

## Determinación del número de grupos sulfidrilo y de enlaces disulfuro mediante espectrometría de masas

Juan José Calvete

Laboratorio de Proteómica Estructural, Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., Jaime Roig 11, 46010 Valencia. Tel.: 96 339 1778; Fax: 96 369 0800; E-mail: jcalvete@ibv.csic.es

### Resumen:

En este artículo se exponen, discuten e ilustran principios generales y sencillos protocolos - basados en espectrometría de masas- para la cuantificación del número de cisteínas y enlaces disulfuro de proteínas monoméricas, homo- y heterodiméricas, y multiméricas.

### Palabras clave:

Cuantificación de cisteína, determinación de grupos sulfidrilo, enlace disulfuro, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas ESI.

### Introducción

Además de su relevancia funcional en proteínas que actúan mediante mecanismos de oxido-reducción (redox), de todos los aminoácidos proteicos, la cisteína es el único utilizado ampliamente durante la evolución para estabilizar la estructura espacial (terciaria o cuaternaria) de proteínas que, por su tamaño y/o secuencia, carecen de un núcleo hidrofóbico estable o de los elementos de estructura secundaria regular (hélice alfa, hojas beta) formadores de enlaces de hidrógeno (Cheek *et al.*, 2006). Por el contrario, los enlaces disulfuro son raros en proteínas termoestables. Los enlaces disulfuro intra- e intermoleculares se forman por oxidación de cisteínas espacialmente cercanas ( $\leq 5\text{\AA}$  entre los S $\gamma$ ) en las estructuras terciaria y cuaternaria, respectivamente.

Se acepta generalmente que el efecto estabilizador de un enlace disulfuro es debido a que su formación reduce los grados de libertad conformacional del estado desplegado, reduciendo así la entropía del estado desplegado (Anfisen y Scheraga, 1975; Thornton, 1981). El aporte energético de un enlace disulfuro a la conformación nativa es de 2.5-3.5 kcal/mol. El gran impacto estructural a bajo coste energético destaca la importancia de la ingeniería de enlaces disulfuro como un mecanismo evolutivo de la diversificación estructural ( y por tanto, funcional) de proteínas

que, como es el caso de muchas toxinas, están sometidas a evolución Darwiniana acelerada (Olivera, 2006; Calvete *et al.*, 2003a; Ménez, 2002). En el caso de serpientes y lagartos ponzoñosos, los venenos se originaron en etapas tempranas de su evolución por reclutamiento, y posterior transformación estructural y funcional, de proteínas ordinarias pertenecientes a un número reducido de familias proteicas (Fry *et al.*, 2006).

Una característica de estas proteínas es su alto contenido en cisteínas, las cuales usualmente se encuentran formando enlaces disulfuro. El número de cisteínas totales, reducidas (grupos sulfidrilo) y oxidadas (formando enlaces disulfuro), es en gran medida específico de cada familia de toxinas (Tabla 1) y tiene, por tanto, un valor taxonómico relevante. En efecto, un serio inconveniente a la hora de caracterizar mediante técnicas proteómicas el conjunto de proteínas presentes en los venenos de serpientes es la total carencia de bases de datos de genomas de reptiles. Una traba añadida es que, a pesar de que la base de datos pública UniProtKB/TrEMBL (v.35.3, 17 de Abril del 2007) (<http://us.expasy.org/sprot/>) contiene 932 secuencias de proteínas de serpientes ("viper") que representan a todas las familias de proteínas encontradas en los venenos, las estructuras primarias de toxinas de una misma familia varían enormemente debido a su diversificación estructural por evolución acelerada, impidiendo -por lo general- una identificación basada en el análisis de la huella

peptídica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se necesita, pues, recurrir a la secuenciación *de novo* mediante MS/MS y a la búsqueda posterior de similitud de secuencia (utilizando BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Sin embargo, el orden de estos dos pasos puede invertirse, para nuestro provecho, si conocemos *a priori* en qué familia proteica englobar a una determinada toxina. Así, en aquellos casos en los que la calidad de los espectros de fragmentación no es suficiente para la secuenciación *de novo* completa de los iones peptídicos, este conocimiento nos permite generar un alineamiento múltiple de todas las proteínas homólogas conocidas que nos sirva entonces bien de guía para extender las secuencias parciales deducidas, bien para realizar un análisis tipo MS-BLAST (Shevchenko *et al.*, 2001) (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>) frente a una base de datos propia, específica y reducida.

