B, evidenciando que a maioria das regiões que contêm resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do PEP, apresentam-se mais rígidas e organizadas no complexo EPSPS-PEP, ou seja, com menor incorporação de deutério, especialmente na primeira hora de experimento.

Dessa forma, pode-se inferir que a apoenzima sofre mudanças conformacionais para se ajustar à presença do substrato, com menor susceptibilidade de acesso do solvente ao interior da enzima, devido à compactação e maior organização estrutural da mesma.



**Figura 17:** Nível Relativo de deutério em função do tempo para seis fragmentos representativos da digestão péptica da MtEPSPS: (A) 50-59, (B) 108-115, (C) 122-127, (D) 393-398, (E) 399-405, (F) 413-419. (■) representa a MtEPSPS complexada com o substrato fosfoenolpiruvato e (▲) representa o conteúdo de deutério na apoenzima. Esses resultados não foram ajustados para a troca H/D reversível.

### 7.3. Enzima Chiquimato Quinase em presença e ausência de Ácido Chiquímico, Cloreto de Magnésio e ADP

A enzima chiquimato quinase (figura 18) é a quinta enzima na via do ácido chiquímico, catalisando a fosforilação específica do grupo 3-hidroxil do ácido chiquímico, usando o ATP como co-substrato. A chiquimato quinase pertence à mesma família

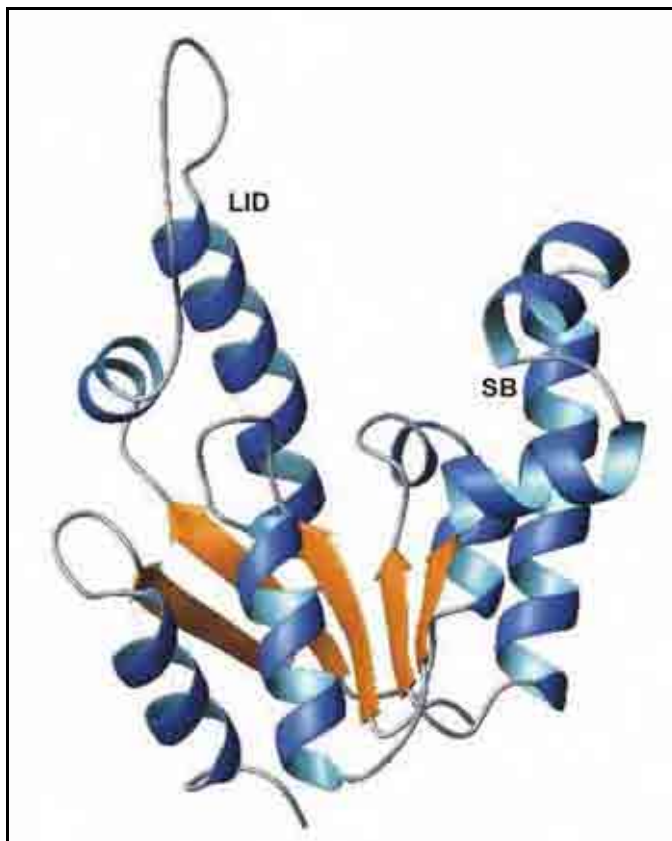


estrutural das nucleosídeos monofosfato quinases (NMP). Essa classe de proteínas quinases é composta de três domínios, o domínio CORE, o domínio LID e o domínio de ligação ao substrato (SB) . Um traço característico das NMP é que elas sofrem grandes mudanças conformacionais durante a catálise, havendo necessidade de assumir vários estados conformacionais diferentes para que sua atividade biológica possa ser realizada (Vonnrhein *et al.*; 1995).

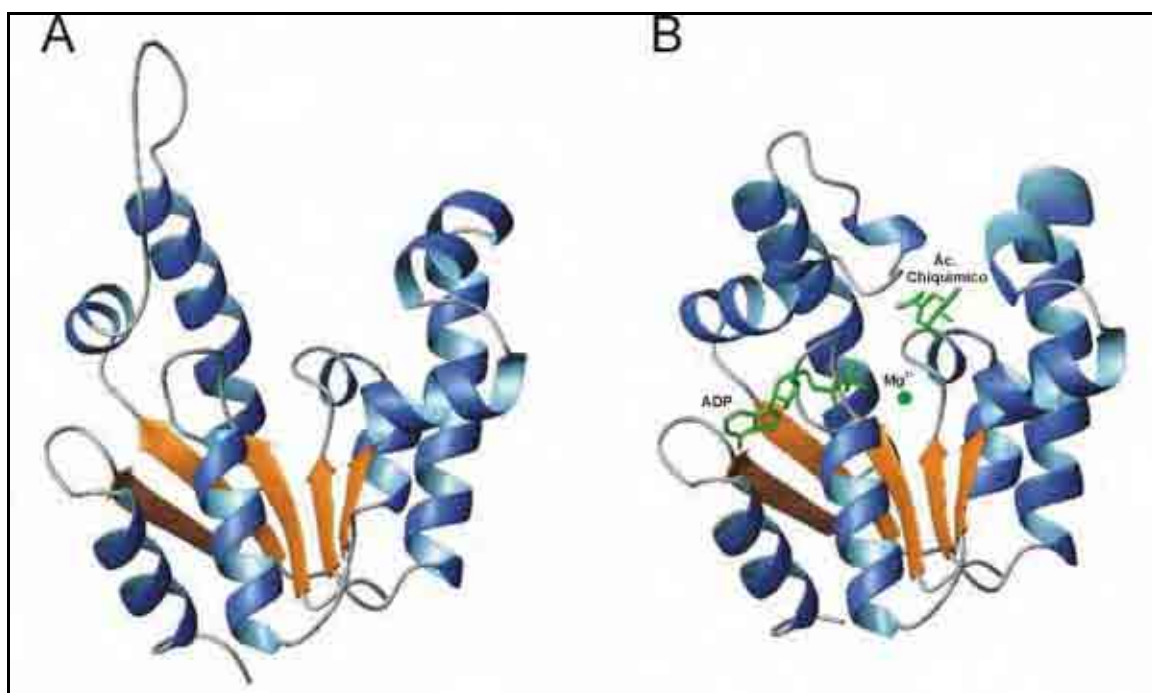
Duas estruturas cristalográficas de Chiquimato Quinase de *Mycobacterium tuberculosis* (Gu *et al.*; 2002, código PDB 1L4Y e 1L4U) têm revelado o papel dinâmico do domínio LID durante a catálise. As interações existentes entre os resíduos de aminoácidos que constituem o sítio de ligação da enzima e o ácido chiquímico, assim como algumas informações a respeito da dinâmica de conformação da enzima Chiquimato Quinase também tem sido demonstrado (Pereira *et al.*; 2004).

A Chiquimato Quinase apresenta uma unidade de enovelamento  $\beta/\alpha$  e consiste-se de 5 folhas- $\beta$  paralelas flanqueadas por hélices- $\alpha$  (figura 18). Como mencionado acima, umas das principais características da Chiquimato Quinase é que ela sofre grandes alterações conformacionais durante a catálise. Há duas regiões mais flexíveis na estrutura que são responsáveis por esse movimento estrutural: os domínios SB e LID, os quais correspondem aos resíduos 33-61 e 112-124, respectivamente (Pereira *et al.*; 2004).

Através de uma comparação global entre as estruturas cristalográficas da apo-Chiquimato Quinase (Gan *et al.*; 2006) e da mesma enzima ligada ao complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP (Pereira *et al.*; 2004), pode-se notar a grande amplitude de movimentação do domínio LID do estado apoenzimático para o estado complexado (figura 19).



**Figura 18:** Diagrama *em Ribbon* da estrutura molecular da Chiquimato Quinase de *Mycobacterium tuberculosis*. Os domínios LID (112-124) e o SB (33-61) estão mostrados. A representação foi preparada com o programa MolMol (Koradi, 1996).



**Figura 19:** Diagrama em ribbon para a Chiquimato Quinase de *Mycobacterium tuberculosis* na ausência de ligantes (A) e na presença de ligantes (B). Nota-se que em B ocorre um “fechamento” do domínio LID sobre o ácido chiquímico. Essas representações foram geradas pelo programa MolMol (Koradi, 1996).

Quando ocorre a complexação do ácido chiquímico com a enzima Chiquimato Quinase, há um deslocamento do domínio LID e do SB, um em direção ao outro. Nessa enzima, o sítio de ligação do ácido chiquímico é delineado principalmente por resíduos de aminoácidos do domínio LID e do domínio SB. Uma análise detalhada do complexo Chiquimato Quinase-ácido chiquímico-MGCl<sub>2</sub>-ADP, revelou um conjunto de interações hidrofóbicas entre o ácido chiquímico e os resíduos Val 116, Pro 118 e Leu 119 do domínio LID e os resíduos Ile 45 e Phe 49 do domínio SB, com a finalidade de estabilizar o sítio catalítico desse substrato. Quando ocorre a ligação do ácido chiquímico à enzima, o sítio de ligação torna-se parcialmente fechado (Pereira *et al.*; 2004).

As alterações conformacionais descritas acima resultam num fechamento do sítio de ligação do chiquimato, como mostra a figura 19B. Uma comparação entre as superfícies moleculares de algumas estruturas cristalográficas revela que a enzima ligada ao complexo ácido chiquimico-MgCl<sub>2</sub>-ADP é a condição experimental onde a Chiquimato Quinase se encontra mais compacta, com uma superfície molecular de 6915Å<sup>2</sup> (1WE2 - Pereira *et al.*; 2004). Os valores de superfície molecular calculados para a Chiquimato Quinase complexada com MgADP é de aproximadamente 7246Å<sup>2</sup> (1L4U - Gu *et al.*; 2002), enquanto que para a apo-Chiquimato Quinase esse valor chega a 13782Å<sup>2</sup>.

A da análise do complexo (Chiquimato Quinase-ácido chiquímico-ADP-MgCl<sub>2</sub>), revelou os seguintes resíduos de aminoácidos como responsáveis pelas pontes de hidrogênio entre a enzima e os ligantes: Lys 15, Asp 34, Arg 58, Glu 61, Gly 79, Gly 80, Gly 81, Ala 82, Arg 117 e Arg 136 (Pereira *et al.*; 2004).

Contudo, essa enzima tem se tornado um interessante alvo de estudos no sentido de entender melhor a relação existente sua estrutura e função. Vislumbra-se que com o um melhor entendimento dos processos dinâmicos dessa enzima, possíveis inibidores para a mesma possam ser desenvolvidos. Nesse sentido, a Chiquimato Quinase tem se tornado um alvo muito atrativo para o desenvolvimento de drogas nos últimos anos.

### **7.3.1. Troca Hidrogênio / Deutério (H/D) e alterações conformacionais**

Como já mencionado, a troca entre os isótopos Hidrogênio e Deutério monitorada pela espectrometria de massas pode ser utilizada para monitorar a dinâmica conformacional de proteínas (Zhang e Smith, 1993; Engen e Smith, 2000; Carter *et al.*; 2005). Os hidrogênios amida localizados no esqueleto de carbonos- $\alpha$  da proteína podem

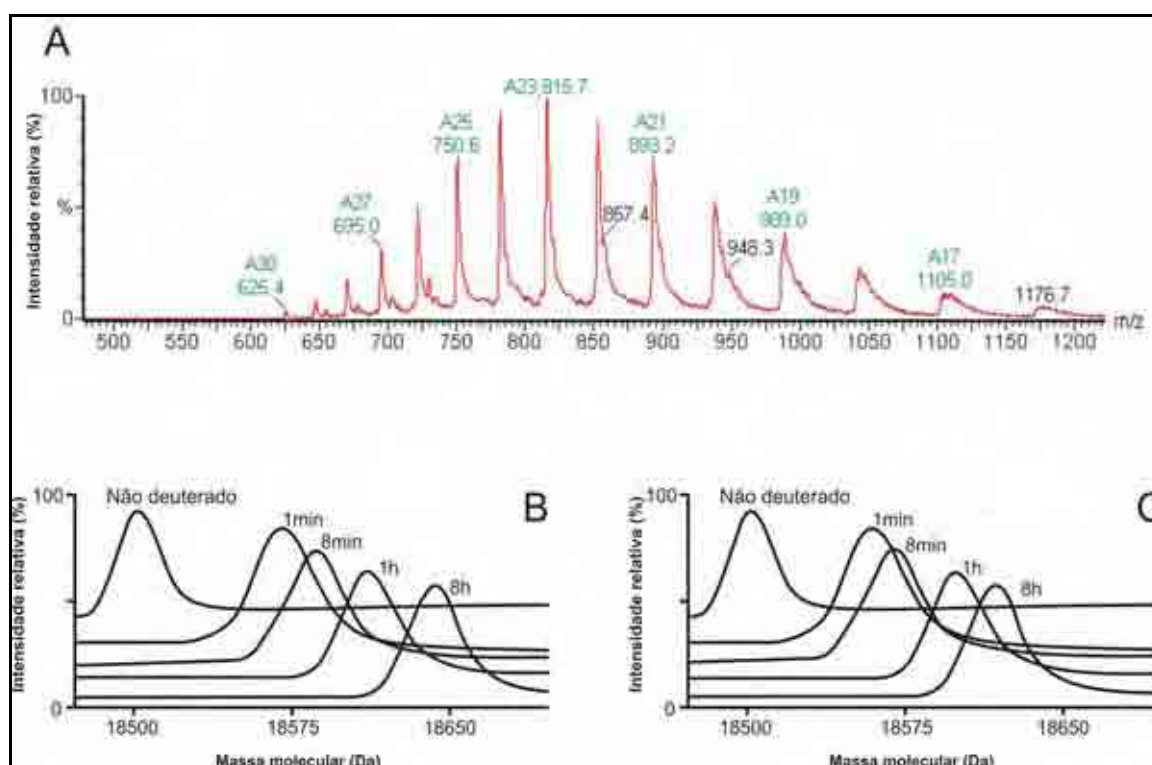
sofrer trocas isotópicas quando em solução. A presença de alguns fatores, tais como podes de Hidrogênio e fatores de proteção ao solvente, podem reduzir e influenciar a velocidades com que essas trocas isotópicas ocorrem nas proteínas em solução. Medindo o nível de incorporação de deutério nas proteínas através da espectrometria de massas, podemos definir quais regiões das proteínas são mais ou menos flexíveis e assim estudar a dinâmica dessa classe química de moléculas.

