



# Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular

## **Estrutura Oligomérica e Dinâmica de *Major Royal Jelly Protein 1* (MRJP1)/Apisimina Analisadas por Espectrometria de Massas e Técnicas Complementares**

**Samuel Coelho Mandacaru**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

**Brasília**  
**Fevereiro de 2017**

*"Um homem precisa viajar. Por sua conta,  
não por meio de histórias, imagens, livros ou TV.  
Precisa viajar por si, com seus olhos e pés,  
para entender o que é seu.*

*Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor.*

*Conhecer o frio para conhecer o calor.*

*E o oposto.*

*Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto.*

*Um homem precisa viajar para lugares*

*que não conhece para quebrar essa*

*arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos,*

*e não simplesmente como é ou pode ser;*

*que nos faz professores e doutores do que não vimos,*

*quando deveríamos ser alunos,*

*e simplesmente ir ver."*

***Amyr Klink, Mar sem fim.***

## **Dedicatória**

*Dedico esta tese a todos que se interessarem pelo assunto. A vocês, façam bom proveito.*

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Marcelo Valle de Sousa que me deu a oportunidade, apoio e suporte para todo trabalho além de deixar-me conduzi-lo de forma bastante independente.

Aos professores Carlos André Ornelas Ricart e Luis Henrique Ferreira do Vale, também sempre presentes nas discussões deste trabalho.

A todos os membros do LBQP (Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas).

I would like also to thank Professor Lars Konermann and his group. During one year working in his laboratory I learned much more than science but also how to be someone better. I could see how important is to work as team, and how it help us to be always bigger and better. An specially thanks to Siavash Vahidi. This good friend showed me how to be strong no matter what happens and his lessons were essential for the success of this thesis. **NOBODY CAN MAKE SCIENCE ALONE.**

Gostaria de agradecer a todo o grupo do Laboratório de Biofísica Molecular. Lá encontrei grandes companheiros (as) e que me proporcionaram excelentes discussões científicas.

Gostaria de agradecer à minha fiel companheira de todos os momentos, Maira de Paula. Sem seu apoio não faço ideia como seria tudo isso.

Ao amor dos meus pais. A estes não existem palavras para descrever meu sentimento.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida, bem como ao CNPq, FAPDF e FINEP por apoios diversos ao LBQP.



# SUMÁRIO

<b>ESCOPO DA TESE</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>SIGLAS E ABREVIATURA</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>3</b>
1.1. ABELHAS, GELEIA REAL E A MRJP1 .....	3
1.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	7
1.2.1. Electrospray Ionization .....	8
1.2.2. Analisadores de massas .....	10
1.2.3. Analisadores de massas quadrupolo .....	11
1.2.4. Analisadores de massas – TOF .....	12
1.2.5. Analisadores de massas – Orbitrap .....	13
1.2.6. Espectrometria de massas estrutural .....	14
1.3. TROCA DO HIDROGÊNIO PELO DEUTÉRIO ASSOCIADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	16
1.3.1. EX1 e EX2 .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>23</b>
<b>4. CAPÍTULO 1</b> (Caracterizações estruturais preliminares de MRJP1 e seus carboidratos) .....	<b>24</b>
1. INTRODUÇÃO .....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
1.1. Purificação de MRJP1 por cromatografia .....	24
1.2. Eletroforese desnaturante em poliacrilamida e transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose .....	25
1.3. Coloração de carboidratos de MRJP1 .....	25
1.4. Coloração com nitrato de prata .....	26
1.5. Eletroforese bidimensional (2DE) .....	26
1.6. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	27
1.7. Preparo de amostras para espectrometria de massas para identificação de glicopeptídeos .....	27
1.8. Enriquecimento de glicopeptídeos por ZIC-HILIC .....	28

1.9.	LC-MS/MS e análises de dados .....	28
1.10.	Microscopia de força atômica .....	29
2.	RESULTADOS .....	29
1.1.	Caracterização de sequência primária por espectrometria de massas e mapeamento de sítios de glicosilação .....	32
1.2.	Caracterizações iniciais de MRJP1 por microscopia de força atômica .....	35
2.	DISCUSSÃO .....	36
3.	CONCLUSÃO .....	39
5.	<b>CAPÍTULO 2</b> (Characterizing the Structure and Oligomerization of Major Royal Jelly Protein (MRJP1)/Apisimin by mass Spectrometry and Complementary Biophysical Tool) .....	40
6.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	59
7.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61

## Escopo da tese

Esta tese está organizada da seguinte forma: **Introdução, Objetivos, Capítulos 1 e 2, Considerações Finais e Perspectivas e Referências**. A **Introdução geral da tese** apresenta uma revisão teórica sobre o objeto de estudo desta tese, a proteína *Major Royal Jelly Protein* (MRJP1) bem como sobre princípios básicos da espectrometria de massas e sobre a técnica de *hydrogen deuterium exchange mass spectrometry* (HDX-MS). Os **Objetivos** são compreendidos entre o geral e os específicos. O capítulo 1, **Caracterizações Bioquímicas Preliminares de MRJP1**, apresenta experimentos bioquímicos preliminares que nortearam todo o resto desta tese. O capítulo 2, **Characterizing the Structure, Dynamics and Oligomerization of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1)/Apisimin by Mass Spectrometry and Complementary Biophysical Tools**, contém o conteúdo do trabalho publicado na revista *Biochemistry* da editora *American Society of Chemistry* (ACS) desenvolvido em uma colaboração internacional entre o Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília (UnB), o Department of Chemistry, The University of Western Ontario, London, Canada e o Proteomics Center of Excellence, Departments of Chemistry and Molecular Biosciences, Northwestern University, Evanston, Illinois, EUA. **Considerações Finais e Perspectivas** resume os principais achados da tese bem como os novos caminhos e desafios no entendimento da estrutura e função de MRJP1. **Referências** lista somente os trabalhos à parte do manuscrito publicado.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

FIGURA 1. Larvas de abelhas em alvéolos com geleia real .....	3
FIGURA 2. Representação tridimensional do cérebro de abelhas.....	4
FIGURA 3. Comparação do tamanho do corpo de moscas .....	7
FIGURA 4. Representação esquemática de uma fonte ESI operando no modo positivo... 9	
FIGURA 5. Ionização por eletrospray em proteínas.....	10
FIGURE 6. Representação esquemática de um quadrupolo e como este funciona .....	11
FIGURA 7. Desenho esquemático de um TOF ortogonal .....	13
FIGURA 8. Representação esquemática de um analisador orbitrap.....	13
FIGURA 9. Esquema de fragmentação de peptídeo .....	15
FIGURA 10. Onda viajando em um separador IMS .....	16
FIGURA 11. Representação esquemática da troca do Deutério pelo Hidrogênio .....	17
FIGURA 12. A dinâmica do equilíbrio de proteínas .....	19
FIGURA 13. Desenho esquemático demonstrando os regimes EX1 e EX2.....	20
FIGURA 14. Protocolo geral para um experimento básico de HDX.....	21