## Contando cisteínas y enlaces disulfuro

### A. Proteínas monoméricas

La espectrometría de masas es, sin duda, la técnica idónea, por su sencillez y precisión, para determinar el contenido en cisteínas libres (grupos sulfhidrilo, SH) y enlaces disulfuro (cistinas, S-S) de una proteína. Para ello, la muestra (típicamente una fracción cromatográfica eluída de una columna C18 de fase reversa) se divide en tres alícuotas y éstas se secan mediante centrifugación a vacío (SpeedVac) o liofilización. Las muestras se disuelven en 10 µl de tampón 50 mM HEPES, pH 9.0, conteniendo 5M cloruro de guanidina y 1 mM EDTA, y las proteínas se desnaturalizan a 85 °C durante 15 min. Una de las muestras (A) no será sometida a tratamiento posterior y se utilizará para medir la masa molecular de la proteína nativa ( $M_{NAT}$ ). A la muestra B se le añade un reactivo alquilante (4-vinilpiridina o yodoacetamida) hasta una concentración final de 10 mM y la mezcla se deja a temperatura ambiente (~25 °C) y en la oscuridad durante 1 hora. Esta muestra se utilizará para determinar la presencia de grupos sulfhidrilo reactivos. Por último, la muestra C se reduce con 10 mM 1,4-ditioeritriol (DTE) durante 15 min. a 80 °C, y los grupos sulfhidrilos se bloquean con un reactivo alquilante (4-vinilpiridina o

yodoacetamida)<sup>1</sup> (concentración final de 25 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente y en la oscuridad (Henschen, 1986). A continuación, las proteínas de las muestras A, B y C se purifican utilizando pipetas Zip-Tip C18 (Millipore) previamente activadas con una mezcla de acetonitrilo (ACN) al 70% y TFA al 0.1% y equilibradas en TFA al 0.1%. Tras la adsorción a la matriz C18 (5-6 ciclos de pipeteo), las Zip-Tip se lavan 5-6 veces con 0.1% TFA. Las proteínas libres de reactivos se eluyen con 3-5 µl de 70% ACN/0.1% TFA y sus masa moleculares se determinan mediante nanoESI-MS o MALDI-TOF MS utilizando ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) saturado en 70% ACN/0.1% TFA como matriz.

El número de grupos sulfhidrilo reactivos ( $N_{SH}$ ) se calcula mediante la ecuación I:

$$N_{SH} = (M_{ALK} - M_{NAT})/M_R \quad (\text{ecuación I}),$$

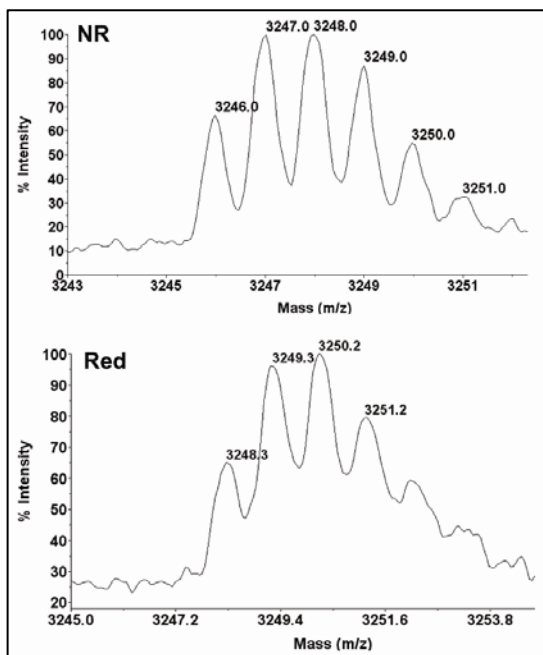
donde  $M_{ALK}$  representa la masa molecular de la proteína desnaturalizada, pero no reducida, incubada en presencia del reactivo alquilante (muestra B);  $M_{NAT}$  es la masa de la proteína nativa (muestra A), y  $M_R$  es el incremento de masa debido a la alquilación de un grupo sulfhidrilo (105.3 Da para S-piridiletilación, si se utilizó 4-vinilpiridina como agente alquilante, y 57.1 Da por carbamidometilación por yodoacetamida).

El número total de cisteínas se determina entonces mediante la ecuación II:

$$N_{Cys} = [(M_{CM} - M_{ALK})/(M_R + 1)] + N_{SH} \quad (\text{ecuación II}),$$

<sup>1</sup> La yodoacetamida y la 4-vinilpiridina, en las concentraciones normalmente empleadas (exceso molar de 5 respecto a la concentración de residuos de cisteína o del reactivo reductor, lo que en la práctica equivale a concentraciones finales de 50-250 mM) son reactivos específicos para grupos sulfhidrilo. La solubilidad de 4-VP en tampones acuosos es muy baja y debe emplearse para alquilar proteínas en presencia de cloruro de guanidino 5-6 M. Hay que tener también en cuenta que la piridiletilación aumenta la hidrofobicidad de las proteínas, por lo que, para las medidas espectrométricas, éstas deben ser manejadas en disoluciones conteniendo solventes orgánicos (ej. 70% acetonitrilo/0.1% TFA, que se emplea para desorber proteínas del material C18 de las pipetas Zip-Tip).