### **7.3.1.1. Troca H/D na enzima Chiquimato Quinase intacta**

O fato de existir na literatura um modelo estrutural para a Chiquimato Quinase, em presença de ácido chiquímico, ADP e cloreto de magnésio (Pereira *et al.*; 2004), nos levou a montar os experimentos de dinâmica conformacional nas mesmas condições em que esta estrutura cristalográfica foi obtida.

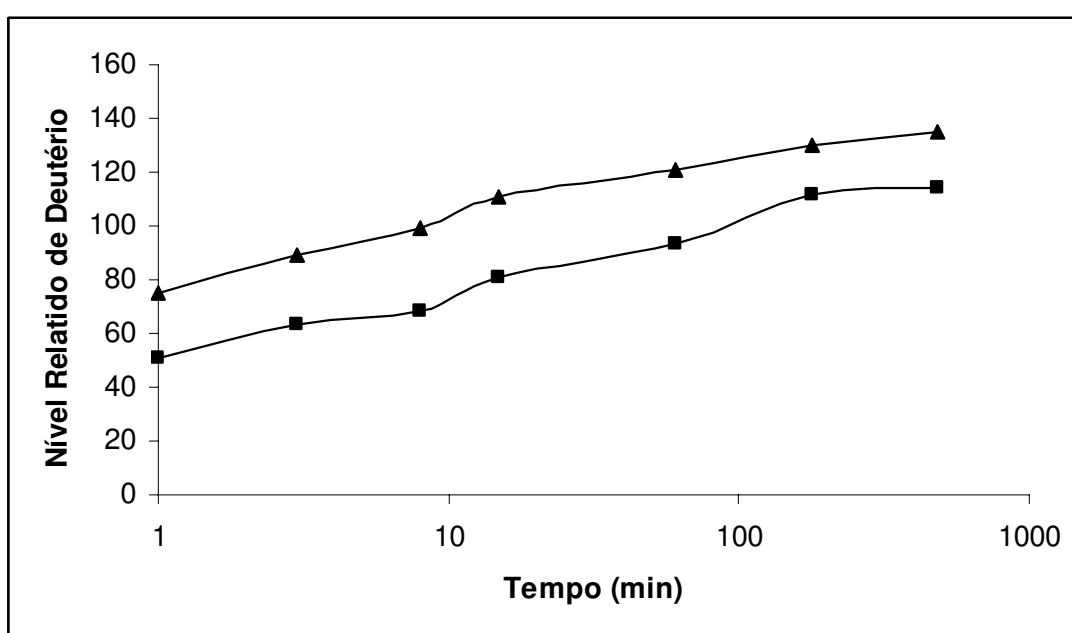
O nível de deutério incorporado na enzima Chiquimato Quinase na ausência e presença de dos três ligantes, foi determinado e comparado por espectrometria de massas. A fim de assegurar que a Chiquimato Quinase apresentasse condições físico-químicas para suportar as condições de análises experimentais de troca hidrogênio / deutério, análises preliminares de espectrometria de massas ESI foram realizadas, a fim de determinar a qualidade dos espectros assim como o limite de detecção dos mesmos. A figura 20A mostra um espectro de massas ESI para a Chiquimato Quinase medindo uma massa molecular de 18499,00Da (massa teórica de 18583,00 Da). Os estados de ionização com cargas de +17 a +30 foram claramente visíveis. Esses resultados demonstraram que a Chiquimato Quinase era passível de ter suas mudanças conformacionais estudadas pela técnica de troca isotópica Hidrogênio / Deutério juntamente com a espectrometria de massas ESI.

Um experimento com tempo de curso de 8 horas foi conduzido para a Chiquimato Quinase tanto na ausência como na presença dos três ligantes. Os espectros de massas deconvoluídos para ambas as formas da enzima (apoenzima e enzima complexada com ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP), obtidos durante os experimentos de exposição ao solvente deuterado estão mostrados nas figuras 20B e 20C, respectivamente. A massa molecular da enzima (tanto a apoenzima como a forma complexada) em cada tempo de incubação no solvente deuterado foi também determinada (figura 21).



**Figura 20:** (A) Espectro de massa ESI-MS para a enzima Chiquimato Quinase. Os valores de  $m/z$  referentes aos diferentes estados de ionização da molécula vão de 625 a 1105. (B) Espectros ESI-MS deconvoluídos obtidos para a apoenzima em diferentes tempos de exposição ao solvente deuterado. O tempo nesses experimentos variou de 1 minuto a 8 horas. (C) Espectros ESI-MS deconvoluídos obtidos para a enzima complexada com ligantes nas mesmas condições de tempos de exposição ao solvente deuterado de B.

Percebe-se ainda na figura 21 que durante todo o tempo de curso da experimentação, sempre houve uma diferença na porcentagem de deutério incorporado entre as duas formas enzimáticas, refletindo as diferenças conformacionais entre a apoenzima e a sua forma ligada ao complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP.



**Figura 21:** Comparação do nível relativo de deutério encontrado na Chiquimato Quinase complexada com os ligantes (■) e na apoenzima (▲). O número máximo de hidrogênios trocáveis no esqueleto de carbonos- $\alpha$  da Chiquimato Quinase é 165. Nota-se que a enzima complexada sempre incorporou menos deutério do que a forma apoenzimática. Esses resultados não foram ajustados para a troca H/D reversível.

Um aumento de 75Da para a apoenzima e de 51Da para enzima complexada aos ligantes foi observado após 1 minuto de exposição ao solvente deuterado. Esses valores não levam em consideração as perdas de deutério durante as análises devido à troca reversível (vide materiais e métodos). Uma vez que a perda na troca H / D reversível foi de

12 a 15% nas proteínas intactas, para a chiquimato quinase livre de ligantes, um número de aproximadamente 86 hidrogênios amida devem ter trocado com deutério, enquanto que na chiquimato quinase complexada com os ligantes esse número ficou em torno de 58. É provável que os átomos de hidrogênios amida que trocam dentro do espaço de tempo de 1 minuto a pD 7.0 provavelmente são aqueles que estão expostos ao solvente e comumente não participam das pontes de hidrogênio intramoleculares (Dharmasiri e Smith, 1996). Esse aumento de massa observado após 1 minuto de exposição ao solvente deuterado provavelmente está relacionado com resíduos de aminoácidos pertencentes a uma região altamente dinâmica da molécula.

A massa molecular da Chiquimato Quinase continuou a aumentar durante o tempo de curso do experimento, apresentando um aumento de 135 Da após 8 horas para a apoenzima, e de 114 Da para a forma complexada. Considerando-se a correção da troca H/D reversível para ambas as formas da enzima, o aumento pode atingir 155Da para a apoenzima e 131Da para a enzima complexada. O aumento máximo em massa possível devido à deuteração de todos os nitrogênios amida do esqueleto de carbonos- $\alpha$  na molécula da Chiquimato Quinase é de 165 Da. Isso ocorre porque a molécula da Chiquimato Quinase apresenta 176 resíduos de aminoácidos na sua seqüência primária, e desse número devem ser descontados 9 resíduos de prolina (os quais não apresentam hidrogênios amida), mais os grupos N-terminal e C-terminal, o qual sempre perde o átomo de deutério incorporado durante as análises devido a rápida troca reversível (Smith *et al.*; 1997). Há, portanto 30 resíduos de aminoácidos na apoenzima que não realizam troca H/D durante 8 horas; esse número para a Chiquimato Quinase ligada ao complexo ácido



chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP é de 51. Esses valores, juntamente com os resultados apresentados na figura 21, fornecem uma forte evidência de que a Chiquimato Quinase complexada com ligantes é menos acessível ao solvente quando comparado à apoenzima. O fato de ambas as curvas serem mais ou menos paralelas durante todo o experimento (figura 21) sugere que ambas as formas da enzima sofrem processos dinâmicos semelhantes, porém em diferentes proporções, respeitando as características estruturais de cada forma.

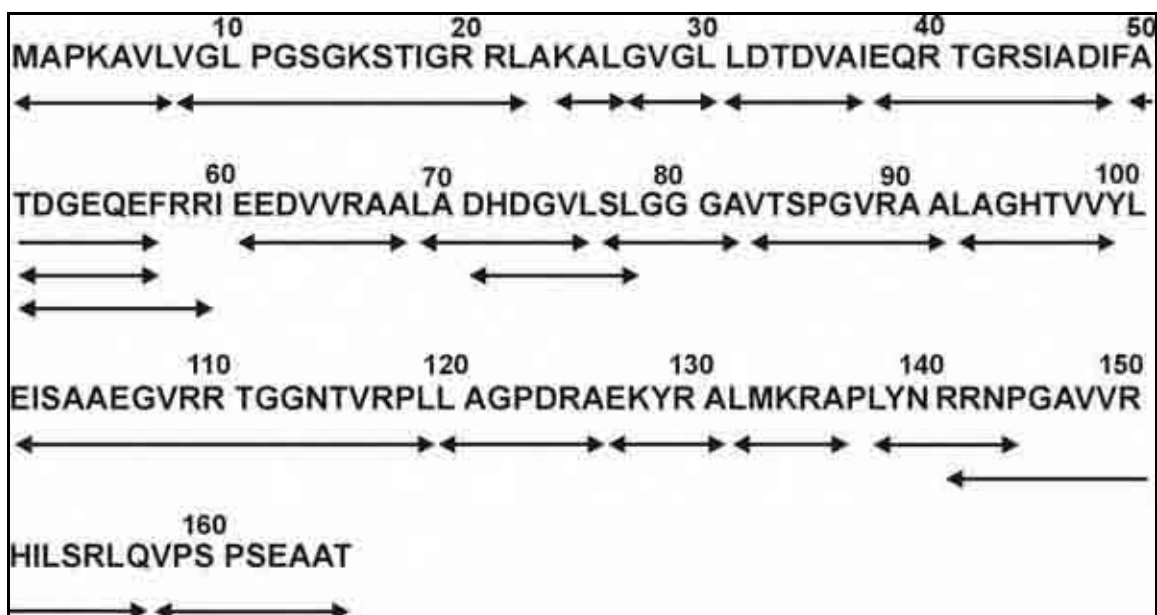
A troca H/D foi realizada para ambas as formas da enzima Chiquimato Quinase em condições idênticas, o que nos permitiu uma comparação direta das curvas de troca entre as formas enzimáticas, sem a necessidade da correção da troca (H/D) reversível.

Os resíduos de aminoácidos que não realizaram troca H/D durante o tempo de experimentação podem estar relacionados com resíduos altamente protegidos dentro da molécula e/ou com resíduos que participam de pontes de hidrogênio intramoleculares, onde o solvente provavelmente não pode ter o acesso necessário para que ocorra a troca H/D. Tais resíduos normalmente trocam via cinética EX2, onde muitos processos de desenovelamento e enovelamento localizados (de forma muito rápida) devem ocorrer para que ocorra a troca H/D (Engen e Smith, 2000).

### **7. 3.1. 2. Troca H/D em fragmentos pépticos**

Para determinar com mais especificidade quais regiões da enzima Chiquimato Quinase apresentaram uma incorporação de deutério de forma mais rápida ou mais lenta, e portanto determinar quais as regiões da molécula estão mais bem estruturadas

e acessíveis ao solvente, a enzima foi deuterada e digerida antes das análises por espectrometria de massas. Uma vez que as condições físico-químicas do experimento devem ser mantidas durante a digestão, foi essencial a utilização de uma protease com alta atividade no pH de amortização da reação (pH 2.5). A pepsina apresenta uma ótima atividade nessas condições. A pepsina é uma protease não específica, porém ela apresenta sempre o mesmo perfil de digestão quando as condições físico-químicas do meio são mantidas. A fim de identificar cada peptídeo péptico proveniente da digestão da apo-Chiquimato Quinase e do complexo enzima-chiquimato-MgCl<sub>2</sub>-ADP, esses fragmentos foram analisados diretamente por LC-MS, posteriormente por LC-MS/MS e assim identificados. Os experimentos de espectrometria de massas MS/MS foram realizados com a finalidade de obter informações de seqüências parciais para os peptídeos produzidos durante a digestão péptica. A combinação das informações de seqüências parciais juntamente com o valor de massa molecular desses peptídeos, permitiu a identificação de cada um deles com grande precisão. A figura 22 mostra os peptídeos provenientes da digestão da enzima Chiquimato Quinase e que foram identificados nesse estudo (ver também anexos 5 e 6). Os peptídeos cobrem 97,1% de toda a extensão da seqüência primária da enzima e alguns deles se sobrepõem.



**Figura 22:** Sequência de aminoácidos da enzima Chiquimato Quinase de *Mycobacterium tuberculosis* com seu respectivo padrão de clivagem péptica. Cada peptídeo fragmento está identificado com uma linha sob a sequência da proteína.