### CAPÍTULO 1

FIGURE 1. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1 .....	30
FIGURE 2. SDS-PAGE de MRJP1 glicosilada e deglicosilada.....	30
FIGURA 3. Coloração de carboidratos .....	31
FIGURA 4. 2-DE da fração 6 separada em FPLC de troca aniônica.....	32
FIGURA 5. Fluxograma da estratégia de identificação de glicosítios.....	33
FIGURA 6. Cobertura de sequência da MRJP1 identificada por PSM .....	35
FIGURA 7. Modificações pós traducionais utilizando PEAKS™ .....	35
FIGURA 8. Microscopia de força atômica .....	36

### CAPÍTULO 2

FIGURE 1. Native ESI mass spectrum of MRJP1/apisimin complex .....	43
FIGURE 2. BN-PAGE analyses of protein-protein interactions .....	44
FIGURE 3. Spectroscopy experiments .....	45
FIGURE 4. Deuteration kinetics measured for various representative segments for the four types of MRJP1 samples .....	46
FIGURE 5. Deuteration levels measured for MRJP1 peptides after 1 minute of HDX... 47	
FIGURE 6. Measured isotope distributions of MRJP1 segment 276-287 after	

deuteration for 10 seconds (a-d), and 100 minutes (e-h) .....	47
<b>FIGURE 7.</b> Kyte-Doolittle hydrophathy analyses of (a) MRJP1 and (b) apisimin.....	48
<b>Figure 8.</b> Cartoon representation of MRJP1/apisimin complexes .....	48
<b>Supporting Figure S1.</b> MRJP1 peptic peptides generated during the HDX-MS workflow .....	52
<b>Supporting Figure S2.</b> MRJP1 peptides identified after tryptic digestion, using the cDNA derived published protein sequence. <sup>(1)</sup> The sequence coverage is 64% .....	53
<b>Supporting Figure S3.</b> Native ESI mass spectrum of MRJP1/apisimin (A+G+) acquired under gentle source conditions.....	54
<b>Supporting Figure S4.</b> Complete summary of the HDX kinetics measured.....	55-56
<b>Supporting Figure S5.</b> Examples of bimodal (EX1) MRJP1 isotope distributions after 10 s (top panels) and 100 minutes (bottom panels) of deuteration. ....	57

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1. Glicopeptídeos N-ligados encontrados em MRJP1. Deamidações que se encontram no sítio consenso e não foram identificados na amostra controle.....</b>	<b>33</b>
---	-----------

## SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta G$  – variação de energia livre de Gibbs

$\Delta H_m$  – variação de entalpia

$\Delta S_m$  – variação de entropia

*Pd* – polidispersividade

10-2-HDA – ácido 10-hidroxi 2-decenoico

2DE – eletroforese bidimensional

BN-PAGE – *blue native PAGE*

CBB – *coomassie brilliant blue*

CID – *collision induced dissociation*

DLS – *dynamic light scattering*

DTT – ditioneitol

EDTA - ethylenediamine tetraacetic acid

ETD – *electron transfer dissociation*

FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*®

GR – geleia real

HCD - *high collision dissociation*

HDX – *hydrogen deuterium exchange*

$K_{eq}$  – constante de equilíbrio

LTQ - *linear trap quadropole*

MALDI – *matrix assisted laser desorption ionization*

MRJP – *major royal jelly protein*

MS – *mass spectrometry*

MS/MS – *mass spectrometry in tandem*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

N-terminal – amino-terminal

PBS – tampão fosfato salino

*pI* – ponto isoelétrico

PSM – *peptide spectrum match*

rpm – rotações por minuto

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate - *polyacrylamide gel electrophoresis*

TBS-T – tampão salino de tris com *Tween*

TEAB - tetraethylammonium bromide

TEMED - tetramethylethylenediamine

TFA – *trifluoroacetic acid*

TOF – *time of flight*



## Resumo

Geleia Real (GR) dispara o desenvolvimento de larvas de abelhas fêmeas até rainhas. Este efeito tem sido atribuído à presença de *Major Royal Jelly Protein 1* (MRJP1) presente na geleia real. MRJP1 isolada de GR está intimamente associada a apisimina, um peptídeo helicoidal com 54 resíduos de aminoácidos que promove uma associação não covalente de MRJP1 em oligômeros de diferentes tamanhos. Não existem dados de alta resolução disponíveis para essas estruturas e até mesmo sua estequiometria ainda não é clara. Nesta tese, examinamos a relação MRJP1/apisimina usando um arsenal de técnicas biofísicas. Também, investigamos o comportamento de MRJP1/apisimina em amostras após remoção de seus carboidratos e de apisimina associada. Nossos dados de espectrometria de massas (MS) nativos demonstraram que os complexos existem predominantemente numa estequiometria de MRJP1<sub>4</sub>/apisimina<sub>4</sub>. Blue native PAGE demonstrou a prevalência de estruturas tetraméricas e monoméricas. Microscopia de força atômica demonstrou a presença de populações que puderam ser agrupadas em dois grandes grupos. Troca do hidrogênio por deutério (HDX) seguida de análises por espectrometria de massas revelaram que MRJP1, nesses complexos, é desordenada na extensão dos resíduos 20-265. Estruturas secundárias (provavelmente folhas beta antiparalelas) estáveis são encontradas marginalmente ao redor dos resíduos 266-432. Estas são regiões fracamente estruturadas com conformações que variam entre estruturada e desestruturada, gerando uma distribuição isotópica bimodal (EX1). Nós propomos que os complexos nativos (tetrâmeros) têm uma estrutura quaternária formada por “dímero de dímero”, onde as cadeias de MRJP1 são ligadas por apisimina. Especificamente, nossos dados sugerem que apisimina age como um ligante que forma contatos hidrofóbicos envolvendo o segmento <sup>316</sup>VLFFGLV<sup>322</sup> de MRJP1. Esta proteína tem dois sítios de glicosilação localizados nos resíduos de aminoácidos 144 e 177. Por 2DE podemos ver 9 proteoformas de MRJP1, mesmo após a remoção dos carboidratos. Deglicosilação produz grandes agregados solúveis, enfatizando o papel dos glicanos como inibidores de agregação. Amostras com apisimina parcialmente removida formam complexos diméricos com estequiometria (MRJP1<sub>2</sub>/apisimina<sub>1</sub>). As informações produzidas neste trabalho podem contribuir para uma melhor compreensão da relação estrutura/função de MRJP1, que possui papéis únicos na biologia da abelha.