en la que  $M_{CM}$  es la masa de la proteína totalmente reducida y alquilada, y  $(M_R + 1)$  es el incremento de masa debido a la alquilación de un residuo de cisteína que previamente a la reducción formaba parte de un enlace disulfuro (106.3 Da o 58.1 Da, dependiendo de que se utilizara, respectivamente, 4-vinilpiridina o yodoacetamida como agente alquilante). En el caso de péptidos, cuya masa molecular puede ser determinada con precisión isotópica (ej. utilizando el reflectrón de un instrumento de tiempo de vuelo o mediante ionización por electrospray), nominalmente bastaría con reducir la muestra para determinar su contenido en S-S (Fig.1). Sin embargo, dado que la reducción de un enlace disulfuro produce un pequeño incremento de masa (+2 Da/S-S), cuando la exactitud de la medida es  $\leq 2$  Da, se hace necesario amplificar esa diferencia mediante la introducción de un grupo alquilante.



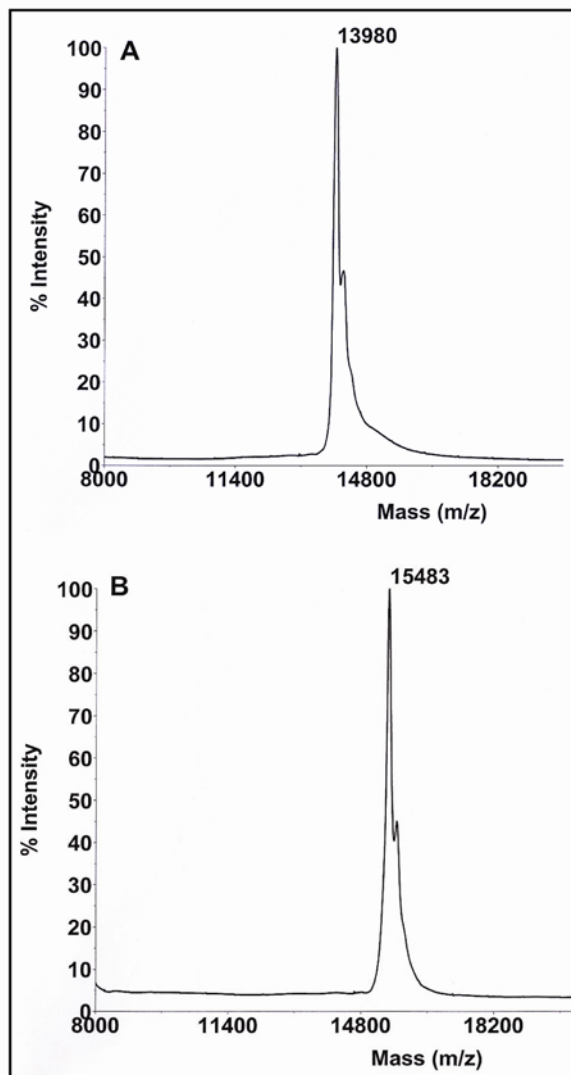
**Figura 1.** Espectros de masas obtenidos en un instrumento de tiempo de vuelo Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo reflector, mostrando la distribución isotópica de los iones. La diferencia de 2 Da entre las masas del péptido nativo (NR) y del reducido (Red) indica la existencia de un S-S intramolecular.

Finalmente, el número de enlaces disulfuro ( $N_{S-S}$ ) puede calcularse mediante la ecuación III:

$$N_{S-S} = (N_{cys} - N_{SH}) / 2 \text{ (ecuación III).}$$

Las unidades de masa en las ecuaciones I-III están expresadas en Daltons (1 Da o unidad de masa atómica unificada (1 u) = 1/12 de la masa del  $C_{12} = 1/N_A$  (gramos), siendo  $N_A$  el número de avogadro ( $1.66053886 \pm 0.00000028$ )  $\times 10^{-24}$  g).

Para ilustrar lo anteriormente expuesto examinemos la Figura 2.



**Figura 2.** Determinación del número de grupos sulfhidrilo y de enlaces disulfuro mediante espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando un espectrómetro Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems). Panel A, espectro de masas de la proteína nativa que resultó ser idéntico al de la proteína desnaturalizada, pero no reducida, y tratada con 4-vinilpiridina. Panel B, Masa molecular de la proteína completamente reducida y S-piridiletilada.