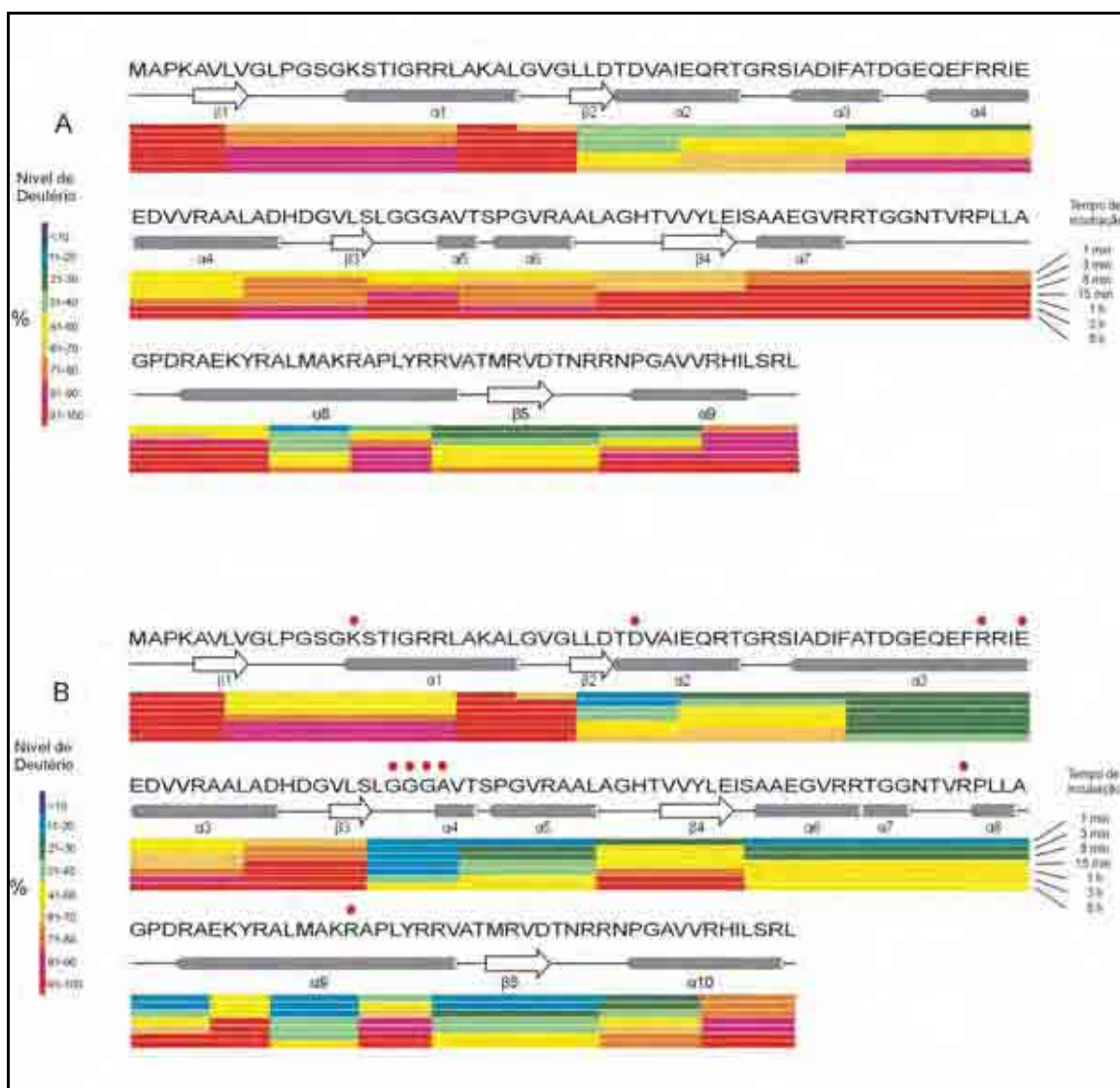
Assim como para as análises das proteínas intactas e em função dos experimentos terem sido realizados e analisados sob condições idênticas, os resultados puderam ser diretamente comparados sem a necessidade de fazer a correção da troca H/D reversível.

Os dados obtidos a partir do número de deutério incorporado pelos fragmentos pépticos foram utilizados para complementar os resultados já conhecidos e provenientes de estudos de cristalografia de raios-X.

Através dos resultados apresentados nos anexos 5 e 6, foi criada uma representação com os padrões de cores estabelecidos pela literatura (Yan *et al.*; 2004), representando os níveis de deuteração de cada trecho de sequência primária e de estrutura secundária, para as duas formas da enzima, conforme mostrado na figura 23.

Ao comparar os padrões de estrutura secundária para a apo-Chiquimato Quinase e a forma ligada ao complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP (figuras 23A e 23 B), percebe-se que a houve alguns rearranjos na organização estrutural dessa enzima. Por exemplo, a região compreendendo os resíduos 51-53, se apresentava como elemento de estrutura secundária desorganizada na apoenzima e separava as hélices- $\alpha$  3 e 4 (figura 23A). Na enzima ligada ao complexo ácido chiquímico-ADP-MgCl<sub>2</sub>, esse pequeno segmento de três resíduos de aminoácidos se organizou em hélice- $\alpha$  proporcionando a fusão das hélices- $\alpha$  3 e 4 numa única e extensa hélice- $\alpha$  (hélice- $\alpha$  3, figura 23B).

Noto-se também um aumento no nível de organização na região de 109-125, onde se tinha na apoenzima, um segmento somente com estrutura secundária desorganizada (coil). Na enzima ligada ao complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP, esse mesmo segmento já apresentou duas pequenas regiões com elementos de estrutura secundária em hélice- $\alpha$ , compreendendo os resíduos de 110-112 (hélice- $\alpha$  7) e 118-120 (hélice- $\alpha$  8). Na apoenzima, a região de 144 – 151, estava organizada em hélice- $\alpha$ , apresentando o C-terminal como uma estrutura desorganizada em coil, compreendendo quatro resíduos de aminoácidos. Já na enzima complexada, somente o último resíduo do lado C-terminal está organizado numa estrutura secundária desorganizada. Outra informação importante que deve ser levada em consideração é que após a ligação do complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP, a enzima Chiquimato Quinase se reorganizou de tal forma que mais uma hélice- $\alpha$  surgiu, totalizando dez desses elementos de estrutura secundária, contra nove na apoenzima. O restante da seqüência primária da enzima não teve sua estrutura secundária modificada nas condições analisadas.



**Figura 23:** Representação dos níveis de deutério para a apoenzima (A) e para a enzima ligada ao complexo ácido chiquímico-ADP-MgCl<sub>2</sub> (B), baseado num padrão de cores em sete diferentes tempos de incubação a 25°C (1, 3, 8, 15, 60 minutos, 3 e 8 horas). A figura também mostra a seqüência primária e as estruturas secundárias de cada forma da enzima. Os resíduos de aminoácidos que participam do sítio de ligação com o complexo chiquímico-ADP-MgCl<sub>2</sub>, estão assinalados por pontos vermelhos no esquema da figura 23B.

Ainda através de uma comparação entre as figuras 23A e 23B, nota-se que em ambas as situações, as regiões N-terminal e C-terminal trocaram seus hidrogênios amida por deutério muito rapidamente. O mesmo resultado é observado nas regiões

correspondentes aos domínios LID e SB, corroborando os dados literários de cristalografia de raios-X, onde se observou uma grande mobilidade desses domínios. Esses resultados ocorrem, provavelmente, em função de uma facilidade muito grande de acesso aos resíduos de aminoácidos dessas regiões, por parte do solvente deuterado.

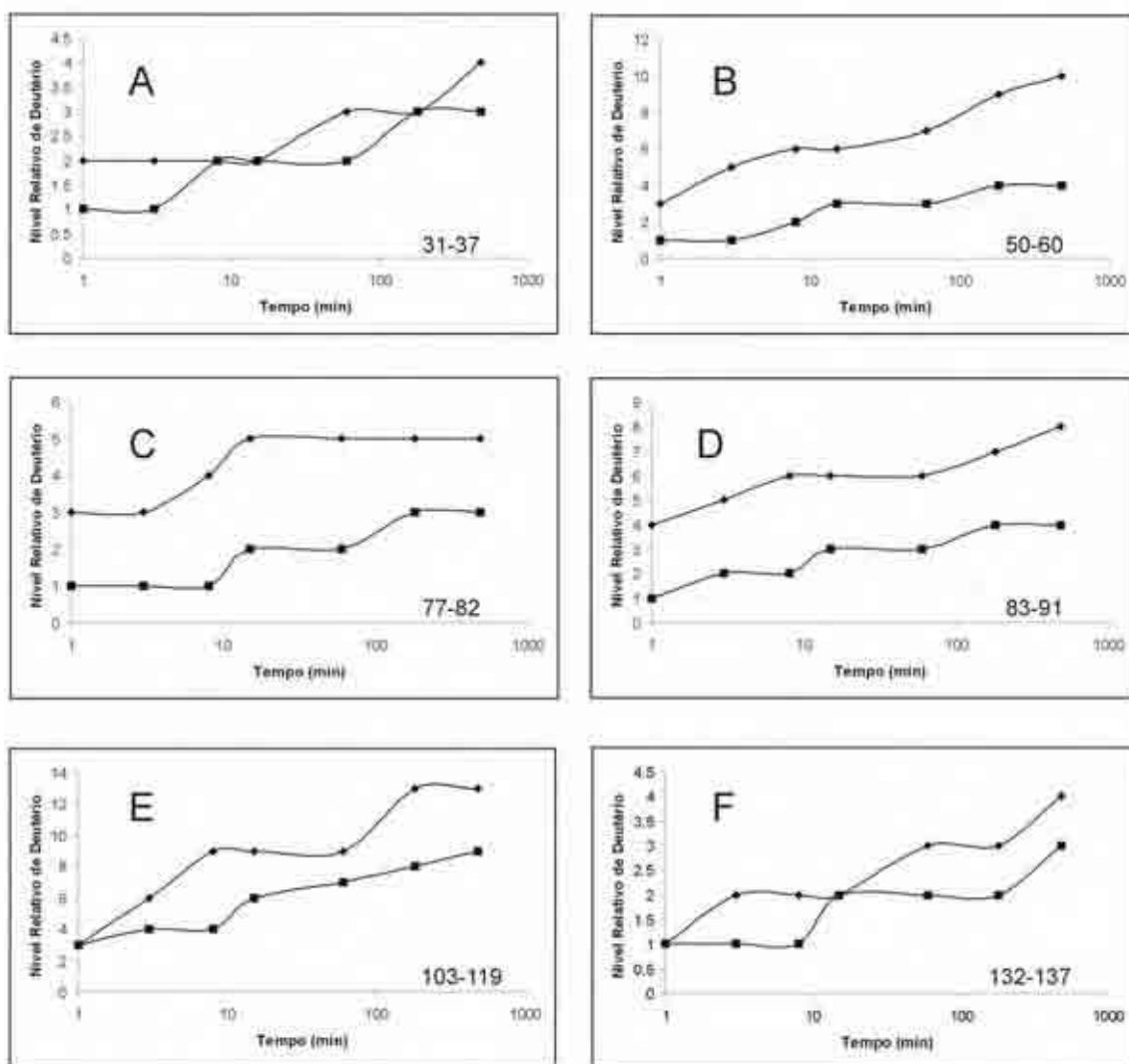
Na figura 23B percebe-se também que a enzima Chiquimato Quinase se tornou muito mais rígida se comparada à figura 23A. Isso provavelmente ocorreu em função de um aumento na estabilidade da enzima provocada por um aumento no número de pontes de hidrogênio, resultado da complexação do ligante chiquimato-MgCl<sub>2</sub>-ADP. Outra característica que provavelmente influenciou nessa maior rigidez observada na figura 23B foi a diminuição da superfície molecular, como já visto acima, diminuindo também a área de acesso ao solvente de cada resíduo de aminoácido individualmente.

É importante chamar a atenção para a região do domínio LID (112 – 124) na apoenzima, a qual se mostrou extremamente dinâmica, com uma incorporação de deutério muito rápida já nos primeiros minutos de exposição ao solvente deuterado (figura 23A). Já na enzima ligada ao complexo chiquimato-MgCl<sub>2</sub>-ADP, a mesma região apresentou uma velocidade de incorporação de deutério mais lenta, indicando uma menor mobilidade da região. Provavelmente após a ligação do ácido chiquímico e com o fechamento do domínio LID, a região de 112 – 114 fica menos exposta ao solvente deuterado e com um número maior de pontes de hidrogênio.

Na enzima complexada com o chiquimato-MgCl<sub>2</sub>-ADP, algumas regiões se mostraram altamente protegidas à troca isotópica hidrogênio / deutério em relação à apoenzima (figura 24). Dentre essas regiões estão incluídos os fragmentos de 31-37 ( $\beta$ 2 -

$\alpha 2$ ) e 50-60 ( $\alpha 3$ ), que correspondem aos segmentos do domínio SB; fragmentos de 77-82 ( $\beta 3$ -coil- $\alpha 4$ ), 83-91 ( $\alpha 4$ -coil- $\alpha 5$ ), 132-137 ( $\alpha 9$ ) e 103-119 ( $\alpha 6$ - $\alpha 7$ -coil- $\alpha 8$ ). Esse último, corresponde a um fragmento dentro do Domínio LID. De todos esses seis peptídeos, os que contêm os resíduos de aminoácidos de 50-60 e 77 – 82 foram aqueles que se mostraram mais rígidos durante toda a duração do experimento. Esses resultados indicam que esses peptídeos estão altamente protegidos à troca de solvente e, provavelmente, realizam pontes de hidrogênio tais que dificultam a sua mobilidade dentro da estrutura terciária da enzima. Esses peptídeos também apresentam resíduos de aminoácidos responsáveis pelas pontes de hidrogênio entre a Chiquimato Quinase e os ligantes, fato que também deve proporcionar uma maior rigidez dessas regiões. Os dados para o peptídeo de 50 – 60 indicam que após 8 horas de exposição ao solvente deuterado, 4 posições foram deuteradas e 7 foram protegidas, corroborando a idéia de uma pequena área de acesso ao solvente nessa região e fortes pontes de Hidrogênio em torno da mesma. O fragmento de 77 – 82 também se mostrou altamente protegido à deuturação, pois com 8 horas de exposição ao solvente deuterado, somente 3 dos 5 hidrogênios amida haviam sido trocados por deutério. Esse fragmento, especificamente, apresenta uma característica muito importante, pois 4 dos seus 5 resíduos de aminoácidos são responsáveis por realizar pontes de Hidrogênio entre a enzima Chiquimato Quinase e o complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP. Provavelmente, tal característica também corrobora para uma maior rigidez na região. Resultado semelhante a esse foi observado para a enzima EPSPS na presença do inibidor glifosato e do substrato fosfoenolpiruvato, onde os fragmentos que apresentavam

resíduos de aminoácidos responsáveis por interagir com esses ligantes, também se mostraram mais resistentes à troca isotópica H/D.



**Figura 24:** Nível relativo de deutério em função do tempo para seis fragmentos representativos da digestão péptica da Chiquimato Quinase: (A) 31-37, (B) 50-60, (C) 77-82, (D) 83-91, (E) 103-119, (F) 132-137. (■) representa a Chiquimato Quinase ligada ao complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP e (◆) representa a apoenzima. O número máximo de hidrogênios trocáveis no esqueleto de carbonos- $\alpha$  da Chiquimato Quinase é 165. Nota-se que a enzima complexada sempre incorporou menos deutério do que a forma apoenzimática. Esses resultados não foram ajustados para a troca H / D reversível.