**Palavras chave:** *abelhas, complexos proteicos, troca de hidrogênio/deutério, interação hidrofóbica, modelo estrutural.*

## Abstract

Royal jelly (RJ) triggers the development of female honeybee larvae into queens. This effect has been attributed to the presence of major royal jelly protein 1 (MRJP1) in RJ. MRJP1 isolated from royal jelly is tightly associated with apisimin, a 54-residue  $\alpha$ -helical peptide that promotes the noncovalent assembly of MRJP1 into multimers. No high resolution structural data are available for these complexes, and their binding stoichiometry remains uncertain. We examined MRJP1/apisimin using a range of biophysical techniques. In addition, we investigated the behavior of deglycosylated samples, as well as samples with reduced apisimin content. Our mass spectrometry (MS) data demonstrated that the native complexes predominantly exist in a (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) stoichiometry. Blue native and showed the prevalence of tetrameric and monomeric structures in native conditions. Atomic force microscopy also showed two populations. Hydrogen/deuterium exchange (HDX) MS revealed that MRJP1 within these complexes is extensively disordered in the range of the residues 20-265. Marginally stable secondary structure (likely antiparallel  $\beta$ -sheet) exists around residues 266-432. These weakly structured regions interchange with conformations that are extensively unfolded, giving rise to bimodal (EX1) isotope distributions. We propose that the native complexes have a “dimer of dimers” quaternary structure in which MRJP1 chains are bridged by apisimin. Specifically, our data suggest that apisimin acts as a linker that forms hydrophobic contacts involving the MRJP1 segment <sup>316</sup>VLFFGLV<sup>322</sup>. MRJP1 has 2 glycosites located at amino acids 144 and 177. By using 2-DE, we observed 9 MRJP1 proteoforms, even after carbohydrate removal. Deglycosylation produces large soluble aggregates, highlighting the role of glycans as aggregation inhibitors. Samples with reduced apisimin content form dimeric complexes with a (MRJP1<sub>2</sub> apisimin<sub>1</sub>) stoichiometry. Therefore, the information uncovered in this work should help pave the way towards a better understanding of the structure/function relationship for MRJP1, which possesses unique roles in the honey bee biology.

**Keywords:** *honeybee; protein complex; hydrogen/deuterium exchange; hydrophobic interaction; structural model.*

---

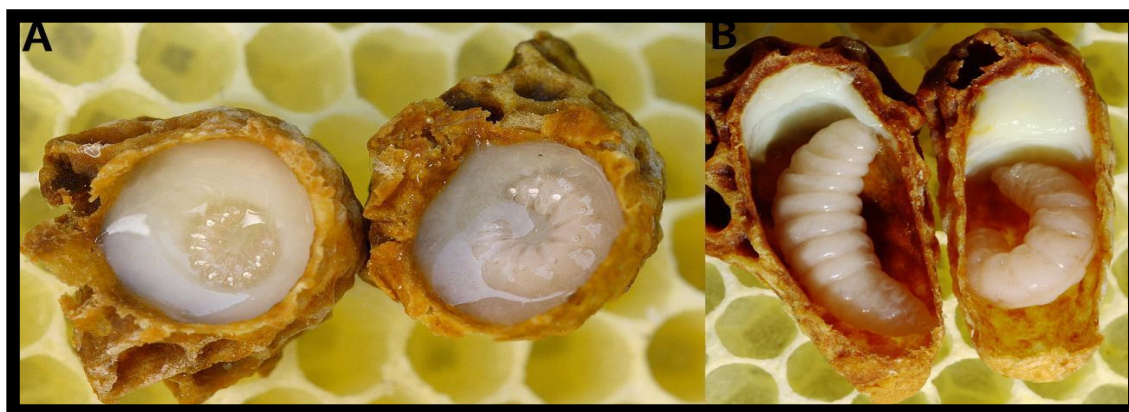
# 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

## 1.1. ABELHAS, GELÉIA REAL E A PROTEÍNA MRJP1

Um dos mais típicos casos de plasticidade fenotípica ocorre em abelhas *Apis mellifera*, onde a larva que se tornará a rainha é alimentada com grandes quantidades de geleia real (GR) (**Figura 1**), enquanto as forrageiras e nutridoras são alimentadas com uma mistura de secreções glandulares, pólen e mel durante seus dois últimos estágios de desenvolvimento. Essa diferença na alimentação dispara estímulos envolvidos no desenvolvimento endógeno acarretando diferenças morfológicas acentuadas entre a rainha e as demais abelhas [1, 2], sendo assim um interessante modelo de estudo de desenvolvimento ontogenético.

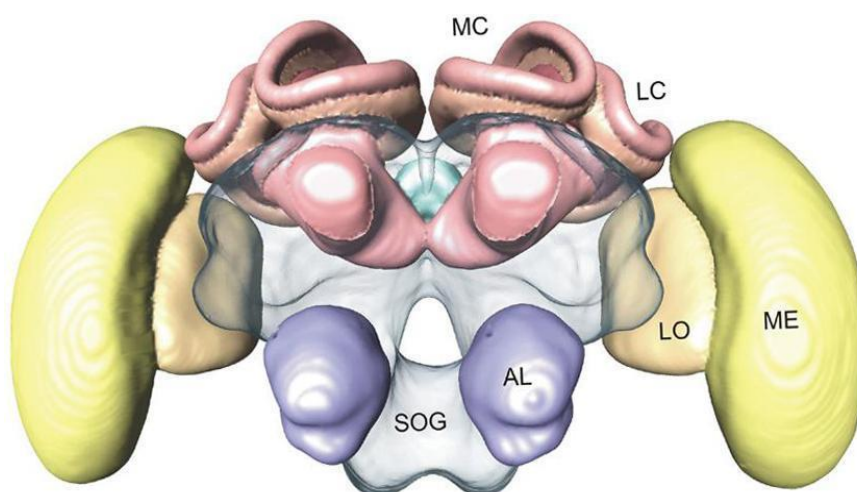
A geleia real é uma secreção produzida no sistema glandular cefálico (glândulas hipofaríngeas, mandibulares e pós-cerebrais) da abelha e é o alimento de suas larvas [3-5]. A glândula hipofaríngea é um órgão tuberoso longo conectado a vários ácinos (glândulas secretórias) compostos de cerca de 12 células secretórias [6]. Na (**Figura 2**) podemos observar a estrutural básica do cérebro das abelhas. A síntese das principais proteínas da GR pela glândula hipofaríngea é dependente também da idade e do papel social da operária [7]. A geleia real é composta principalmente por água (60–70%), proteínas (12–15%), carboidratos (10–12%), lipídeos (3–7%), sais minerais e vitaminas [8], e também ácidos nucleicos [9], apresentando pH entre 3,5 e 4,5 [8].