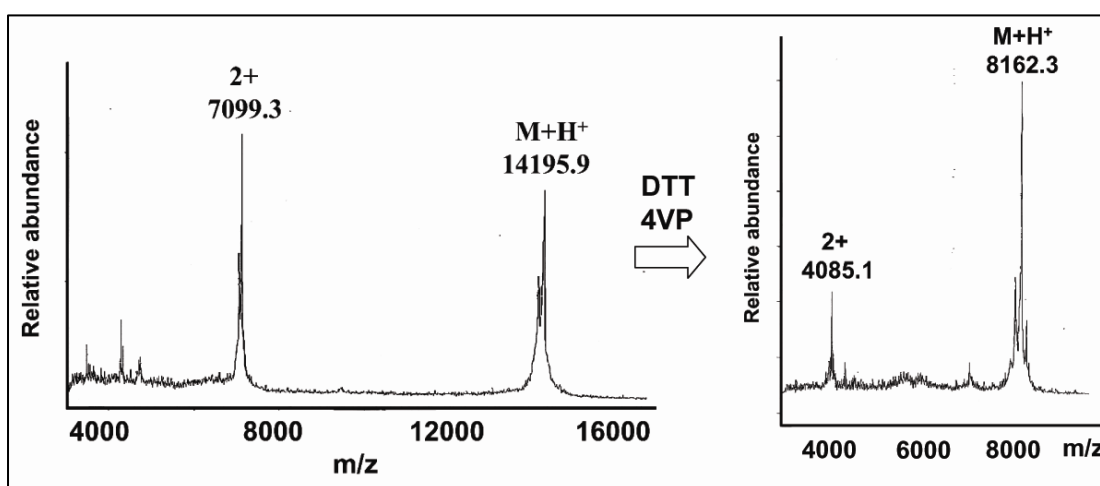
El panel A muestra el espectro de una proteína del veneno de *Sistrurus mliarius barboursi* purificada por HPLC de fase reversa (Juárez *et al.*, 2004). La masa de la proteína no

varió en presencia de 4-vinilpiridina ( $M_{NAT} = M_{ALK} = 13980$  Da), deduciéndose que la proteína no contiene cisteínas libres. Por otra parte, la masa molecular de la proteína reducida y S-piridiletilada ( $M_{CM}$ ) sufrió un incremento de  $15483 - 13980 = 1503$  Da,

indicando que la proteína posee un total de  $1503/106.3 = 14.1$  (14) residuos de cisteína, los cuales, en la proteína nativa, forman 7 enlaces disulfuro. Muy posiblemente se trata de una  $PLA_2$  (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de toxinas de venenos de serpientes de las familias Viperidae (víboras) y Crotalidae (crótalos, serpientes de cascabel) en función de su contenido de cisteínas y enlaces disulfuro. <sup>a</sup>, enlaces disulfuro intermoleculares; <sup>b</sup>, enlaces disulfuro intramoleculares;  $PLA_2$ , fosfolipasa tipo  $A_2$ ; CRISP, proteína rica en cisteínas; SVMP,  $Zn^{2+}$ -metaloprotease de tipo PI de veneno de serpiente; DC, fragmento C-terminal de SVMP de tipo PIII (SVMP-PIII) compuesto por un dominio tipo disintegrina y un dominio rico en cisteínas; svVEGF, factor de crecimiento endotelial de veneno de serpiente; LAO, L-aminoácido oxidasa.

Rango de masa molecular (kDa)	Nº total de:		Familia proteica
	-SH	S-S	
1.6-2	-	1	Péptido natriurético
4-5	-	3	Miotoxina
	-	4	Disintegrin corta
6-8	-	3	Inhibidor tipo Kunitz
	-	5	Subunidad de disintegrina dimérica
	-	6	Disintegrina mediana
10-12	1	-	Ohanina
13-15	-	2	Cistatina
	-	(2 <sup>a</sup> + 4 <sup>b</sup> )	Disintegrina dimérica
	-	7	$PLA_2$
23-33	-	8	CRISP
	1	4	PI-SVMP
	-	6	Proteasa de serina
	-	(1 <sup>a</sup> + 3 <sup>b</sup> )	C-lectin $\alpha\beta$
	-	(1 <sup>a</sup> + 4 <sup>b</sup> )	svVEGF
	-	13	Fragment DC
46-58	-	3	LAO
	1	18	PIII-SVMP

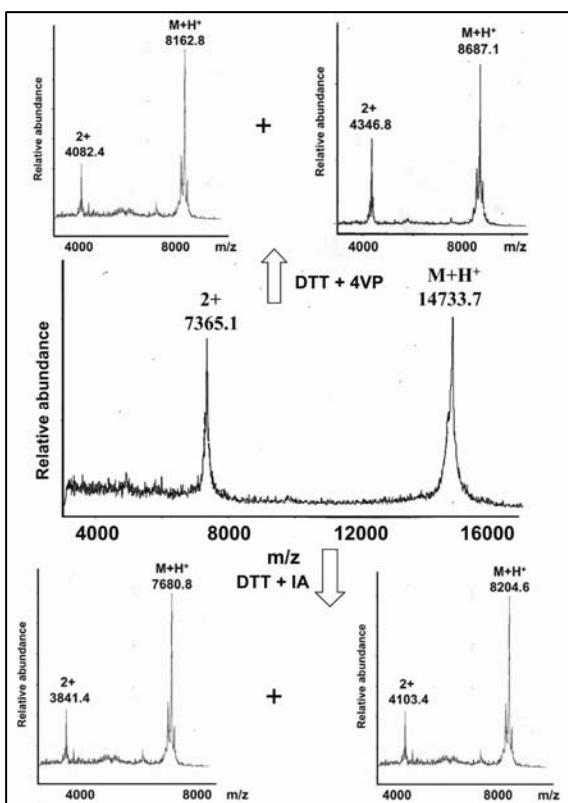


**Figura 3.** Espectros de masa MALDI-TOF (Voyager DE-Pro™, Applied Biosystems) de una proteína homodimérica nativa (izquierda) y de su subunidad (derecha) aislada por RP-HPLC tras reducción de sus S-S y S-piridiletilación de los grupos sulfidrilo formados.