O fragmento de 92-99, que é parte de uma região que apresenta concomitantemente um trecho de estrutura secundária desorganizada e um trecho em folha- $\beta$ , exibiu uma troca isotópica relativamente rápida, indicando que a região está fracamente protegida ao solvente e que as pontes de Hidrogênio na região são fracas ou estão em pequeno número.

Duas outras regiões trocam os hidrogênios amida por deutério relativamente rápido em ambas as formas da enzima. Uma delas está localizada na região entre os resíduos 21-31 e outra entre os resíduos de 69 – 78. Ambas as regiões compreendem segmentos envolvendo elementos de estrutura secundária do tipo hélice- $\alpha$ , coil e folha- $\beta$ . Estes segmentos estão altamente expostos ao solvente, e portanto, os hidrogênios são substituídos por deutério relativamente rápido.

Dessa forma, pôde-se ter uma descrição das alterações conformacionais globais e localizadas na estrutura terciária da enzima Chiquimato Quinase, tanto na presença quanto na ausência do complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP.

As informações de alterações conformacionais globais e localizadas obtidas pela técnica de troca isotópica H / D juntamente com os dados de cristalografia de raios-X, podem permitir o desenho racional de inibidores para a Chiquimato Quinase que impossibilite essa enzima de realizar a sua função biológica e dessa forma pode-se vislumbrar racionalmente o desenho de fármacos para uma série de microrganismos.

## 8. CONCLUSÃO

O uso combinado das técnicas de digestão com pepsina, associada à espectrometria de massas ESI-MS e ESI-MS/MS, mostrou-se muito sensível para detectar variações conformacionais na estrutura da MtEPSPS em presença e ausência do inibidor glifosato e do substrato fosfoenolpiruvato; a técnica apresentou sensibilidade para detectar alterações conformacionais globais na estrutura protéica, assim como mudanças localizadas na estrutura da enzima.

Os resultados experimentais mostraram claramente que, a apoenzima MtEPSPS é muito mais exposta ao solvente, e portanto, mais susceptível à troca H / D, que a enzima complexada com o glifosato e/ou com o fosfoenolpiruvato; ambas as formas complexadas são mais organizadas e portanto, menos acessíveis ao solvente que a apoenzima. Comparando-se entre si as formas complexadas ao inibidor e ao substrato, observa-se que o complexo EPSPS-glifosato é muito menos acessível ao solvente que o

complexo EPSPS-fosfoenolpiruvato, sugerindo que a interação enzima-inibidor torna a estrutura terciária (trechos da estrutura secundária) da enzima, muito mais compacta que a estrutura observada durante a interação enzima-substrato.

Os resultados experimentais evidenciam que, as regiões da molécula da MtEPSPS que possuem resíduos de aminoácidos dos sítios de ligação com o inibidor se tornam muito mais resistentes à exposição do solvente, depois de interagirem com o glifosato, que em ausência do mesmo; tais regiões sofrem processos de desenovelamento / enovelamento, que levam à cinética de troca H / D do tipo EX2; o mesmo resultado foi observado para a MtEPSPS na presença de fosfoenolpiruvato e para a Chiquimato Quinase na presença do complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP.

A enzima Chiquimato Quinase apresentou alterações conformacionais globais, onde foi evidenciado que a apoenzima apresenta uma dinâmica conformacional mais acentuada, se comparado à mesma enzima complexada com ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP. Isso provavelmente é decorrente de uma maior exposição ao solvente deuterado na apoenzima que na enzima complexada com ligantes, e também pela presença de um número menor de pontes de hidrogênio na apoenzima se comparado à enzima complexada. Também ficou claro o papel dinâmico desempenhado pelos domínios LID e SB, corroborando os dados de cristalografia de raios-X. Após a ligação do complexo ácido chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP a enzima Chiquimato Quinase se torna mais compacta, dificultando o acesso do solvente deuterado aos hidrogênios amida do esqueleto de carbonos- $\alpha$ .

## 9. BIBLIOGRAFIA

BASSO, L. A. and BLANCHARD, J. S. Resistance to Antitubercular Drugs. New York.

**Advances in Experimental and Medical Biology**, v. 456, p. 155 – 144, 1998.

BENTLEY, R. The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches. Boca Raton,

Fla. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** , v. 25, p. 307-384, 1990

BÖHM, G., MUHR, R. and JAENICKE, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV

circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.*, **5**, 191-195.

BORNEMANN, S.; RAMJEE, M. K.; BALASUBRAMANIAN, S.; ADELL, C.;

COGGINS, J. R.; LOWE, D. J. and THORNELEY, R. N. F. *Escherichia coli*

Chorismate Synthase Catalyzes the Conversion of (6S)-6-Fluoro-5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate to 6-Fluorochorismate. Bethesda, Md. **J. Biol.**

**Chem.** n. 270, v. 39, p. 22811-22815, 1995.

- BROWN, K.A.; CARPENTER, E. P.; WATSON, K. A.; COGGINS, J. R.; HAWKINS, A. R.; KOCH, M. H. J. and SVERGUN, D. I. Twists and turns: a tale of two shikimate-pathway enzymes. London. **Bioch. Soc. Transac.** v. 31, p. 543-547, 2003.
- CAMPBELL, S. A.; RICHARDS, T. A.; MUI, E. J.; SAMUEL, B. U.; COGGINS, J. R.; MCLEOD, R. and ROBERTS, C. W. A complete shikimate pathway in *Toxoplasma gondii*: an ancient eukaryotic innovation. Oxford. **Intern. J. Parasitology**, v. 34, p. 5-13, 2004.
- CARPENTER, E.P.; HAWKINS, A.R.; FROST, J. W. and BROWN, K. A. Structure of dehydroquinase reveals an active site capable of multistep catalysis. London, **Nature** v. 394, p. 299–302, 1998.
- CARTER, J. M.; GUVERVICH, V. V.; PROSSNITZ, E. R. and ENGEN, J. R. Conformational Differences Between Arrestin2 and Preactivated Mutants as Revealed by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. London, **Journal of Molecular Biology**, v. 351, p. 865 – 878, 2005.
- COGGINS, J. R.; ABELL, C.; EVANS, L. B.; FREDERICKSON, M.; ROBINSON, D. A.; ROSZAK, A. W. and LAPTORN, A. P. Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. London, **Bioch. Soc. Transac.** v. 31, p. 548-552, 2003.
- COGGINS, J.R.; DUNCAN, K.; ANTON, I.A.; BOOCOOCK, M.R.; CHAUDHURI, S.; LAMBERT, J.M.; LEWENDON, A.; MILLAR, G.; MOUSDALE, D.M. and SMITH, D.D. London, **Biochem. Soc. Trans.** v. 15, p. 754-759, 1987.
- COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; 3rd, TEKAIA, F.;

- BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; and BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. London, **Nature**, v. 393, p. 537 – 544, 1998.
- DHARMASIRI, K. and SMITH, D. L. Mass Spectrometric Determination of Isotopic Exchange Rates of Amide Hydrogens Located on the Surfaces of Proteins. Washington, US, **Analytical Chemistry**. v. 68, p. 2340 – 2344, 1996.
- DHARMASIRI, K. and SMITH, D. L. Regional Stability Changes in Oxidized and Reduced Cytochrome c Located by Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry. New York, US, **Journal of American Society of Mass Spectrometry**, v. 8, p. 1039 – 1045, 1997.
- DELEPIERRE, M.; DOBSON, C. M.; KARPLUS, M.; POULSEN, F. M.; STATES, D. J. and WEDIN, R. E. Electrostatic effects and hydrogen exchange behavior in proteins: The pH dependence of exchange rates in lysozyme. London, **Journal of Molecular Biology**. v. 197, p. 111-130, 1987.
- DILL, K. A. and SHORTLE, D. Denatured States of Proteins. Palo Alto, Calif., US, **Annual Review of Biochemistry**. v. 60, p. 795 – 825, 1991.
- DOBSON, C. M. Unfolded proteins, compact states and molten globules : Current Opinion in Structural Biology. London. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 2, p. 6-12, 1992.
- DU, W.; WALLIS, N. G.; MAZZULLA, M. J.; CHALKER, A. F.; ZHANG, L.; LIU, W. S.; KALLENDER, H. and PAYNE, D. J. Characterization of *Streptococcus*

- pneumoniae* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase and its activation by univalent cations. Berlin, DE, **Eur.J. Biochem.** v. 267, p. 222-227, 2000.
- ENGEM, J. R. and SMITH, D. L. Probing the high order proteins. **Methods in Molecular Biology**. V. 146, p. 95 – 112, 2000.
- ENGLANDER, J. J.; CALHOUM, D. B. and ENGLANDER, S. W. Measurement and calibration of peptide group hydrogen-deuterium exchange by ultraviolet spectrophotometry. New York, US. **Analytical Biochemistry**. v. 92, p. 517 – 524, 1979.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MEG, C. K.; WONG, S. F.; and WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Washington, DC. Science**, v. 246, p. 64 – 71, 1989.
- FICHERA, M. E. and ROOS, D. S. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. London. **Nature**, v.390, p. 407–409, 1997.
- FRACZKIEWICZ, R and BRAUN, W. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. New York, US. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 319 – 333, 1998.
- GRIFFIN, H. G. AND GASSON, M. J. **DNA Sequence** v. 5, p. 195–97, 1995
- GAN, J.; GU, Y.; LI, Y.; YAN, H. and JI, X. Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Shikimate Kinase in Complex with Shikimic Acid and an ATP Analogue. Easton, Pa. **Biochemistry**, v. 45, p. 8539-8545, 2006.
- GU, Y., RESHETNIKOVA, L., LI, Y., WU, Y., YAN, H., SINGH, S. and JI, X. Crystal Structure of Shikimate Kinase from *Mycobacterium tuberculosis* Reveals the

- Dynamic Role of the LID Domain in Catalysis. London. **J. Mol. Biol.** v. 319, p. 779-789, 2002.
- GUEVREMONT, R.; SIU, K. W. M.; LE BLANC, J. C. Y. and BERMAN, S. S. Electrospray mass spectrometry : a study on some aqueous solutions of metal salts New York, US. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry.** v. 3, p. 216 – 244, 1992.
- GUY, P.; REMIGY, H.; JAQUINOD, M.; BERSCH, B.; BLANCHARD, L.; DOLLA, A.; and FOREST, E. Study of the new stability properties induced by amino acid replacement of tyrosine 64 in cytochrome C553 from *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* using electrospray ionization mass spectrometry. Orlando, Fla. **Biochemical and Biophysical Research communications.** V. 218, p. 97 – 103, 1996.
- HERRMANN, K. M. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. Rockville, Md., US. **The Plant Cell,** v 7, p. 907-919, 1995.
- HERRMANN, K. M. THE SHIKIMATE PATHWAY AS AN ENTRY TO AROMATIC SECONDARY METABOLISM. Minneapolis, Minn., Us. **Plant Physiol.** V. 107, p. 7-12, 1995B.
- HERRMANN, K. M. and WEAVER, L. M. The Shikimate Pathway. Palo Alto, Calif., US. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 50, p. 473-503, 1999.
- HOISETH, S.K. and STOCKER, B.A.D. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. London. **Nature** v. 241, p. 238–239, 1981.



- HVIDT, A and NIELSEN, S. O. Hydrogen exchange in proteins. New York, US. **Advances in Protein Chemistry**. v. 21, p. 285 – 387, 1966
- JARQUINOD, M.; GUY, P.; HALGAND, F.; CAFFREY, M.; FITCH, J.; CUSANOVICH, M.; and FOREST, E. Stability study of *Rhodobacter capsulatus* ferrocytochrome c2 wild-type and site-directed mutants using hydrogen/deuterium exchange monitored by electrospray ionization mass spectrometry. Amsterdam, NL. **Febs Letter**, v. 380, p. 44 – 48, 1996.
- JARDETZKY, O. and JARDETZKY, C. D. **In. Methods of Biochemical Analysis**. v. 9, p. 235-410. Interscience, NY, 1962.
- JARDETZKY, O. **In. Molecular properties of drug receptor**, p. 113-132. Churchill, London, 1970.
- JARDETZKY, O.; AKASAKA, K.; VOGEL, D.; MORRIS, S. and HOLMES, K. C. Unusual segmental flexibility in a region of tobacco mosaic virus coat protein. London. **Nature**. v. 273, p. 564-566, 1978.
- KIM, K. S. and WOODWARD, C. Protein Internal Flexibility and Global Stability: Effect of Urea on Hydrogen Exchange Rates of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. Easton, Pa., US. **Biochemistry**. v. 32, p. 9609 – 9013, 1993
- KIM, M. Y.; MAIER, C. S.; REED, D. J.; and DEINZER, M. L. Site-specific amide hydrogen/deuterium exchange in *E. coli* thioredoxins measured by electrospray ionization mass spectrometry. Easton, Pa., US. **Journal of American Chemical Society**. v. 123, p. 9860 - 9866, 2001.
- KISHORE, G. M. and SHAH, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. Palo Alto, Calif., US. **Annual review of biochemistry**. V. 27, p. 627 – 663, 1988.

- KOHLER, S.; DELWICHE, C. F.; DENNY, P. W.; TILNEY, L. G.; WEBSTER, P.; WILSON, R. J.; PALMER, J. D. and ROOS, D. S. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. Washington, DC. **Science** v. 275, p. 1485–1489, 1997.
- KORADI, R.; BILLETER, M. and WUTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. Guildford, GB. **Journal of Molecular Graphics**, 14, p. 51 – 55, 1996.
- KRELL, T.; MACLEAN, J.; BOAM, D.J.; COOPER, A.; RESMINI, M.; BROCKLEHURST, K.; KELLY, S.M.; PRICE, N.C.; LAPTHORN, A. J. and COGGINS, J.R. Biochemical and X-ray crystallographic studies on shikimate kinase: The important structural role of the P-loop lysine. Cold Spring Harbor, Ny, US. **Protein Science**. v.10, p. 1137–1149, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. London. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.
- LEWIS, J.; JOHNSON, K. A. AND ANDERSON, K. S. The Catalytic Mechanism of EPSP Synthase Revisited. Easton, Pa., US. **Biochemistry** v. 38, p. 7372-7379, 1999.
- LINDESTRON-LANG, K. **Chemical Society Spectroscopy Publication**. v. 2, p. 1 – 20, 1955.
- LORENZ, S. A.; MAZIARZ, E. P. and WOODS, T. D. Using solution phase hydrogen/deuterium (H/D) exchange to determine the origin of non-covalent complexes observed by electrospray ionization mass spectrometry: in solution or in vacuo? New York, US. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 12, p. 795 – 804, 2001.