**Figura 1.** Larvas de abelhas em alvéolos com geleia real. Dois alvéolos de rainha foram abertos para mostrar as larvas designadas a rainhas flutuando em geleia real (A). Larvas de rainhas alguns dias mais velhas com geleia real no topo do alvéolo (B). Figura disponível em [en.wikipedia.org/wiki/royal\\_jelly](http://en.wikipedia.org/wiki/royal_jelly) (acesso: outubro/2014).

Diversos efeitos biológicos têm sido relacionado à GR como antibiótico [10],

imunomodulatório [11, 12], inibitório de auto-imunidade em camundongos [13], indutor de expressão de TNF- $\alpha$  por queratinócitos humanos [14], estimulador de proliferação celular [15], protetor de células hepáticas de camundongo [16], anti-inflamatório [17], antialérgico [18], antitumoral [19, 20], inibitório de angiogênese induzida [21], cicatrizante [22], supressivo de desenvolvimento de lesões cutâneas [23], indutor de produção de colágeno por fibroblastos [24], cicatrizador de úlceras nos pés [25], estimulador de resistência à insulina [26], supressor de níveis de lipídeos totais séricos e colesterol [27], hipocolesterolêmico [28], estimulador de metabolismo de lipoproteínas [29], estimulador de atividade estrogênica [30], anti-hipertensivo [31], antifadiga [32], antioxidante [33-35], estimulador de crescimento de células gliais de camundongos [36], indutivo de diferenciação de células neurais de rato [37], facilitador de restauração da habilidade cognitiva [38], compensatório ao declínio de funções da hipófise dependentes da idade [39], entre outros. Isso demonstra a versatilidade desse material biológico e a importância de se conhecer melhor a sua biologia.



**Figura 2.** Representação tridimensional do cérebro de abelhas. A medula ótica (ME) e o lóbulo (LO) estão apresentados em amarelo, o lobo antenal (AL) em lilás e o par de corpos cogumelares em rosa, com os cálices laterais (LC) e mediais (MC). Em azul claro está o lobo protocerebral. Em cinza, encontra-se o gânglio subesofágico (SOG). Figura extraída de Menzel e colaboradores [47].

Os estudos de proteômica de abelha têm apenas poucos anos, com o primeiro artigo publicado em 2005 [40] sobre a composição do veneno de *Apis mellifera*. Outros artigos na mesma data avaliaram o pólen e geleia real [41] e as glândulas hipofaríngeas.

Nosso grupo tem realizado análises proteômicas de *Apis mellifera* já há alguns anos. Em 2008, o grupo publicou um artigo pioneiro mostrando modificações no perfil proteômico cerebral relacionadas a ontogenia e comportamento desses animais [42]. Interessantemente, neste trabalho, os proteomas cerebrais de abelhas nutridoras e operárias foram comparados

por eletroforese bidimensional a fim de encontrar proteínas relacionadas ao desenvolvimento ontogenético e comportamental. Vinte proteínas diferencialmente expressas foram detectadas e identificadas por espectrometria de massas. No cérebro de abelhas nutridoras, as expressões das proteínas MRJPs (*major royal jelly proteins*) MRJP1, MRJP2 e MRJP7 foram aumentadas. É sabido que estas proteínas podem estar relacionadas na diferenciação de castas. Além disso, este mesmo trabalho mostrou que a proteína MRJP1 está presente em células cerebrais ao longo de filamentos do citoesqueleto em células dos lobos antenais e corpos cogumelares. MRJP1 também foi encontrada em espaços intercelulares de células dos corpos cogumelares, indicando que esta é uma proteína secretada. Outras proteínas envolvidas em sínteses e funções putativas no sistema olfatório foram encontradas super expressas em cérebros de nutridoras. Já em abelhas operárias, as proteínas diferencialmente super expressas estavam relacionadas especialmente à produção de energia, ligação ao ferro e metabolismo de neurotransmissores [42].

Pouco mais tarde, este mesmo grupo utilizou abordagem baseada em LC-MS/MS e realizou análises proteômicas em larga escala. Neste caso, 2.742 proteínas de amostras de cérebro de forrageiras e nutridoras foram identificadas sendo que 17 % do total das proteínas encontradas foram diferencialmente abundantes entre as castas citadas [43]. Imunomarcagem do cérebro e da glândula hipofaríngea revelou expressão diferencial de MRJPs em várias regiões cerebrais e em diferentes castas e sub-castas de abelhas. A identificação e localização destas MRJPs contribuem para a elucidação dos papéis biológicos de esta família de proteínas no cérebro de abelhas [44].

As MRJPs (*major royal jelly proteins*) são as proteínas mais abundantes na GR. Atualmente existem nove MRJPs identificadas na geleia real [45], das quais MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 e MRJP5 compõem cerca de 82% do total de proteínas da secreção [46]. Os genes codificantes das MRJPs são exclusivos de *Apis* [45]. Tais proteínas têm massa molecular entre 49 e 87 kDa [46, 47].

Embora as MRJPs sejam estruturalmente relacionadas, os perfis de suas expressões são distintos. O mRNA de MRJP1 é presente em altas quantidades na glândula hipofaríngea de nutridoras e forrageiras, enquanto MRJP2, MRJP3 e MRJP4 são sintetizadas predominantemente nas glândulas hipofaríngeas de nutridoras [7]. Além disso, o nível de expressão de MRJP4 na glândula hipofaríngea é muito menor comparado aos de outras MRJPs [7]. Recentemente, foi demonstrado que a MRJP2 é expressa no cérebro de forrageiras [48].

A divisão de trabalho dependente da idade (alteração de função), fenômeno chamado

idade polietismo [49], tem sido observado nesses animais. Mudanças no perfil de expressão dependentes da idade em glândulas hipofaríngeas, bem como a correlação entre os títulos do hormônio juvenil (HJ) na hemolínfa, também foram observados [50, 51], sugerindo que o hormônio juvenil pode estar envolvido na reprogramação das funções da glândula hipofaríngea [6]. Estes fatos sugerem que a expressão dos genes de MRJPs é precisamente regulado para ser altamente tecido-específico e tempo-restrito [52].

Essa família de proteínas apresenta alguma homologia de sequência com a família de *yellow proteins*. Tais proteínas *yellow* são expressas em alguns insetos [53-55] e em bactéria [56], mas foram descritas inicialmente em *Drosophila melanogaster* [57]. Na mosca da fruta, “yellow” está associada à polimerização de precursores de melanina em estruturas cuticulares [58]. Essa proteína controla a pigmentação da cutícula em adultos e partes da boca de larvas [46]. “Yellow” também é requerida para a morfologia e locomoção normais de larvas e adultos [59], assim como para o comportamento de acasalamento normal do inseto [60]. Algumas MRJPs apresentam uma região repetitiva na extremidade C-terminal com propriedade hidrofílica, composta principalmente por aminoácidos polares, o que não é verificado nas sequências de proteínas “yellow” [46, 47]. Porém, dois genes codificantes para proteínas “yellow-like” foram também encontrados no genoma de *A. mellifera* [61]. Muito provavelmente um gene ancestral comum deu origem aos genes *yellow* e *mrjp*, considerando seu alto grau de homologia [45, 61]. Nenhuma outra proteína relacionada a MRJPs foi descrita ainda para outras espécies de metazoários.