De manera similar, la cuantificación del número total de residuos de cisteína de una proteína heterodimérica (LS) exige reemplazar el término  $M_{CM}$  de la ecuación II por la suma de las masas de las subunidades mayor (L) y menor (S) reducidas y alquiladas ( $M_{CM} L + M_{CM} S$ ):

$$N_{Cys}LS = [((M_{CM} L + M_{CM} S) - M_{ALK}) / (M_R + 1)] + N_{SH} \quad (\text{ecuación V}).$$

La figura 4 muestra los espectros de masas de una proteína de masa molecular  $M_{NAT} = M_{ALK} = 14733.7$  Da (panel central) y de sus subunidades aisladas tras reducción y alquilación con 4-vinilpiridina (4VP, paneles superiores) y con yodoacetamida (IA, paneles inferiores).



**Figura 4.** Espectros de masas MALDI-TOF (adquiridos como en las figuras 1 y 2) de una proteína heterodimérica nativa (panel central) y de sus subunidades S (izquierda) y L (derecha) aisladas mediante HPLC de fase reversa tras reducción de sus S-S y S-piridiletilación (paneles superiores) y carbamidometilación (paneles inferiores) de los grupos sulfidrilo generados.

Resulta evidente que se trata de una proteína heterodimérica y que ninguna de sus subunidades contiene grupos sulfidrilo. Por otra parte, los resultados de alquilación con 4VP o con IA, podemos determinar que el número total

de cisteínas ( $N_{Cys}$ ) del heterodímero LS es:  $[(8687.1 + 8162.8 - 14733.7)/106.3] = 19.9$  y  $[(8204.6 + 7680.8 - 14733.7)/ 58.1] = 19.8$ . Además, combinando los dos conjuntos de datos podemos determinar el número de cisteínas presentes en cada subunidad:

$$N_{Cys}L = (M_{VP}L - M_{IA}L) / (\Delta M_{VP} - \Delta M_{IA}) \quad (\text{ecuación VIa})$$

$$N_{Cys}S = (M_{VP}S - M_{IA}S) / (\Delta M_{VP} - \Delta M_{IA}) \quad (\text{equation VIb}),$$

En las ecuaciones VIa y VIb,  $(M_{VP}L - M_{IA}L)$  y  $(M_{VP}S - M_{IA}S)$  corresponden, respectivamente, a la diferencia entre las masas alquiladas con 4-vinilpiridina y con yodoacetamida de las subunidades mayor y menor, y  $(\Delta M_{VP} - \Delta M_{IA})$  es la diferencia entre el incremento de masa debido a la alquilación de un grupo tiol con 4-vinilpiridina ( $\Delta M_{VP}$ ) o con yodoacetamida ( $\Delta M_{IA}$ ) ( $106.3 - 58.1 = 48.2$ ). Utilizando los datos de la figura 4 se deduce que las subunidades L y S de la proteína de  $M_{NAT} 14733.7$  Da contienen, respectivamente,  $(8687.1 - 8204.6) / (106.3 - 58.1) = 10$  Cys y  $(8162.8 - 7680.8) / (106.3 - 58.1) = 10$  Cys. Debe tratarse, pues, de una disintegrina heterodimérica (Tabla 1).

Es necesario aclarar que, con independencia de los reactivos alquilantes que se utilicen en un experimento de doble marcaje -como el mostrado en la figura 4- las especies de mayor (o menor) masa molecular corresponden a la misma subunidad. Esta relación de proporcionalidad se cumple siempre que i) el número de cisteínas de la subunidad mayor sea igual o mayor que el de la subunidad menor ( $N_{Cys}L \geq N_{Cys}S$ ), o ii) en el caso de que  $N_{Cys}S > N_{Cys}L$ , la diferencia entre las masas moleculares de las subunidades mayor ( $M_{NAT}L$ ) y menor ( $M_{NAT}S$ ) sea superior a la diferencia entre el número de cisteínas de la subunidad menor ( $N_{Cys}S$ ) y el número de cisteínas de la subunidad mayor ( $N_{Cys}L$ ) multiplicada por el incremento de masa debido a la alquilación de un grupo tiol por el agente alquilante que genera mayor aumento de masa ( $M_{RH}$ ). Esta segunda condición puede expresarse de manera general mediante la ecuación VII:

$$(M_L - M_S) > (N_{Cys}S - N_{Cys}L) \times M_{RH} \quad (\text{equation VII}).$$

Aunque, tanto en el caso de proteínas homo- y heterodiméricas, los datos relativos a la cantidad de cisteínas de sus subunidades no permiten asignar el número de enlaces S-S intra- e intermoleculares, si que se puede formular de manera general que si una proteína dimérica no contiene grupos -SH, entonces tanto el número de S-S intracatenarios como el de S-S intermoleculares será par si las subunidades contienen un número par (2n) de cisteínas, e impar (2n-1) si el número de cisteínas de cada subunidad es impar. Nótese que no puede darse el caso de que una subunidad contenga 2nCys y la otra (2n-1) Cys.