- MARQUARDT, J. L.; BROWN, E. D.; LANE, W. S.; HALEY, T. M.; ICHIKAWA, Y.; WONG, C. H. and WALSH, C. T. Kinetics, Stoichiometry, and Identification of the Reactive Thiolate in the Inactivation of UDP-GlcNAc Enolpyruvoyl Transferase by the Antibiotic Fosfomycin. Easton, Pa., US. **Biochemistry** v. 33, p. 10646–10651, 1994.
- MCCARTHUR, J. D.; WEST, N. P.; COLE, J. N.; JUNGNTZ, H.; GUZMAN, C. A.; CHIN, J.; LEHRBACH, P. R.; DJORDJEVIC, S. P.; and WALKER, M. J. An aromatic amino acid auxotrophic mutant of *Bordetella bronchiseptica* is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection. Amsterdam, NL. **FEMS Microbiol. Lett.** v.221, p. 7-16, 2003.
- MCCONKEY, G. A. Targeting the Shikimate Pathway in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. Bethesda, Md., US. **Antimicrob. Agents and Chemother.** v. 43, p. 175-177, 1999.
- MCCONKEY, G. A.; ROGERS, M. J. and MCCUTCHAN, T. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* Protein Synthesis. Bethesda, Md., US. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 2046–2049, 1997.
- MCDEVITT, D.; PAYNE, D. J.; HOLMES, D. J. and ROSENBERG, M. Novel targets for the future development of antibacterial agents. Oxford, Inglaterra, GB. **J. Appl. Microbiol.** v. 92, p. 28S-34S, 2002.
- MICHAEL, G.; ROSZAK, A. W.; SAUVÉ, V.; MACLEAN, J.; MATTE, A.; COGGINS, J. R.; CYGLER, M.; and LAPTHORN, A. J. Structures of Shikimate Dehydrogenase *AroE* and Its Paralog YdiB. Bethesda, Md., US. **Journal of Biological Chemistry.** v. 278, p. 19463-19472, 2003.

- MILLAR, G., LEWENDON, A., HUNTER, M.G., and COGGINS, J.R. 1986. The cloning and expression of the *aroL* gene from *Escherichia coli* K12. Purification and complete amino acid sequence of shikimate kinase II, the *aroL*-gene product. London, GB. **Biochem. J.** v. 237, p. 427–437, 1986
- MIRANKER, A.; ROBINSON, C. V.; RADFORD, S. E.; APLIN, R. T. and DOBSON, C. M. Detection of transient protein folding populations by mass spectrometry. Washington, DC. **Science.** v. 262, p. 896 – 899, 1993.
- MORAL, C.H.; DEL CASTILLO, E.F.; FLERRO, P.L.; CORTES, A.V.; CASTILLO, J.A.; SORIANO, A.C.; SALAZAR, M.S.; PERALTA, B.R. and CARRASCO, G.N. Washington, US. **Infect. Immun.** v. 96, p. 1813–1821, 1988.
- NIMMESGERN, E., FOX, T., FLEMING, M. A. AND THOMSON, J. A. Conformational Changes and Stabilization of Inosine 5-Monophosphate Dehydrogenase Associated with Ligand Binding and Inhibition by Mycophenolic Acid. Bethesda, Md., US. **Journal of Biological Chemistry.** v. 271, p. 19421 – 19427, 1996.
- O'CALLAGHAN, D.; MASKELL, D.; LIEW, F. Y.; EASMON, C. S. and DOUGAN, G. Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. Washington, US. (1988) **Infect. Immun.** v. 56, p. 419-423, 1988.
- OLIVEIRA, J. S.; PINTO, C. A.; BASSO, L. A. and SANTOS, D. S. Cloning and Overexpression in Soluble Form of Functional Shikimate Kinase and 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. United States. **Protein Expression and Purification**, v. 22, p. 430-435, 2001.

- PARK, H.; HILSENBECK, J. L.; KIM, H. J.; SHUTTLEWORTH, W. A.; PARK, Y. H.; EVANS, J. N. and KANG, C. Structural Studies of *Streptococcus pneumoniae* EPSP Synthase in Unliganded State, Tetrahedral intermediate Bound State and S3P-GLP Bound State. Salem, Mass. US. **Molecular Microbiology**, v. 51, p.963 – 971, 2004.
- PEREIRA, J. H.; CANDURI, F.; DE OLIVEIRA, J. S.; DA SILVEIRA, N. J. F.; BASSO, L. A.; PALMA, M. S.; DE AZEVEDO JR, W. F. and SANTOS, D. S. Structural bioinformatics study of EPSP synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. Orlando, Fla. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 313, p. 608 – 614, 2003.
- PEREIRA, J. H., DE OLIVEIRA, J. S., CANDURI, F., DIAS, M. V., PALMA, M. S., BASSO, L. A., SANTOS, D. S., and DE AZEVEDO, W. F., JR. Structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the binding of shikimic acid. Copenhagen, DK. **Acta Crystallogr. D**, v. 60, p. 2310-2319, 2004.
- PERUTZ, M. F. **Proteins and Nucleic Acids**. Elsevier, Amsterdam, 1962.
- PITTARD, A. J. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington, D. C. **American Society for Microbiology**, v. 1, p. 368-394, 1987.
- PTITSYN, O. B. Molten globule and protein folding. New York, US. **Advanced in Protein Chemistry**. v. 47, p. 83 - 229, 1995.
- PRIESTMAN, M. A.; FUNKE, T.; SINGH, I. M.; CRUPPER, S. S. and SCHÖNBRUNN, E. Molecular Basis for the Glyphosate-Insensitivity of the Reaction of 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase with Shikimate. Amsterdam, NL. **FEBS Letters**, v. 579, p. 728-732, 2005.

- REIMIGY, H.; JAQUINOD, M.; PETILLOT, Y.; GAGNON, J.; CHENG, H.; XIA, B.; MARKLEY, J. L.; HURLEY, J. K.; TOLLIN, G.; and FOREST, E. Probing the Influence of Mutations on the Stability of a Ferredoxin by Mass Spectrometry. New York, US. **Journal of Protein Chemistry**. v. 16, p. 527 – 532, 1997.
- ROBERTS, F.; ROBERTS, C. W.; JOHNSON, J. J.; KYLE, D. E.; KRELL, T.; COGGINS, J. R.; COOMBS, G. H.; MILHOUS, W. K.; TZIPORI, S.; FERGUSON, D. J. P.; CHAKRABARTI, D. and MC LEOD, R. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. **Nature** v. 393, p. 801-805, 1998.
- ROBERTS, C. W.; ROBERTS, F.; LYONS, R. E.; KIRISITS, M. J.; MUI, E. J.; FINNERTY, J.; JOHNSON, J. J.; FERGUSON, D. J.; COGGINS, J. R.; KRELL, T.; COOMBS, G. H.; MILHOUS, W. K.; KYLE, D. E.; TZIPORI, S.; BARNWELL, J.; DAME, J. B.; CARLTON, J. and MCLEOD, R. The Shikimate Pathway and Its Branches in Apicomplexan Parasites. Chicago, Ill., US. **J. Infect. Dis.** v. 185, p. S25-S36, 2002.
- ROGERS, M. J., CUNDLIFFE, E. and MCCUTCHAN, T. F. The Antibiotic Micrococcin Is a Potent Inhibitor of Growth and Protein Synthesis in the Malaria Parasite. Bethesda, Md., US. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 42, p. 715–716, 1998.
- SCHONBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W. A.; SCHLOSS, J. V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J. N. S. and KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Washington, US. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 98, p. 1376 – 1380, 2001.
- SHORTLE, D. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 6, p. 24-30, 1996.

- SKARZYNSKI, T.; MISTRY, A.; WONACOTT, A.; HUTCHINSON, S. E.; KELLY, V. A. and DUNCAN, K. Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomicin. Philadelphia, Pa. **Structure**, v. 4, p. 1465–1474, 1996.
- SMITH, L. J.; FIEBIG, K. M.; SCHWALBE, H. and DOBSON, C. M. **Folding Design**. v. 1, p. R95-R106, 1996.
- SMITH, D. L. local Structure and Dynamics in Proteins Characterized by Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry, Lincoln, University of Nebraska-Lincoln. Disponível em <http://www.protein.bio.msu.edu/biokhimiya/contents/v63/full/63030338.htm>, 1997.
- SMITH, D. L.; DENG, Y. and ZHANG, Z. Probing the Non-covalent Structure of Proteins by Amide Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry. Chichester, Inglaterra, GB. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 32, p. 132 – 146, 1997.
- SPOLAR, R. S. AND RECORD, M. T. JR. Coupling of Local Folding to Site-Specific Binding of Proteins to DNA. Washington, DC. **Science**. v. 263, p. 777-784, 1994.
- STALLINGS, W. C.; ABDEMEGUID, S. S.; LIM, L. W.; SHIEH, H. S.; DAYRINGER, H. E.; LEIMGRUBER, N. K.; STEGEMAN, R. A.; ANDERSON, K. S.; SIKORSKI, J. A.; PADGETTE, S. R. and KISHORE, G. M. Structural and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: A distinctive protein fold. Washington, US. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 88, p. 5046 – 5050, 1991.

- STUDELSKA, D. R.; KLUG, C. A.; BEUSEN, D. D.; MCDOWELL, L. M. and SCHAEFER, J. Long-range distance measurements of protein binding sites by rotational-echo double-resonance NMR. Easton, Pa., US. **J. Am. Chem. Soc.** v. 118, p. 5476–5477, 1996
- STAINRUCKEN, H. C. and ARMHEIN, N. Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of UDP- N-acetylglucosamine Enolpyruvyltransferase of *Enterobacter cloacae*. Orlando, Fla. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 94, p. 1207 – 1212, 1980.
- STAUFFER, M. E.; YOUNG, J. K.; HELMS, G. L. and EVANS, J. N. S. Chemical shift mapping of shikimate-3-phosphate binding to the isolated N-terminal domain of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Amsterdam, NL. **FEBS Letters**, v. 499, 182-186, 2001.
- THOMAS, P. J.; QU, B. H. and PEDERSEN, P. L. Defective protein folding as a basis of human disease. Amsterdam, NL. **Trends in Biochemical Sciences.** v. 20, p. 456-459, 1995.
- VAN HEIJENOORT, J. IN *BACTERIAL CELL WALL*), ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, 27, PP. 39–54, 1994.
- VONRHEIN, C., SCHLAUDERER, G. J. and SCHULZ, G. E. Movie of the structural changes during a catalytic cycle of nucleoside monophosphate kinases. Philadelphia, Pa., US. **Structure**, 3, p. 483-490, 1995.
- VRIEND, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. Guildford, Inglaterra, GB. **Journal of Molecular Graphics**, v. 8, p. 52 – 56, 1990.



- WADE-JARDETZKY, N.; BRAY, R. P.; CONOVER, W. W.; JARDETZKY, O.; GEISLER, N. and WEBER, K. Differential mobility of the N-terminal headpiece in the lac-repressor protein. London, GB. **Journal of Molecular Biology**. v. 128, p. 259-264, 1979.
- WAGNER, T.; SHUMILIN, I. A.; BAUERLE, R. and KRETSINGER, R. H. Structure of 3-Deoxy-d-arabino-heptulosonate-7-phosphate Synthase from *Escherichia coli*: Comparison of the  $Mn^{2+}$ -Phosphoglycolate and the  $Pb^{2+}$ -Phosphoenolpyruvate Complexes and Implications for Catalysis. London, GB. **Journal of Molecular Biology**. v. 301, p. 389–399, 2000
- WANG, F. and TANG, X. Conformational Heterogeneity and Stability of Apomyoglobin Studied by Hydrogen/Deuterium Exchange and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Easton, Pa. **Biochemistry**. v. 35, p. 4069-4078, 1996.
- WANG, F.; SCAPIN, G.; BLANCHARD, J. S.; and ANGELETTI, R. H. Substrate binding and conformational changes of *Clostridium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase revealed by hydrogen/deuterium exchange and electrospray mass spectrometry. Cold Spring Harbor, Ny, US. **Protein Science**. v. 7, p. 293-299, 1998.
- WHIPP, M.J. and PITTARD, A.J. A reassessment of the relationship between *aroK*- and *aroL*-encoded shikimate kinase enzymes of *Escherichia coli*. Washington, US. **J. Bacteriol.** v. 177: 1627–1629, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control**. WHO Report Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB2001. 287, 2001.

- WOODWARD, C.; SIMON, I. and TUCHSEN, E. Hydrogen exchange and the dynamic structure of proteins. The Hague, Holanda, NL. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 48, p. 135 – 160, 1982.
- YAN, X.; BRODERICK, D.; LEID, M. E.; SCHIMERLIK, M. I.; and DEINZER, M. L. Dynamics and Ligand-Induced Solvent Accessibility Changes in Human Retinoid X Receptor Homodimer Determined by Hydrogen Deuterium Exchange and Mass Spectrometry. Easton, Pa. **Biochemistry**, 43, p. 909 – 917, 2004.
- ZHANG, Z. and SMITH, D. L. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation. Cold Spring Harbor, Ny, US. **Protein Science**. v. 2, p. 522 – 531, 1993.
- ZHANG, Z. and SMITH, D. L. Thermal-induced unfolding domains in aldolase identified by amide hydrogen exchange and mass spectrometry. Cold Spring Harbor, Ny, US. **Protein Science**. v. 5, p. 1282 – 1289, 1996.