MRJPs são sintetizadas com um peptídeo sinal N-terminal consistindo de 16-20 resíduos e são, portanto, destinadas à secreção. A maioria das MRJPs são ricas em aminoácidos essenciais para abelhas (Arg, His, Ile, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val) [62], e algumas têm um alto teor de nitrogênio que serve como estoque para funções biológicas [45].

A principal proteína da GR, a MRJP1, foi evidenciada inicialmente em 1992 e representa 31% das proteínas da secreção e 48% dentre as hidrossolúveis [41, 63]. Essa proteína é codificada por um único gene em uma cadeia polipeptídica única [45]. Apresentando uma mobilidade relativa entre 55 e 57 kDa em gel, a MRJP1 é composta por 432 aminoácidos [6, 48], sendo a região N-terminal (19 resíduos) um peptídeo sinal [45]. Uma pequena diferença de migração em gel foi encontrada entre a MRJP1 isolada de GR e de glândula hipofaríngea, com 57 e 55 kDa, respectivamente.

Deglicosilada com N-glicosidase F, a MRJP1 apresentou 47–48 kDa em SDS-PAGE [6]; sendo que a massa molecular suposta para a sequência primária dessa proteína é de 47,1 kDa, sem o peptídeo sinal. Portanto, a diferença de massas da MRJP1 deve-se, muito

provavelmente, às cadeias de oligossacarídeos presentes na proteína nativa. Na GR, a MRJP1 está presente na forma de monômero, oligômero e interagindo com ácidos graxos (10-2-HDA), formando agregados insolúveis [64].

Foi sugerido que o monômero de MRJP1 ou royactina (*royalactin - royal jelly-derived protein*), definido em [65] não possuía somente um efeito nutricional, sendo, na verdade, o principal fator ativo da GR responsável pela diferenciação de larvas à rainha. Royalactina induziu a diminuição do tempo de desenvolvimento paralelamente a aumento no tamanho da massa corporal na fase adulta e tamanho do ovário da rainha. Curiosamente, o monômero de MRJP1 também induziu mudanças fisiológicas e morfológicas em *Drosophila* fêmea (**Figura 3**), lembrando o fenótipo de abelhas rainhas, também por um mecanismo semelhante ao de abelhas [65]. Esse mesmo autor utilizou a técnica de RNA de interferência, nocauteou o gene responsável pela expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em *Apis mellifera* e observou os tamanhos do corpo e do ovário menores que no grupo controle. Também foi constatado um maior tempo de desenvolvimento até a fase adulta, sugerindo que o EGFR age como mediador da royalactina na diferenciação de castas. Além disso, ainda descobriu que a royalactina induz uma longevidade prolongada em *Drosophila* via EGFR, indicando que essa proteína deve ser também responsável por longevidade prolongada em abelhas rainhas [65].



**Figura 3.** Comparação do tamanho do corpo de moscas sem (à esquerda) e com suplementação de royalactina (à direita) [65].

## 1.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma ferramenta indispensável em ciências proteômicas. Proteômica é um sistema para análises de proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em um dado tempo [66, 67]. Embora o termo proteômica se relaciona ao uso de



qualquer tecnologia que procura interrogar um largo número de proteínas, atualmente este termo é usado para se referir a trabalhos onde a plataforma central é a espectrometria de massas (MS). A estratégia proteômica mais comumente usada para a identificação de proteínas é denominada *shotgun* [68, 69]. Aqui, uma mistura complexa de proteínas é digerida a peptídeos por uma protease, geralmente tripsina, com clivagens no C-terminal de lisinas e argininas. Subsequentemente, os peptídeos são separados por cromatografia em fase reversa e analisadas por espectrômetros como os *quadrupole/time-of-flight* (Q-TOF), *ion trap* (IT), *orbitrap* (OT) [70, 71].

Além da identificação de proteínas, a espectrometria de massas pode ser utilizada para extrair informações quantitativas das amostras. A quantificação de proteínas pode ser absoluta, se forem adicionadas quantidades conhecidas de um análogo pesado do analito de interesse, antes da análise num espectrômetro de massas, ou relativo, se forem comparadas amostras em diferentes estados [72, 73]. As estratégias mais populares para a quantificação relativa são *label free*, marcação metabólica e marcação química.

Finalmente, a espectrometria de massas também é uma ferramenta extremamente útil para determinar características de estrutura e dinâmica de proteínas (REF), como ocorreu nesta tese.

Duas técnicas de ionização são usadas em espectrometria de massas, as quais permitem a transferência de analitos peptídicos ou proteicos para fase gasosa sob suaves condições. São elas *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI-MS) e *electrospray ionization* (ESI) [74]. Essas técnicas de ionização permitem a investigação de componentes que podem variar de poucos Daltons (Da) a mega Daltons (MDa) [75, 76]. Em MALDI, os analitos são embebidos em uma matriz e, com a ajuda de um pulso de laser, são ionizados e transferidos para fase gasosa [77]. Como o ESI é predominantemente usado neste trabalho, seu mecanismo será discutido com maior riqueza de detalhes na próxima sessão.

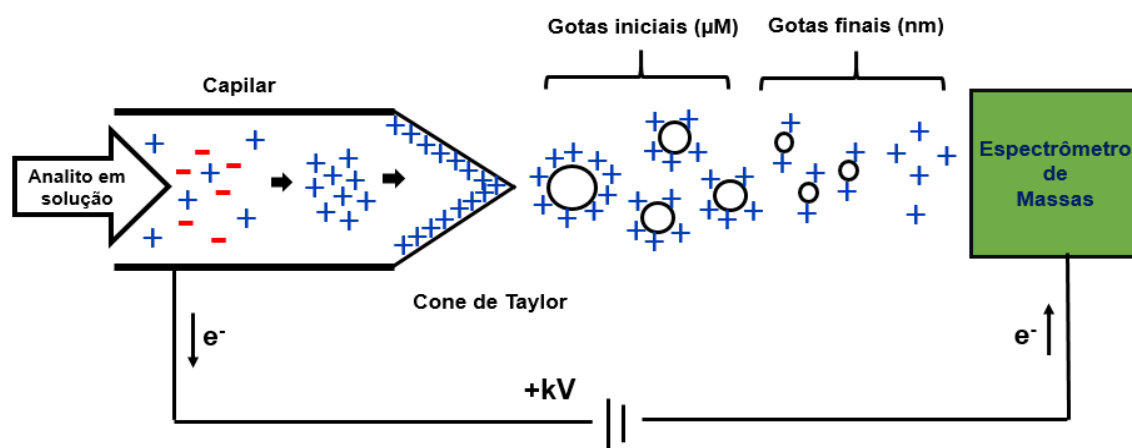
### **1.2.1. Eletrospray Ionization**

ESI é uma técnica suave capaz de ionizar e transferir proteínas e peptídeos em solução para fase gasosa. ESI tem várias vantagens em relação a MALDI. ESI pode ser acoplado a cromatografia líquida (LC), a qual possibilita separações *on-line*, além de gerar íons com múltiplas cargas, ao contrário de MALDI que gera íons com cargas únicas.