### C. Proteínas multiméricas

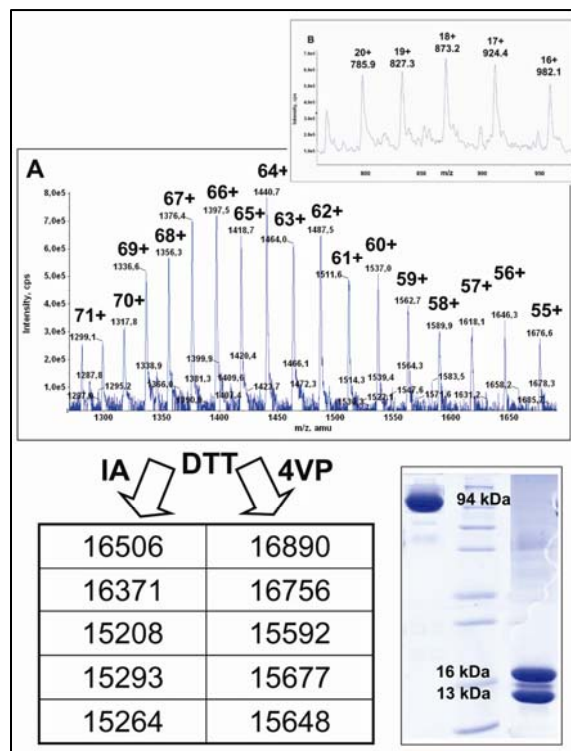
Conceptualmente, los mismos principios que se aplican para la determinación del contenido de sulfidrilos y enlaces disulfuro en proteínas diméricas son válidos para proteínas n-méricas, si bien, lógicamente, hay que modificar las ecuaciones anteriores. Así, el número total de cisteínas de una proteína multimérica ( $N_{Cys\ Mult}$ ) puede determinarse mediante una modificación de las ecuaciones II, IV y V:

$$N_{Cys\ Mult} = [(\sum M_{CM\ Sub}) - M_{ALK}] / (M_R + 1) + N_{SH} \quad (\text{ecuación VIII}),$$

donde  $\sum M_{CM\ Sub}$  es el sumatorio de las masas moleculares de todas las subunidades reducidas y alquiladas.

La figura 5 ilustra el protocolo seguido para establecer la estructura cuaternaria de una proteína multimérica (masas moleculares aparentes por SDS-PAGE:  $M_{NAT}$ , 94 kDa;  $M_{SUB}$ , 13-16 kDa). La masa molecular de la proteína nativa (92151 ± 11 Da) fue determinada mediante ionización por electrospray con un espectrómetro híbrido triple cuadrupolo-trampa iónica lineal (QTrap 2000, Applied Biosystems) (panel A). Mediante la ecuación VIa (o VIb), y partiendo de las masas moleculares determinadas para las subunidades aisladas por HPLC de fase reversa piridiletaladas y carbamidometiladas (tabla), se deduce que cada subunidad contiene un total de 8 cisteínas. Por tanto, las masas moleculares promedio calculadas para las subunidades nativas (con todas las cisteínas formando S-S) ( $M_{NAT\ Sub}$ )

son [ $M_{CM\ Sub} - (8 \times 58.1)$ ]: 16041 Da (SubA), 15906 Da (SubB), 14743 Da (SubC), 14828 Da (SubD) y 14799 Da (SubE). El  $\sum M_{NAT\ Sub\ A-E} = 76317$  Da. La diferencia entre este valor y la masa molecular de la proteína nativa es -15834 Da, indicando que la proteína nativa es hexamérica con una estequiometría cuaternaria  $[A(B)_2CDE]$ .



**Figura 5.** Espectros de masas adquirido mediante ionización por electrospray (ESI) en un espectrómetro QTrap 2000 (Applied Biosystems) de una proteína purificada del veneno de *Bitis nasicornis* (A) y de una de sus subunidades (B). La masa molecular aparente, por SDS-PAGE, de la proteína nativa es 94 kDa y la determinada por ESI-MS es 92151 ± 11 Da. La reducción y alquilación de esta proteína produjo las subunidades listadas en la tabla. El espectro ESI-MS mostrado en el panel B corresponde a la subunidad piridiletalada de 16756 Da.