## 10. APÊNDICE

## Anexo 1

## Deuteração dos peptídeos fragmentos obtidos para a MtePSPS na ausência de ligante

| Resíduos  | m/z  | Carga | N  | 1 min   | 3 min    | 8 min    | 15 min   | 60 min    | 3 horas   | 8 horas   | Total     |
|-----------|------|-------|----|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 - 6     | 733  | 1     | 5  | 0 (0%)  | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 5 - 9     | 457  | 1     | 4  | 0 (0%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 3 (75%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 10 - 15   | 640  | 1     | 5  | 0 (0%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 3 (60%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 16 - 32   | 1771 | 1     | 16 | 1 (6%)  | 3 (19%)  | 6 (38%)  | 9 (56%)  | 9 (56%)   | 12 (75%)  | 14 (88%)  | 14 (88%)  |
| 33 - 36   | 344  | 1     | 3  | 0 (0%)  | 1 (33%)  | 1 (33%)  | 2 (66%)  | 2 (66%)   | 3 (100%)  | 3 (100%)  | 3 (100%)  |
| 37 - 43   | 630  | 1     | 6  | 1 (17%) | 1 (17%)  | 2 (34%)  | 3 (50%)  | 4 (67%)   | 5 (83%)   | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 44 - 49   | 535  | 1     | 5  | 2 (40%) | 3 (60%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)   | 4 (80%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 50 - 59   | 1233 | 1     | 9  | 1 (11%) | 3 (33%)  | 5 (56%)  | 6 (67%)  | 9 (100%)  | 9 (100%)  | 9 (100%)  | 9 (100%)  |
| 51 - 57   | 876  | 1     | 6  | 1 (17%) | 2 (34%)  | 3 (50%)  | 4 (67%)  | 5 (83%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   |
| 60 - 65   | 660  | 1     | 5  | 1 (20%) | 3 (60%)  | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 63 - 67   | 514  | 1     | 4  | 2 (50%) | 3 (75%)  | 3 (75%)  | 4 (100%) | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 68 - 76   | 931  | 1     | 8  | 3 (37%) | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 8 (100%) | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 77 - 82   | 632  | 1     | 5  | 2 (40%) | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 83 - 94   | 1170 | 1     | 11 | 4 (36%) | 4 (36%)  | 5 (45%)  | 9 (81%)  | 11 (100%) | 11 (100%) | 11 (100%) | 11 (100%) |
| 95 - 101  | 763  | 1     | 6  | 4 (67%) | 4 (67%)  | 4 (67%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   |
| 102 - 107 | 496  | 1     | 5  | 3 (60%) | 3 (60%)  | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 108 - 115 | 819  | 1     | 7  | 6 (86%) | 6 (86%)  | 7 (100%) | 7 (100%) | 7 (100%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  |
| 116 - 121 | 633  | 1     | 5  | 4 (80%) | 4 (80%)  | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 122 - 127 | 669  | 1     | 5  | 2 (40%) | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   |
| 128 - 132 | 528  | 1     | 4  | 2 (50%) | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)   | 2 (50%)   | 3 (75%)   | 3 (75%)   |
| 134 - 145 | 1186 | 1     | 11 | 3 (27%) | 4 (36%)  | 7 (64%)  | 9 (81%)  | 10 (91%)  | 10 (91%)  | 11 (100%) | 11 (100%) |
| 146 - 155 | 1173 | 1     | 9  | 5 (56%) | 5 (56%)  | 5 (56%)  | 6 (67%)  | 7 (77%)   | 8 (88%)   | 8 (88%)   | 8 (88%)   |
| 156 - 161 | 475  | 1     | 5  | 2 (40%) | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 4 (80%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 160 - 168 | 819  | 1     | 8  | 3 (37%) | 3 (37%)  | 3 (37%)  | 4 (50%)  | 6 (75%)   | 7 (88%)   | 7 (88%)   | 7 (88%)   |
| 163 - 170 | 812  | 1     | 7  | 3 (43%) | 4 (57%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)  | 6 (86%)   | 6 (86%)   | 6 (86%)   | 6 (86%)   |
| 171 - 176 | 601  | 1     | 5  | 2 (40%) | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 177 - 181 | 482  | 1     | 4  | 2 (50%) | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 3 (75%)  | 3 (75%)   | 3 (75%)   | 3 (75%)   | 3 (75%)   |
| 180 - 185 | 639  | 1     | 5  | 2 (40%) | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 3 (60%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 186 - 194 | 929  | 1     | 8  | 7 (88%) | 7 (88%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 197 - 204 | 810  | 1     | 7  | 6 (86%) | 6 (86%)  | 6 (86%)  | 6 (86%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  |
| 195 - 200 | 621  | 1     | 5  | 4 (80%) | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 202 - 207 | 637  | 1     | 5  | 4 (80%) | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 208 - 214 | 758  | 1     | 6  | 4 (67%) | 4 (67%)  | 4 (67%)  | 4 (67%)  | 5 (83%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   |

|           |      |   |    |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|------|---|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 215 - 222 | 991  | 1 | 7  | 5 (71%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)  | 7 (100%) | 7 (100%) | 7 (100%) | 7 (100%) | 7 (100%) |
| 223 - 234 | 1392 | 1 | 11 | 4 (36%)  | 5 (45%)  | 6 (55%)  | 8 (73%)  | 10 (91%) | 10 (91%) | 10 (91%) | 10 (91%) |
| 235 - 240 | 701  | 1 | 5  | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%) |
| 243 - 251 | 848  | 1 | 8  | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 5 (62%)  | 6 (75%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  |
| 241 - 245 | 475  | 1 | 4  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 3 (75%)  | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) |
| 248 - 259 | 1116 | 1 | 11 | 4 (36%)  | 4 (36%)  | 4 (36%)  | 5 (45%)  | 5 (45%)  | 6 (55%)  | 8 (73%)  | 8 (73%)  |
| 260 - 273 | 1562 | 1 | 13 | 6 (46%)  | 6 (46%)  | 6 (46%)  | 10 (77%) | 10 (77%) | 11 (85%) | 11 (85%) | 11 (85%) |
| 269 - 279 | 1118 | 1 | 10 | 5 (50%)  | 5 (50%)  | 5 (50%)  | 7 (70%)  | 7 (70%)  | 7 (70%)  | 8 (80%)  | 8 (80%)  |
| 276 - 280 | 624  | 1 | 4  | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) |
| 281 - 287 | 724  | 1 | 6  | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 286 - 299 | 1488 | 1 | 13 | 5 (38%)  | 5 (38%)  | 5 (38%)  | 7 (54%)  | 7 (54%)  | 7 (54%)  | 10 (77%) | 10 (77%) |
| 300 - 308 | 1007 | 1 | 8  | 5 (62%)  | 5 (62%)  | 5 (62%)  | 6 (75%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  |
| 309 - 317 | 872  | 1 | 8  | 5 (62%)  | 5 (62%)  | 5 (62%)  | 6 (75%)  | 7 (88%)  | 8 (100%) | 8 (100%) | 8 (100%) |
| 313 - 319 | 658  | 1 | 6  | 2 (34%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 4 (67%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)  |
| 322 - 331 | 986  | 1 | 9  | 2 (22%)  | 2 (22%)  | 2 (22%)  | 3 (33%)  | 3 (33%)  | 7 (77%)  | 8 (88%)  | 8 (88%)  |
| 330 - 338 | 1022 | 1 | 8  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 7 (88%)  | 8 (100%) | 8 (100%) |
| 341 - 349 | 1046 | 1 | 8  | 3 (37%)  | 3 (37%)  | 3 (37%)  | 3 (37%)  | 4 (50%)  | 5 (62%)  | 6 (75%)  | 6 (75%)  |
| 347 - 352 | 633  | 1 | 5  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 4 (80%)  | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%) |
| 351 - 359 | 989  | 1 | 8  | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 6 (75%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  |
| 356 - 366 | 1105 | 1 | 10 | 2 (20%)  | 2 (20%)  | 2 (20%)  | 3 (30%)  | 4 (40%)  | 6 (60%)  | 7 (70%)  | 7 (70%)  |
| 367 - 373 | 714  | 1 | 6  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 374 - 378 | 628  | 1 | 4  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) |
| 382 - 389 | 902  | 1 | 7  | 2 (28%)  | 2 (28%)  | 2 (28%)  | 4 (57%)  | 4 (57%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)  |
| 388 - 392 | 478  | 1 | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) |
| 393 - 398 | 628  | 1 | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 5 (100%) | 5 (100%) |
| 399 - 405 | 746  | 1 | 6  | 1 (17%)  | 1 (17%)  | 1 (17%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)  |
| 406 - 412 | 705  | 1 | 6  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 413 - 419 | 944  | 1 | 6  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 4 (67%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)  |
| 420 - 429 | 1031 | 1 | 9  | 4 (44%)  | 5 (55%)  | 5 (55%)  | 6 (67%)  | 8 (88%)  | 9 (100%) | 9 (100%) | 9 (100%) |

- Os valores entre parêntesis indicam o percentual de deuteração dos peptídeos nos respectivos tempos de exposição ao solvente deuterado; **N** indica o número de ligações amida no peptídeo fragmento; **m/z** indica a relação massa/carga do peptídeo fragmento

**Deuteração dos peptídeos fragmentos obtidos para a MtEPSPS na presença de glifosato**

| Resíduos  | m/z  | Carga | N  | 1 min    | 3 min    | 8 min    | 15 min   | 60 min   | 3 h       | 8 h       | Total     |
|-----------|------|-------|----|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 - 6     | 733  | 1     | 5  | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 5 - 9     | 457  | 1     | 4  | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 10 - 15   | 640  | 1     | 5  | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)  | 5 (100%) | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 16 - 32   | 1771 | 1     | 16 | 4 (25%)  | 4 (25%)  | 6 (38%)  | 8 (50%)  | 12 (75%) | 12 (75%)  | 12 (75%)  | 12 (75%)  |
| 33 - 36   | 344  | 1     | 3  | 1 (33%)  | 1 (33%)  | 1 (33%)  | 1 (33%)  | 1 (33%)  | 2 (66%)   | 2 (66%)   | 2 (66%)   |
| 37 - 43   | 630  | 1     | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 2 (34%)  | 3 (50%)  | 4 (66%)   | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 44 - 49   | 535  | 1     | 5  | 0 (0%)   | 0 (0%)   | 0 (0%)   | 0 (0%)   | 1 (20%)  | 2 (40%)   | 3 (60%)   | 3 (60%)   |
| 50 - 59   | 1233 | 1     | 9  | 1 (11%)  | 1 (11%)  | 2 (22%)  | 2 (22%)  | 2 (22%)  | 4 (44%)   | 5 (55%)   | 5 (55%)   |
| 51 - 57   | 876  | 1     | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 2 (34%)   | 4 (66%)   | 4 (66%)   |
| 60 - 65   | 660  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   |
| 63 - 67   | 514  | 1     | 4  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 3 (75%)  | 4 (100%) | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 68 - 76   | 931  | 1     | 8  | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 6 (75%)  | 8 (100%) | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 77 - 82   | 632  | 1     | 5  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 4 (80%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 83 - 94   | 1170 | 1     | 11 | 3 (27%)  | 3 (27%)  | 3 (27%)  | 4 (36%)  | 4 (36%)  | 4 (36%)   | 5 (45%)   | 5 (45%)   |
| 95 - 101  | 763  | 1     | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)   | 2 (34%)   | 2 (34%)   |
| 102 - 107 | 496  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 2 (40%)   | 3 (60%)   | 3 (60%)   |
| 108 - 115 | 819  | 1     | 7  | 1 (14%)  | 1 (14%)  | 1 (14%)  | 1 (14%)  | 1 (14%)  | 3 (42%)   | 4 (56%)   | 4 (56%)   |
| 116 - 121 | 633  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 3 (60%)  | 4 (80%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 122 - 127 | 669  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 3 (60%)   | 3 (60%)   |
| 128 - 132 | 528  | 1     | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 2 (50%)  | 3 (75%)   | 3 (75%)   | 3 (75%)   |
| 134 - 145 | 1186 | 1     | 11 | 3 (27%)  | 3 (27%)  | 3 (27%)  | 4 (36%)  | 6 (54%)  | 7 (63%)   | 8 (72%)   | 8 (72%)   |
| 146 - 155 | 1173 | 1     | 9  | 3 (33%)  | 3 (33%)  | 3 (33%)  | 3 (33%)  | 3 (33%)  | 5 (55%)   | 6 (66%)   | 6 (66%)   |
| 156 - 161 | 475  | 1     | 5  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 4 (80%)  | 4 (80%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 160 - 168 | 819  | 1     | 8  | 3 (38%)  | 3 (38%)  | 3 (38%)  | 4 (50%)  | 5 (62%)  | 6 (75%)   | 6 (75%)   | 6 (75%)   |
| 163 - 170 | 812  | 1     | 7  | 2 (28%)  | 2 (28%)  | 2 (28%)  | 3 (42%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)   | 5 (71%)   | 5 (71%)   |
| 171 - 176 | 601  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   |
| 177 - 181 | 482  | 1     | 4  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)   | 3 (75%)   | 3 (75%)   |
| 180 - 185 | 639  | 1     | 5  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 186 - 194 | 929  | 1     | 8  | 5 (62%)  | 5 (62%)  | 5 (62%)  | 5 (62%)  | 6 (75%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 197 - 204 | 810  | 1     | 7  | 3 (42%)  | 3 (42%)  | 3 (42%)  | 3 (42%)  | 4 (56%)  | 4 (56%)   | 5 (71%)   | 5 (71%)   |
| 195 - 200 | 621  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   |
| 202 - 207 | 637  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   |
| 208 - 214 | 758  | 1     | 6  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 4 (66%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   |
| 215 - 222 | 991  | 1     | 7  | 3 (42%)  | 3 (42%)  | 3 (42%)  | 4 (56%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)   | 6 (85%)   | 6 (85%)   |
| 223 - 234 | 1392 | 1     | 11 | 7 (63%)  | 7 (63%)  | 8 (72%)  | 9 (82%)  | 10 (91%) | 11 (100%) | 11 (100%) | 11 (100%) |