Na ionização por *eletrospray*, os analitos são dissolvidos em um solvente adequado e injetado no espectrômetro de massas através de um capilar estreito de metal [78]. Após a injeção, a solução encontra-se eletricamente neutra; no entanto, o capilar está conectado a



uma fonte de alta tensão. Esta alta voltagem causa remoção de elétrons da solução (por exemplo pela oxidação do solvente:  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$ ), fazendo com que haja acúmulo de cargas positivas na ponta do capilar [79]. Essas cargas positivas causam distorção do líquido na saída do capilar para dentro de um cone de Taylor [80], o qual emite uma fina névoa de gotículas carregadas para a fase gasosa (**Figura 4**). As microgotas são aceleradas por um gradiente de potencial elétrico entre o capilar e o cone. As gotas iniciais sofrem rápida evaporação, aumentando a densidade de cargas com o encolhimento das gotículas a ponto que sua tensão superficial é igual à repulsão de Coulomb [81]. A desfavorável repulsão eletrostática que as cargas sofrem força as gotas a se dividirem em partes cada vez menores, até que as cargas do solvente se depositem sobre a proteína ou peptídeo [75, 82].

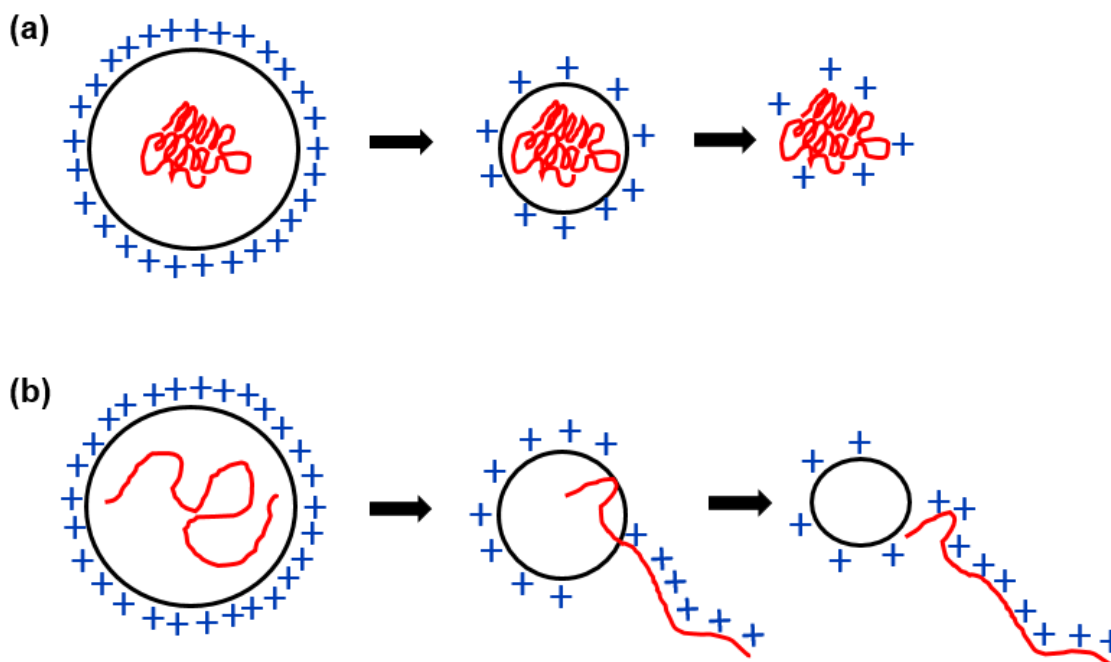


**Figura 4. Representação esquemática de uma fonte ESI operando no modo positivo.** A voltagem aplicada causa separação das cargas e um acúmulo de cargas negativas. O cone de Taylor formado no final do capilar ejeta uma fina névoa de cargas. A constante evaporação e fissão das gotas criam novas gotas prole.

O mecanismo de ESI é amplamente investigado, e três cenários tem sido colocados para explicar como íons são formados: CRM (*Charge Residue Model*), CEM (*Chain Ejection Model*) e IEM (*Ion Evaporation Model*), [83-85]. O modelo CRM (**Figura 5A**) é aplicado a proteínas em seu estado nativo enquanto o modelo CEM (**Figura 5B**) tem sido proposto para explicar como proteínas desnaturadas sofrem ESI [85, 86]. Após a formação da gota carregada, a cadeia polipeptídica da proteína desnaturada rapidamente sai da gota enquanto parte das cargas da superfície da gota são transferidas para a proteína em ejeção. Esta rápida ejeção é facilitada pela repulsão eletrostática das cargas, sendo estas distribuídas à cadeia emergente e permanecendo em sua superfície (**Figura 5B**).

A transferência de carga foi observada primeiramente usando dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*) de proteínas oligoméricas, onde a proteína

desnaturada obtinha uma quantidade assimétrica de cargas em relação ao resto das subunidades [87]. Em última análise, tanto CRM quanto CEM tentam explicar as diferenças na distribuição de cargas observadas nas análises por espectrometria de massas. Um terceiro mecanismo, o mecanismo de evaporação de íons (IEM), é também usado para descrever ionização na fase de gás, porém apenas para pequenas moléculas [79, 88].



**Figura 5. Ionização por eletrospray em proteínas.** A) No CRM observa-se a transferência de cargas para uma proteína globular na fase de gás. B) CEM descreve o modelo de ejeção de proteínas desdobradas, adquirindo mais cargas do que no modelo CRM.