Este tipo de estructura supramacromolecular es típico de C-lectinas multiméricas formadas por la asociación cíclica de heterodímeros ( $\alpha\beta$ ). Cada dímero contiene 3 S-S intracatenarios, 1 S-S interdímero y se enlaza a otros dos dímeros mediante dos S-S, uno entre las cisteínas N-terminal (Cys1) de la subunidad  $\alpha$  y C-terminal (Cys8) de la subunidad  $\beta$  y otro entre las correspondientes cisteínas C-terminal de la subunidad  $\beta$  y N-terminal de la subunidad  $\alpha$  de dímeros vecinos. La proteína de 92 kDa puede describirse como un trímero de dímeros de

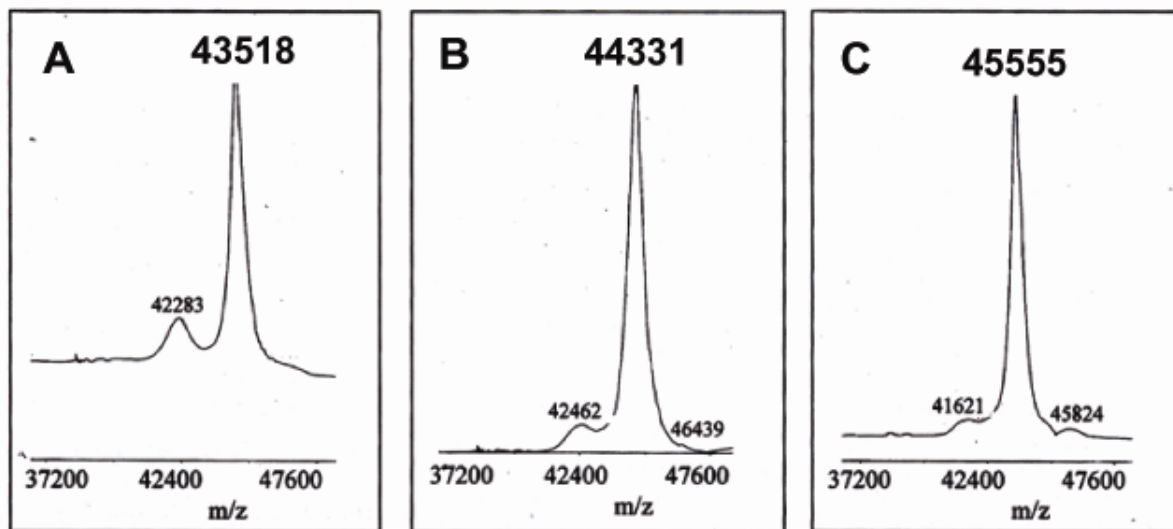


fórmula  $[(\alpha\beta)_2]_3$  o  $[\alpha\text{-SS-}\beta]_1\text{-Cys}_{\text{Cter}}\alpha\text{-Cys}_{\text{Nter}}\beta\text{-}[\alpha\text{-SS-}\beta]_2\text{-Cys}_{\text{Cter}}\alpha\text{-Cys}_{\text{Nter}}\beta\text{-}[\alpha\text{-SS-}\beta]_3\text{-Cys}_{\text{Cter}}\alpha\text{-Cys}_{\text{Nter}}\beta\text{-}[\alpha\text{-SS-}\beta]_1$  (Calvete *et al.*, 2003b). La asociación cabeza-cola de heterodímeros  $\alpha\beta$  es una solución evolutiva sencilla para formar polímeros de complejidad creciente,  $(\alpha\beta)_n$ , que desarrollen nuevas actividades biológicas. Pero esto es harina de otro costal...

**Otras consideraciones**

La metodología descrita ha sido aplicada en nuestro laboratorio esencialmente para caracterizar toxinas de venenos de serpientes e ilustra los conceptos básicos aplicables teóricamente a cualquier otra proteína. La limitación práctica es la precisión con que puedan medirse las masas de las diversas especies moleculares. Ello no sólo depende de las características operativas del espectrómetro de masas sino también de las propiedades fisicoquímicas de la proteína. Además, modificaciones postraduccionales como glicosilación (en particular con azúcares ácidos), sulfatación, fosforilación, etc. suelen producir poblaciones proteicas heterogéneas y afectan a las propiedades iónicas y, por tanto, al