|           |      |   |    |          |          |          |          |          |          |           |           |
|-----------|------|---|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| 235 - 240 | 701  | 1 | 5  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 3 (60%)   |
| 243 - 251 | 848  | 1 | 8  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 3 (38%)  | 4 (50%)  | 4 (50%)  | 6 (75%)  | 7 (88%)   | 7 (88%)   |
| 241 - 245 | 475  | 1 | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (75%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 248 - 259 | 1116 | 1 | 11 | 1 (9%)   | 1 (9%)   | 1 (9%)   | 1 (9%)   | 2 (18%)  | 2 (18%)  | 5 (45%)   | 5 (45%)   |
| 260 - 273 | 1118 | 1 | 13 | 2 (20%)  | 2 (20%)  | 2 (20%)  | 3 (30%)  | 3 (30%)  | 5 (50%)  | 6 (60%)   | 6 (60%)   |
| 269 - 279 | 1562 | 1 | 10 | 5 (38%)  | 5 (38%)  | 5 (38%)  | 6 (46%)  | 8 (61%)  | 8 (61%)  | 9 (69%)   | 9 (69%)   |
| 276 - 280 | 624  | 1 | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 2 (40%)   | 2 (40%)   |
| 281 - 287 | 724  | 1 | 6  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)   | 4 (66%)   |
| 286 - 299 | 1488 | 1 | 13 | 4 (31%)  | 4 (31%)  | 4 (31%)  | 5 (38%)  | 6 (46%)  | 8 (61%)  | 9 (69%)   | 9 (69%)   |
| 300 - 308 | 1007 | 1 | 8  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 3 (38%)  | 4 (50%)  | 6 (75%)  | 7 (88%)   | 7 (88%)   |
| 309 - 317 | 872  | 1 | 8  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 4 (50%)  | 5 (62%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 313 - 319 | 658  | 1 | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 2 (33%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)   | 3 (50%)   |
| 322 - 331 | 986  | 1 | 9  | 2 (22%)  | 2 (22%)  | 2 (22%)  | 2 (22%)  | 3 (33%)  | 5 (55%)  | 5 (55%)   | 5 (55%)   |
| 330 - 338 | 597  | 1 | 8  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 4 (80%)   | 4 (80%)   |
| 341 - 349 | 1046 | 1 | 8  | 1 (13%)  | 1 (13%)  | 1 (13%)  | 1 (13%)  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 3 (38%)   | 3 (38%)   |
| 347 - 352 | 1304 | 1 | 5  | 1 (10%)  | 1 (10%)  | 1 (10%)  | 1 (10%)  | 3 (30%)  | 5 (50%)  | 5 (50%)   | 5 (50%)   |
| 351 - 359 | 989  | 1 | 8  | 1 (13%)  | 1 (13%)  | 1 (13%)  | 1 (13%)  | 3 (38%)  | 5 (62%)  | 5 (62%)   | 5 (62%)   |
| 356 - 366 | 1105 | 1 | 10 | 3 (30%)  | 3 (30%)  | 3 (30%)  | 3 (30%)  | 4 (40%)  | 6 (60%)  | 7 (70%)   | 7 (70%)   |
| 367 - 373 | 714  | 1 | 6  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 3 (50%)  | 4 (66%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 374 - 378 | 628  | 1 | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 2 (40%)  | 3 (75%)  | 3 (75%)  | 3 (75%)   | 3 (75%)   |
| 382 - 389 | 902  | 1 | 7  | 1 (14%)  | 1 (14%)  | 1 (14%)  | 2 (28%)  | 2 (28%)  | 2 (28%)  | 3 (42%)   | 3 (42%)   |
| 388 - 392 | 478  | 1 | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 1 (25%)  | 2 (40%)   | 2 (40%)   |
| 393 - 398 | 628  | 1 | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)  | 5 (100%) | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 399 - 405 | 746  | 1 | 6  | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 406 - 412 | 705  | 1 | 6  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 2 (34%)  | 4 (66%)   | 4 (66%)   |
| 413 - 419 | 944  | 1 | 6  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 6 (100%) | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 420 - 429 | 746  | 1 | 9  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 4 (66%)  | 4 (66%)  | 6 (100%) | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 428 - 434 | 1031 | 1 | 6  | 3 (33%)  | 4 (44%)  | 6 (66%)  | 8 (88%)  | 9 (99%)  | 9 (99%)  | 9 (99%)   | 9 (99%)   |
| 432 - 440 | 996  | 1 | 8  | 6 (75%)  | 6 (75%)  | 6 (75%)  | 7 (88%)  | 7 (88%)  | 8 (100%) | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 432 - 450 | 1923 | 1 | 18 | 14 (77%) | 14 (77%) | 14 (77%) | 16 (89%) | 17 (94%) | 17 (94%) | 18 (100%) | 18 (100%) |

\* Os valores entre parêntesis indicam o percentual de deuteração dos peptídeos nos respectivos tempos de exposição ao solvente deuterado; **N** indica o número de ligações amida no peptídeo fragmento; **m/z** indica a relação massa/carga do peptídeo fragmento.

## Anexo 3

## Deuteração dos peptídeos fragmentos obtidos para a MTEPSPS na presença de fosfoenolpiruvato

| Resíduos  | m/z  | Carga | N  | 1 min      | 3min       | 8 min      | 15 min      | 60 min      | 3h          | 8h          | Total       |
|-----------|------|-------|----|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 - 6     | 733  | 1     | 5  | 5 ( 100% ) | 5 ( 100% ) | 5 ( 100% ) | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 5 - 9     | 457  | 1     | 4  | 3 ( 75% )  | 3 ( 75% )  | 3 ( 75% )  | 4 ( 100% )  | 4 ( 100% )  | 4 ( 100% )  | 4 ( 100% )  | 4 ( 100% )  |
| 10 - 15   | 640  | 1     | 5  | 3 ( 60% )  | 4 ( 80% )  | 5 ( 100% ) | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 16 - 32   | 1771 | 1     | 16 | 4 ( 25% )  | 5 ( 31% )  | 9 ( 56% )  | 9 ( 56% )   | 14 ( 88% )  | 14 ( 88% )  | 14 ( 88% )  | 14 ( 88% )  |
| 33 - 36   | 344  | 1     | 3  | 1 ( 33% )  | 1 ( 33% )  | 1 ( 33% )  | 1 ( 33% )   | 2 ( 66% )   | 3 ( 100% )  | 3 ( 100% )  | 3 ( 100% )  |
| 37 - 43   | 630  | 1     | 6  | 1 ( 16% )  | 1 ( 16% )  | 1 ( 16% )  | 4 ( 67% )   | 6 ( 100% )  | 6 ( 100% )  | 6 ( 100% )  | 6 ( 100% )  |
| 44 - 49   | 535  | 1     | 5  | 0 ( 0% )   | 0 ( 0% )   | 0 ( 0% )   | 0 ( 0% )    | 1 ( 20% )   | 2 ( 40% )   | 3 ( 60% )   | 3 ( 60% )   |
| 50 - 59   | 1233 | 1     | 9  | 1 ( 11% )  | 1 ( 11% )  | 1 ( 11% )  | 2 ( 22% )   | 2 ( 22% )   | 4 ( 44% )   | 5 ( 55% )   | 5 ( 55% )   |
| 51 - 57   | 876  | 1     | 6  | 1 ( 16% )  | 1 ( 16% )  | 1 ( 16% )  | 1 ( 16% )   | 1 ( 16% )   | 2 ( 34% )   | 5 ( 83% )   | 5 ( 83% )   |
| 60 - 65   | 660  | 1     | 5  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 2 ( 40% )   | 3 ( 60% )   | 4 ( 80% )   | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 63 - 67   | 514  | 1     | 4  | 1 ( 25% )  | 1 ( 25% )  | 1 ( 25% )  | 2 ( 50% )   | 2 ( 50% )   | 4 ( 100% )  | 4 ( 100% )  | 4 ( 100% )  |
| 68 - 76   | 931  | 1     | 8  | 3 ( 37% )  | 4 ( 50% )  | 4 ( 50% )  | 7 ( 87,5% ) | 7 ( 87,5% ) | 8 ( 100% )  | 8 ( 100% )  | 8 ( 100% )  |
| 77 - 82   | 632  | 1     | 5  | 3 ( 60% )  | 3 ( 60% )  | 3 ( 60% )  | 3 ( 60% )   | 3 ( 60% )   | 4 ( 80% )   | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 83 - 94   | 1170 | 1     | 11 | 3 ( 27% )  | 4 ( 36% )  | 4 ( 36% )  | 4 ( 36% )   | 6 ( 54% )   | 6 ( 54% )   | 7 ( 63% )   | 7 ( 63% )   |
| 95 - 101  | 763  | 1     | 6  | 1 ( 16% )  | 4 ( 67% )  | 4 ( 67% )  | 4 ( 67% )   | 4 ( 67% )   | 4 ( 67% )   | 5 ( 83% )   | 5 ( 83% )   |
| 102 - 107 | 496  | 1     | 5  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 2 ( 40% )   | 2 ( 40% )   | 3 ( 60% )   | 4 ( 80% )   | 4 ( 80% )   |
| 108 - 115 | 819  | 1     | 7  | 1 ( 14% )  | 1 ( 14% )  | 1 ( 14% )  | 1 ( 14% )   | 1 ( 14% )   | 2 ( 28% )   | 6 ( 86% )   | 6 ( 86% )   |
| 116 - 121 | 633  | 1     | 5  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )   | 3 ( 60% )   | 3 ( 60% )   | 4 ( 80% )   | 4 ( 80% )   |
| 122 - 127 | 669  | 1     | 5  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 2 ( 40% )   | 2 ( 40% )   | 3 ( 60% )   | 4 ( 80% )   | 4 ( 80% )   |
| 128 - 132 | 528  | 1     | 4  | 1 ( 25% )  | 1 ( 25% )  | 1 ( 25% )  | 1 ( 25% )   | 2 ( 50% )   | 2 ( 50% )   | 3 ( 75% )   | 3 ( 75% )   |
| 134 - 145 | 1186 | 1     | 11 | 1 ( 9% )   | 2 ( 18% )  | 4 ( 36% )  | 4 ( 36% )   | 6 ( 54% )   | 7 ( 63% )   | 9 ( 82% )   | 9 ( 82% )   |
| 146 - 155 | 1173 | 1     | 9  | 1 ( 11% )  | 2 ( 22% )  | 2 ( 22% )  | 3 ( 33% )   | 3 ( 33% )   | 5 ( 55% )   | 9 ( 99% )   | 9 ( 99% )   |
| 156 - 161 | 475  | 1     | 5  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 2 ( 40% )   | 4 ( 80% )   | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 160 - 168 | 819  | 1     | 8  | 3 ( 37% )  | 3 ( 37% )  | 3 ( 37% )  | 4 ( 50% )   | 5 ( 62% )   | 7 ( 87,5% ) | 7 ( 87,5% ) | 7 ( 87,5% ) |
| 163 - 170 | 812  | 1     | 7  | 1 ( 14% )  | 1 ( 14% )  | 3 ( 43% )  | 4 ( 57% )   | 5 ( 71% )   | 7 ( 100% )  | 7 ( 100% )  | 7 ( 100% )  |
| 171 - 176 | 601  | 1     | 5  | 1 ( 20% )  | 2 ( 40% )  | 4 ( 80% )  | 4 ( 80% )   | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 177 - 181 | 482  | 1     | 4  | 2 ( 50% )  | 2 ( 50% )  | 2 ( 50% )  | 2 ( 50% )   | 2 ( 50% )   | 3 ( 75% )   | 3 ( 75% )   | 3 ( 75% )   |
| 180 - 185 | 639  | 1     | 5  | 2 ( 40% )  | 2 ( 40% )  | 2 ( 40% )  | 2 ( 40% )   | 2 ( 40% )   | 4 ( 80% )   | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 186 - 194 | 929  | 1     | 8  | 5 ( 62% )  | 5 ( 62% )  | 5 ( 62% )  | 5 ( 62% )   | 6 ( 75% )   | 7 ( 87,5% ) | 7 ( 87,5% ) | 7 ( 87,5% ) |
| 197 - 204 | 810  | 1     | 7  | 3 ( 43% )  | 3 ( 43% )  | 3 ( 43% )  | 3 ( 43% )   | 4 ( 57% )   | 5 ( 71% )   | 6 ( 86% )   | 6 ( 86% )   |
| 195 - 200 | 621  | 1     | 5  | 2 ( 40% )  | 3 ( 60% )  | 3 ( 60% )  | 4 ( 80% )   | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 202 - 207 | 637  | 1     | 5  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 1 ( 20% )  | 2 ( 40% )   | 3 ( 60% )   | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  | 5 ( 100% )  |
| 208 - 214 | 758  | 1     | 6  | 0 ( 0% )   | 2 ( 34% )  | 2 ( 34% )  | 3 ( 50% )   | 4 ( 67% )   | 4 ( 67% )   | 6 ( 100% )  | 6 ( 100% )  |
| 215 - 222 | 991  | 1     | 7  | 0 ( 0% )   | 2 ( 28% )  | 2 ( 28% )  | 2 ( 28% )   | 2 ( 28% )   | 3 ( 43% )   | 5 ( 71% )   | 5 ( 71% )   |
| 223 - 234 | 1392 | 1     | 11 | 3 ( 27% )  | 7 ( 63% )  | 7 ( 63% )  | 9 ( 82% )   | 10 ( 91% )  | 11 ( 100% ) | 11 ( 100% ) | 11 ( 100% ) |