### 1.2.2. Analisadores de massa

Um analisador de massa é usado para separar íons carregados baseados em seus valores  $m/z$ . O estado de carga de um íon multiplamente carregado é dado por:

$$m/z = \frac{[M + zH]}{z}$$

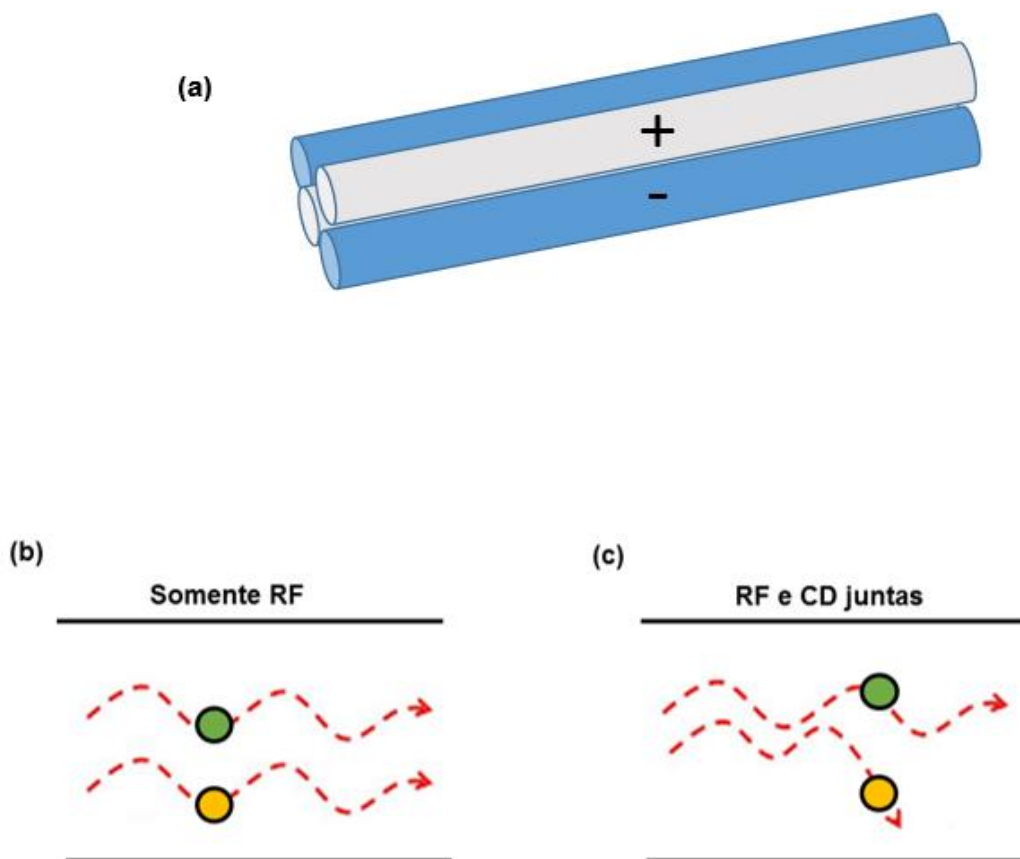
(Eq. 1)

onde  $m$  é a massa,  $z$  é a carga e  $H$  é o hidrogênio (1.007 Da). A separação dos íons pode ser alcançada ao usar um campo elétrico e/ou magnético [89, 90]. Diferentes analisadores de massas incluem quadropolos, tempo de voo, armadilha de íons linear [91], orbitrap [92-94] e FTICR (*fourier transform ion cyclotron resonance*) [95]. Alguns destes analisadores de

massas podem ser acoplados em conjunto para aplicações em espectrometria de massas *in tandem*. Somente o quadrupolo, TOF e o orbitrap serão discutidos na próxima sessão por serem diretamente relevantes aos experimentos deste trabalho.

### 1.2.3. Analisadores de massas quadrupolos

O analisador de massas mais comum encontrado em espectrômetros de massas é o quadrupolo (**Figura 6A**).



**Figura 6. Representação esquemática de um quadrupolo e seu funcionamento.** A) Representação esquemática de um analisador de massas quadrupolo. B) Somente com corrente de rádio frequência (RF) aplicada, todos os íons (círculos verde e amarelo) podem passar através do quadrupolo até o detector. C) Ao aplicar uma corrente direta (CD), somente íons com  $m/z$  específicos serão selecionados, todos os demais colidirão contra os bastões do quadrupolo.

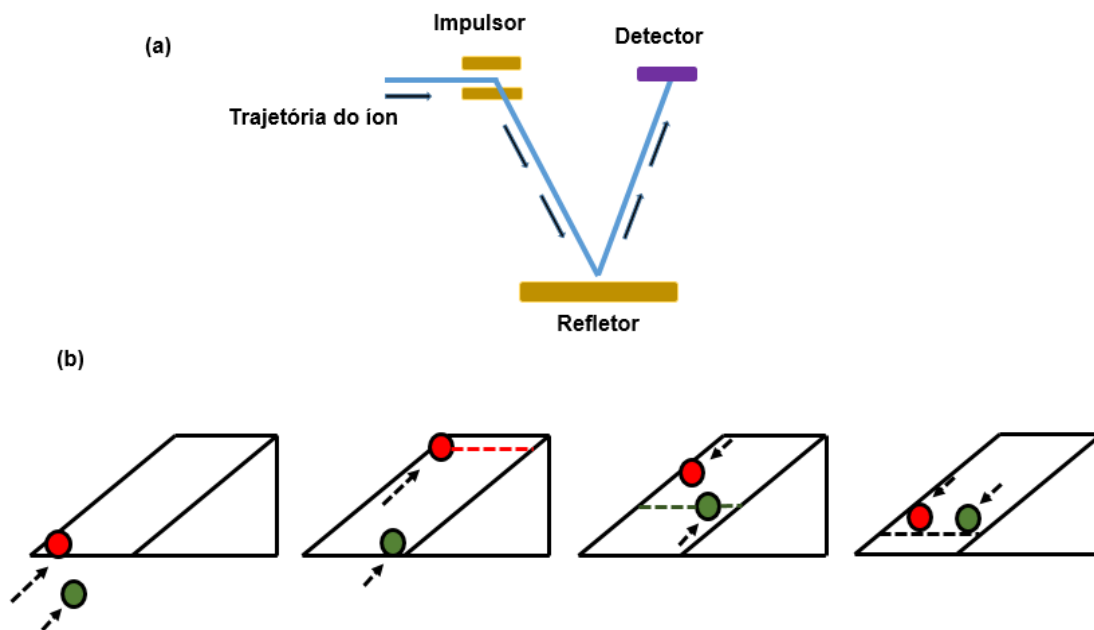
Espectrômetros de massas com apenas um quadrupolo foram muito usados para estudar proteínas e peptídeos no passado. No entanto, eles são limitados pelo pequeno alcance do  $m/z$  especialmente quando usados como único analisador [83, 88, 96, 97]. Um quadrupolo possui dois pares de bastões de metal cilíndrico carregados positivamente e negativamente. Estes metais são alinhados para que os pares de polos iguais estejam um de frente ao outro. Durante um experimento, uma corrente RF (rádio frequência) é aplicada ao quadrupolo, mas

a inclusão de uma corrente contínua (DC) pode ser utilizada para estreitar uma faixa  $m/z$  observável. Quando aplicada apenas a corrente RF, todos os íons carregados passarão através do quadrupolo (**Figura 6B**); no entanto, o  $m/z$  pode ser estreitado ao impor uma corrente DC (**Figura 6C**) junto à voltagem RF. Somente íons com  $m/z$  específico alcançarão o detector para uma dada razão da RF/DC; em contrapartida, todos os demais íons colidirão com os bastões devido à suas trajetórias instáveis [98].