proceso de ionización de las proteínas. La masa molecular de la proteína cuyo espectro de masas se muestra en la figura 5 pudo ser determinada por ESI-MS con una precisión de unas 120 ppm. Sin embargo, la proteína de la figura 6 (MAT, <http://au.expasy.org/uniprot/P13444>,  $M_{av}$  calculada = 43567 Da,  $N_{\text{CYS}} = 10$ ) no pudo ionizarse mediante electronebulización aunque si utilizando MALDI-TOF-MS. En este caso (Fig.6), se aprecia que los picos son más anchos que los iones de la figura 5 y, por tanto, de menor resolución. No obstante, incluso con una resolución nominal 10 veces inferior a ESI-MS (que puede mejorarse hasta  $\sim \pm 200$  ppm si se trabaja con un estándar interno y se optimiza el tiempo de extracción de los iones), un valor teórico de  $44000 \pm 50$  Da permite determinar con precisión suficiente la incorporación de un grupo piridiletil (alquilación de un solo grupo sulfhidrilo), dado que un incremento de masa de 105.3 es 2.1 veces el error medio. Queda clara, pues, la importancia de amplificar lo más posible la diferencia de masa entre las especies  $M_{\text{NAT}}$ ,  $M_{\text{ALK}}$  y  $M_{\text{CM}}$  utilizando reactivos alquilantes que generen un incremento de masa ( $M_R$ ) mayor que el error experimental de la medida. Aunque los reactivos alquilantes más comunmente utilizados son yodoacetamida ( $M_R = 57.1$ ) y 4-vinilpiridina ( $M_R = 105.3$ ), la variedad de reactivos específicos de grupos



**Figura 6.** Espectros de masas de la proteína MAT nativa (A), MAT tratada con 4-vinilpiridina en condiciones desnaturalizantes pero no reductoras (B) y MAT reducida y piridiletilada (C) adquiridos mediante MALDI en un espectrómetro Voyager DE-Pro™ (Applied Biosystems) en modo lineal y con 200 nseg de extracción retardada (DE, delayed extraction) de iones. La masa molecular promedio,  $M_{av}$ , de MAT fue 49 Da inferior a la  $M_{av}$  calculada (43567 Da). No obstante, dado que este error afecta, en principio, por igual a las medidas siguientes efectuadas con la misma calibración, el cálculo de  $N_{\text{SH}} = (44331-43518)/106.3 = 7.6$ ,  $N_{\text{CYS}} = (44555 - 43518)/106.3 = 9.75$ , y  $N_{\text{SS}} = (9.75-7.6)/2 = 1.07$  indicó claramente que 2 de las 10 cisteínas de la molécula estaban formando un enlace disulfuro y las restantes 8 estaban reducidas (Pérez-Sánchez *et al.* 2003).

tioles es grande, en particular los conjugados a fluoróforos diseñados para estudios de Biología Celular. Un ejemplo interesante es la eosina-5'-yodoacetamida. Este reactivo hidrosoluble (Molecular Probes, Invitrogen: <http://probes.invitrogen.com/media/msds/30450.html>) produce proteínas fluorescentes y genera un  $M_R = 830.8$ . Resulta, por tanto, muy sencillo investigar como paso previo a la cuantificación de  $N_{SH}$ , por SDS-PAGE tras el tratamiento con el fluoróforo, si una proteína contiene o no grupos

sulfhidro reactivos. También los reactivos biotinilados específicos para grupos tioles (ej. *N*-(biotinoyl)-*N'*-(iodoacetyl) ethylene diamine,  $M_R = 454.3$ , Molecular Probes, Invitrogen) representan alternativas útiles tanto para aislar, por cromatografía de afinidad utilizando streptavidina inmovilizada, proteínas que contengan grupos -SH, como para cuantificar cisteínas reducidas.

## Bibliografía

- Anfinsen CB, Scheraga HA. 1975. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Advances in Protein Chemistry* 29: 205-300.
- Calvete JJ, Moreno-Murciano MP, Theakston RDG, Kisiel DG *et al.* 2003a. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochemical Journal* 372: 725-734.
- Calvete JJ, Moreno-Murciano MP, Marcinkiewicz C. 2003b. Venenos de serpientes. Diversificación estructural de proteínas ancestrales. *Investigación y Ciencia* Abril 2003: 33-35.
- Cheek S, Krishna S, Grishin NV. 2006. Structural classification of small, disulphide-rich protein domains. *Journal of Molecular Biology* 359: 215-237.
- Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ *et al.* 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*, 439: 584-588.
- Henschen A. 1986. Analysis of cyst(e)ine residues, disulfide bridges, and sulfhydryl groups in proteins. *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis* (Wittmann-Liebold *et al.*, eds.), Springer Verlag, Berlin, pp.244-255.
- Juárez P, Sanz L, Calvete JJ. 2004. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. *Proteomics* 4: 327-338.
- Ménez A (Ed.). 2002. *Perspectives in Molecular Toxinology*, John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK.
- Olivera BM. 2006. Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *Journal of Biological Chemistry* 281: 31173-31177.
- Sánchez-Pérez G, Gasset M, Calvete JJ, Majares MA. 2003. Role of an intrasubunit disulfide in the association state of the cytosolic homooligomer methionine adenosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 278: 7285-7293.
- Shevchenko A, Sunyaev S, Lobodo A, Shevchenko A *et al.* 2001. Charting the proteomes of organisms with insequenced genomes by MALDI-Quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Analytical Chemistry* 73: 1917-1926.
- Thornton JM. 1981. Disulphide bridges in globular proteins. *Journal of Molecular Biology* 151: 261-287.