|           |      |   |    |          |           |           |           |           |           |           |           |
|-----------|------|---|----|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 235 - 240 | 701  | 1 | 5  | 2 (40%)  | 2 (40%)   | 2 (40%)   | 3 (60%)   | 3 (60%)   | 4 (80%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 243 - 251 | 848  | 1 | 8  | 3 (37%)  | 3 (37%)   | 3 (37%)   | 4 (50%)   | 4 (50%)   | 6 (75%)   | 7 (87,5%) | 7 (87,5%) |
| 241 - 245 | 475  | 1 | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)   | 2 (50%)   | 2 (50%)   | 2 (50%)   | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 248 - 259 | 1116 | 1 | 11 | 3 (27%)  | 7 (63%)   | 7 (63%)   | 7 (63%)   | 7 (63%)   | 7 (63%)   | 7 (63%)   | 7 (63%)   |
| 260 - 273 | 1562 | 1 | 13 | 5 (38%)  | 6 (46%)   | 8 (61%)   | 8 (61%)   | 8 (61%)   | 9 (69%)   | 10 (77%)  | 10 (77%)  |
| 269 - 279 | 1118 | 1 | 10 | 1 (10%)  | 5 (50%)   | 5 (50%)   | 10 (100%) | 10 (100%) | 10 (100%) | 10 (100%) | 10 (100%) |
| 276 - 280 | 624  | 1 | 4  | 2 (50%)  | 2 (50%)   | 3 (75%)   | 3 (75%)   | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 281 - 287 | 724  | 1 | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)   | 1 (16%)   | 4 (67%)   | 4 (67%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   |
| 286 - 299 | 1488 | 1 | 13 | 7 (54%)  | 8 (61%)   | 8 (61%)   | 8 (61%)   | 8 (61%)   | 9 (69%)   | 11 (84%)  | 11 (84%)  |
| 300 - 308 | 1007 | 1 | 8  | 2 (25%)  | 2 (25%)   | 2 (25%)   | 3 (37%)   | 3 (37%)   | 5 (62%)   | 6 (75%)   | 6 (75%)   |
| 309 - 317 | 872  | 1 | 8  | 3 (37%)  | 7 (87,5%) | 7 (87,5%) | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 313 - 319 | 658  | 1 | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)   | 1 (16%)   | 2 (33%)   | 2 (33%)   | 3 (50%)   | 4 (66%)   | 4 (66%)   |
| 322 - 331 | 986  | 1 | 9  | 2 (22%)  | 2 (22%)   | 2 (22%)   | 2 (22%)   | 3 (33%)   | 5 (55%)   | 7 (77%)   | 7 (77%)   |
| 330 - 338 | 1022 | 1 | 8  | 6 (75%)  | 6 (75%)   | 7 (87,5%) | 7 (87,5%) | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 341 - 349 | 1046 | 1 | 8  | 0 (0%)   | 2 (25%)   | 3 (37%)   | 3 (37%)   | 3 (37%)   | 3 (37%)   | 3 (37%)   | 3 (37%)   |
| 347 - 352 | 633  | 1 | 5  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  | 5 (100%)  |
| 351 - 359 | 989  | 1 | 8  | 4 (50%)  | 4 (50%)   | 4 (50%)   | 5 (62%)   | 6 (75%)   | 7 (88%)   | 7 (88%)   | 7 (88%)   |
| 356 - 366 | 1105 | 1 | 10 | 2 (20%)  | 2 (20%)   | 2 (20%)   | 2 (20%)   | 3 (30%)   | 4 (40%)   | 5 (50%)   | 5 (50%)   |
| 367 - 373 | 714  | 1 | 6  | 0 (0%)   | 3 (50%)   | 3 (50%)   | 3 (50%)   | 4 (67%)   | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 374 - 378 | 628  | 1 | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)   | 1 (25%)   | 2 (50%)   | 3 (75%)   | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 382 - 389 | 902  | 1 | 7  | 1 (14%)  | 1 (14%)   | 1 (14%)   | 2 (28%)   | 2 (28%)   | 4 (57%)   | 6 (86%)   | 6 (86%)   |
| 388 - 392 | 478  | 1 | 4  | 1 (25%)  | 1 (25%)   | 1 (25%)   | 1 (25%)   | 1 (25%)   | 2 (50%)   | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 393 - 398 | 628  | 1 | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)   | 1 (20%)   | 2 (40%)   | 3 (60%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   |
| 399 - 405 | 746  | 1 | 6  | 6 (100%) | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 406 - 412 | 705  | 1 | 6  | 2 (34%)  | 2 (34%)   | 2 (34%)   | 2 (34%)   | 2 (34%)   | 4 (67%)   | 5 (83%)   | 5 (83%)   |
| 413 - 419 | 944  | 1 | 6  | 5 (83%)  | 5 (83%)   | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 420 - 429 | 1031 | 1 | 9  | 1 (11%)  | 1 (11%)   | 5 (55%)   | 5 (55%)   | 8 (88%)   | 9 (99%)   | 9 (99%)   | 9 (99%)   |
| 428 - 434 | 746  | 1 | 6  | 3 (50%)  | 3 (50%)   | 3 (50%)   | 4 (67%)   | 4 (67%)   | 5 (83%)   | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 432 - 440 | 996  | 1 | 8  | 2 (25%)  | 2 (25%)   | 4 (50%)   | 7 (87,5%) | 7 (87,5%) | 7 (87,5%) | 8 (100%)  | 8 (100%)  |
| 432 - 450 | 1923 | 1 | 18 | 2 (11%)  | 4 (22%)   | 11 (61%)  | 12 (67%)  | 13 (72%)  | 15 (83%)  | 16 (89%)  | 16 (89%)  |

\* Os valores entre parêntesis indicam o percentual de deuteração dos peptídeos nos respectivos tempos de exposição ao solvente deuterado; **N** indica o número de ligações amida no peptídeo fragmento; **m/z** indica a relação massa/carga do peptídeo fragmento.



## Anexo 4

**Deuteração dos peptídeos fragmentos obtidos para a enzima Chiquimato Quinase na ausência de ligantes**

| resíduos | m/z  | Carga | N  | 1 min    | 3 min    | 8 min    | 15 min   | 60 min   | 3 horas  | 8 horas  | total    |
|----------|------|-------|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1-7      | 745  | 1     | 6  | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 8-22     | 1497 | 1     | 14 | 9(64%)   | 10(77%)  | 10(77%)  | 12(85%)  | 12(85%)  | 12(85%)  | 12(85%)  | 12(85%)  |
| 24-26    | 331  | 1     | 2  | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) |
| 27-30    | 345  | 1     | 3  | 2(66%)   | 3 (100%) | 3 (100%) | 3 (100%) | 3 (100%) | 3 (100%) | 3 (100%) | 3 (100%) |
| 31-37    | 746  | 1     | 6  | 1(16%)   | 1(16%)   | 2 (33%)  | 2 (33%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 4(66%)   | 4(66%)   |
| 38-48    | 1245 | 1     | 10 | 4(40%)   | 4(40%)   | 5(50%)   | 5(50%)   | 7(70%)   | 7(70%)   | 7(70%)   | 7(70%)   |
| 50-57    | 896  | 1     | 7  | 2(28%)   | 3(42%)   | 4(57%)   | 4(57%)   | 4(57%)   | 5(71%)   | 5(71%)   | 5(71%)   |
| 51-57    | 825  | 1     | 6  | 3 (50%)  | 3 (50%)  | 4(66%)   | 4(66%)   | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 50-60    | 1321 | 1     | 11 | 3(27%)   | 5(45%)   | 5(45%)   | 5(45%)   | 7(63%)   | 8(72%)   | 8(72%)   | 8(72%)   |
| 61-68    | 888  | 1     | 7  | 3(42%)   | 3(42%)   | 4(57%)   | 4(57%)   | 5(71%)   | 7(100%)  | 7(100%)  | 7(100%)  |
| 69-76    | 839  | 1     | 7  | 4(57%)   | 5(71%)   | 5(71%)   | 5(71%)   | 5(71%)   | 6(85%)   | 6(85%)   | 6(85%)   |
| 71-78    | 855  | 1     | 7  | 4(57%)   | 5(71%)   | 5(71%)   | 5(71%)   | 6(85%)   | 7(100%)  | 7(100%)  | 7(100%)  |
| 77-82    | 461  | 1     |    | 3(60%)   | 3(60%)   | 4(80%)   | 5(100%)  | 5(100%)  | 5(100%)  | 5(100%)  | 5(100%)  |
| 83-91    | 857  | 1     | 8  | 4(50%)   | 5(62%)   | 6(75%)   | 6(75%)   | 6(75%)   | 7(87%)   | 8(100%)  | 8(100%)  |
| 92-99    | 859  | 1     | 7  | 5(71%)   | 5(71%)   | 5(71%)   | 7(100%)  | 7(100%)  | 7(100%)  | 7(100%)  | 7(100%)  |
| 103-119  | 1740 | 1     | 16 | 12(75%)  | 12(75%)  | 16(100%) | 16(100%) | 16(100%) | 16(100%) | 16(100%) | 16(100%) |
| 120-126  | 699  | 1     | 6  | 3(50%)   | 4(66%)   | 5 (83%)  | 6(100%)  | 6(100%)  | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 127-131  | 666  | 1     | 4  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%) |
| 132-137  | 705  | 1     | 5  | 1(20%)   | 2(40%)   | 2(40%)   | 2(40%)   | 3(60%)   | 3(60%)   | 4(80%)   | 4(80%)   |
| 138-144  | 874  | 1     | 6  | 2 (33%)  | 3 (50%)  | 4(66%)   | 5(83%)   | 5(83%)   | 5(83%)   | 5(83%)   | 5(83%)   |
| 141-157  | 1986 | 1     | 15 | 4(26%)   | 4(26%)   | 5(33%)   | 7(46%)   | 7(46%)   | 9(60%)   | 11(73%)  | 11(73%)  |
| 158-166  | 1092 | 1     | 8  | 2(25%)   | 3(37%)   | 4(50%)   | 6(75%)   | 7(87%)   | 8(100%)  | 8(100%)  | 8(100%)  |
| 164-175  | 1241 | 1     | 11 | 9(81%)   | 9(81%)   | 10(90%)  | 10(90%)  | 10(90%)  | 11(100%) | 11(100%) | 11(100%) |
| 167-176  | 986  | 1     | 9  | 7(77%)   | 8(88%)   | 8(88%)   | 8(88%)   | 8(88%)   | 9 (100%) | 9 (100%) | 9 (100%) |

\* **N** indica o número de ligações amida no peptídeo fragmento; **m/z** indica a relação massa/carga do peptídeo fragmento.

## Anexo 5

Deuteração dos peptídeos fragmentos obtidos para a enzima Chiquimato Quinase na presença Ac. Chiquímico-MgCl<sub>2</sub>-ADP

|         | m/z  | Carga | N  | 1 min    | 3 min    | 8 min    | 15 min   | 60 min   | 3 horas   | 8 horas   | total     |
|---------|------|-------|----|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 1-7     | 745  | 1     | 6  | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 8-22    | 1497 | 1     | 14 | 7 (50%)  | 7 (50%)  | 8 (57%)  | 10 (77%) | 12 (85%) | 12 (85%)  | 12 (85%)  | 12 (85%)  |
| 24-26   | 331  | 1     | 2  | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%) | 2 (100%)  | 2 (100%)  | 2 (100%)  |
| 27-30   | 345  | 1     | 3  | 2 (66%)  | 3 (100%) | 3 (100%) | 3 (100%) | 3 (100%) | 3 (100%)  | 3 (100%)  | 3 (100%)  |
| 31-37   | 746  | 1     | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 2 (33%)  | 2 (33%)  | 3 (50%)  | 3 (50%)   | 4 (66%)   | 4 (66%)   |
| 38-48   | 1245 | 1     | 10 | 3 (30%)  | 4 (40%)  | 5 (50%)  | 5 (50%)  | 6 (60%)  | 7 (70%)   | 7 (70%)   | 7 (70%)   |
| 50-57   | 896  | 1     | 7  | 2 (28%)  | 2 (28%)  | 2 (28%)  | 3 (42%)  | 3 (42%)  | 5 (71%)   | 5 (71%)   | 5 (71%)   |
| 51-57   | 825  | 1     | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 2 (33%)  | 3 (50%)  | 4 (66%)   | 4 (66%)   | 4 (66%)   |
| 50-60   | 1321 | 1     | 11 | 3 (27%)  | 3 (27%)  | 3 (27%)  | 3 (27%)  | 4 (36%)  | 4 (36%)   | 4 (36%)   | 4 (36%)   |
| 61-68   | 888  | 1     | 7  | 3 (42%)  | 3 (42%)  | 4 (57%)  | 4 (57%)  | 5 (71%)  | 6 (85%)   | 7 (100%)  | 7 (100%)  |
| 69-76   | 839  | 1     | 7  | 4 (57%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)  | 7 (100%) | 7 (100%) | 7 (100%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  |
| 71-78   | 855  | 1     | 7  | 4 (57%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)  | 5 (71%)  | 6 (85%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  |
| 77-82   | 461  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 1 (20%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)   | 3 (60%)   | 3 (60%)   |
| 83-91   | 857  | 1     | 8  | 1 (12%)  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 3 (37%)  | 3 (37%)  | 4 (50%)   | 4 (50%)   | 4 (50%)   |
| 92-99   | 859  | 1     | 7  | 2 (28%)  | 3 (42%)  | 3 (42%)  | 4 (57%)  | 5 (71%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  | 7 (100%)  |
| 103-119 | 1740 | 1     | 16 | 3 (18%)  | 4 (24%)  | 4 (24%)  | 6 (36%)  | 7 (42%)  | 8 (48%)   | 9 (56%)   | 9 (56%)   |
| 120-126 | 699  | 1     | 6  | 1 (16%)  | 1 (16%)  | 2 (33%)  | 3 (50%)  | 4 (66%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 127-131 | 666  | 1     | 4  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 2 (50%)  | 4 (100%) | 4 (100%) | 4 (100%)  | 4 (100%)  | 4 (100%)  |
| 132-137 | 705  | 1     | 5  | 1 (20%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 2 (40%)  | 3 (60%)  | 3 (60%)   | 4 (80%)   | 4 (80%)   |
| 138-144 | 874  | 1     | 6  | 2 (33%)  | 3 (50%)  | 4 (66%)  | 5 (83%)  | 5 (83%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  | 6 (100%)  |
| 141-157 | 1986 | 1     | 15 | 3 (20%)  | 3 (20%)  | 4 (26%)  | 5 (33%)  | 5 (33%)  | 7 (46%)   | 8 (53%)   | 8 (53%)   |
| 158-166 | 1092 | 1     | 8  | 2 (25%)  | 2 (25%)  | 3 (37%)  | 4 (50%)  | 5 (62%)  | 6 (75%)   | 6 (75%)   | 8 (100%)  |
| 164-175 | 1241 | 1     | 11 | 9 (81%)  | 9 (81%)  | 9 (81%)  | 10 (90%) | 10 (90%) | 11 (100%) | 11 (100%) | 11 (100%) |
| 167-176 | 986  | 1     | 9  | 7 (77%)  | 7 (77%)  | 7 (77%)  | 8 (88%)  | 8 (88%)  | 9 (100%)  | 9 (100%)  | 9 (100%)  |

\* N indica o número de ligações amida no peptídeo fragmento; m/z indica a relação massa/carga do peptídeo fragmento.