#### **1.2.4. Analisador de massas por tempo de voo – TOF (Time-of-Flight)**

Os analisadores do tipo TOF geralmente cobrem uma maior faixa de  $m/z$  do que os quadrupolos. Um instrumento desse tipo mede o tempo que um dado íon leva até alcançar um detector (tempo de voo). Quando um íon é acelerado pela voltagem,  $U$ , a energia potencial,  $E_p$ , é convertida em energia cinética.

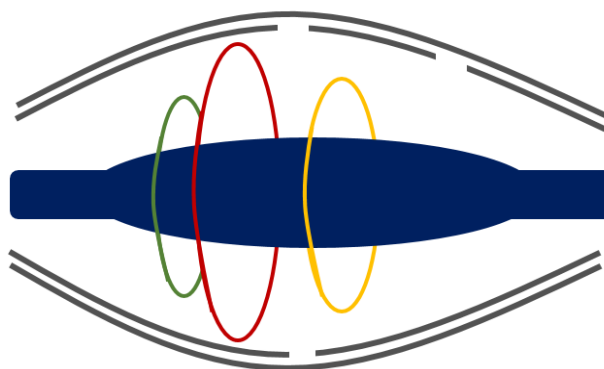
Os íons acelerados viajam em uma região livre e no vácuo em direção ao detector. O tempo levado pelo íon até o detector é função do seu  $m/z$ . Versões ortogonais do tradicional TOF linear têm se tornado padrão [99]. Pequenos desvios na velocidade de íons com  $m/z$  idênticos são observados, resultando em diferentes tempos de voo e diminuindo a resolução. Para mitigar esse problema, a maioria dos TOFs usam refletores, um conjunto de anéis empilhados com um potencial aplicado. Ao entrar no tubo TOF, os íons são impulsionados perpendicularmente numa queda de potencial em direção a um espelho refletor (**Figura 7A**). Mesmo se dois íons tenham a mesma razão  $m/z$ , suas velocidades podem se diferenciar ligeiramente. Portanto, o íon que viaja a uma maior velocidade penetrará mais profundamente em direção ao refletor aumentando assim seu tempo em direção ao detector (**Figura 7A e B**). O íon mais lento penetrará no refletor mais tardiamente, mas a reflexão gastará menos tempo na mudança da trajetória do íon. Assim, com este mecanismo de correção da velocidade os dois íons com mesmo  $m/z$  alcançarão o detector ao mesmo tempo. A correção feita pela reflexão pode ser descrita como duas bolas com massas similares rolando rampa acima em diferentes velocidades [100, 101], de acordo com a **figura 7B**.



**Figura 7. Desenho esquemático de um TOF ortogonal.** A) Os íons são impulsionados em direção ao refletor. Esta reflexão também corrige desvios na trajetória. B) A bola vermelha move-se mais rápido e atinge um ponto mais alto na rampa, demonstrado pela linha pontilhada vermelha, enquanto que a bola verde se move mais lentamente e atinge a rampa por último, mas não percorre até a linha pontilhada vermelha. O tempo de atraso é corrigido e, finalmente, as duas bolas saem da rampa ao mesmo tempo.

### 1.2.5. Analisador de massas - Orbitrap

O orbitrap (**Figura 8**) é um dos mais recentes analisadores dentre um conjunto de ferramentas aplicadas na identificação, caracterização e quantificação de componentes em sistemas biológicos [93]. Como o nome sugere, orbitrap é um *ion trap*. Não há uma rádio frequência nem um ímã para reter os íons. Ao invés disso, os íons em movimento são aprisionados em um campo eletrostático [92, 102].



**Figura 8. Representação esquemática de um analisador orbitrap.** Em verde, vermelho e amarelo estão representados íons orbitando um orbitrap.

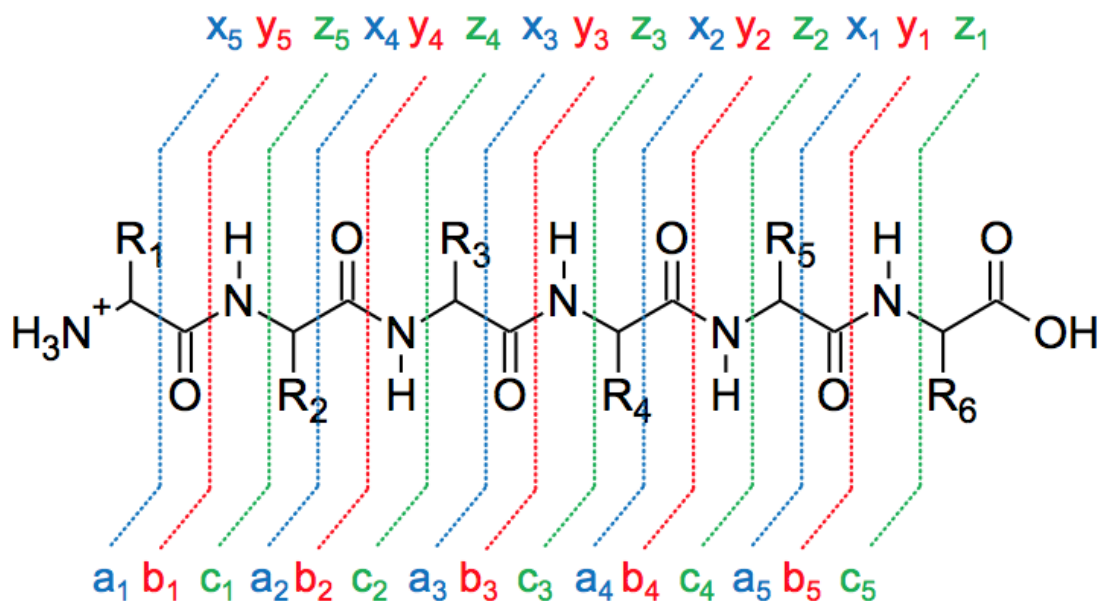
A atração eletrostática em direção ao eletrodo central é compensada pela força centrífuga que surge a partir da velocidade tangencial dos íons, semelhante a um satélite em

órbita. O campo eletrostático experimentado pelos íons faz com que esses se movam em padrões espirais complexos. O componente axial destas oscilações é dependente da energia inicial, ângulos e posições, e pode ser detectado como uma corrente de imagem nas duas metades de um eletrodo, encapsulando o orbitrap (**Figura 8**). A transformada de Fourier é usada para obter a frequência de oscilações de íons com diferentes massas, resultando em uma acurada leitura do  $m/z$  dos analitos [93].

### 1.2.6. Espectrometria de massas estrutural

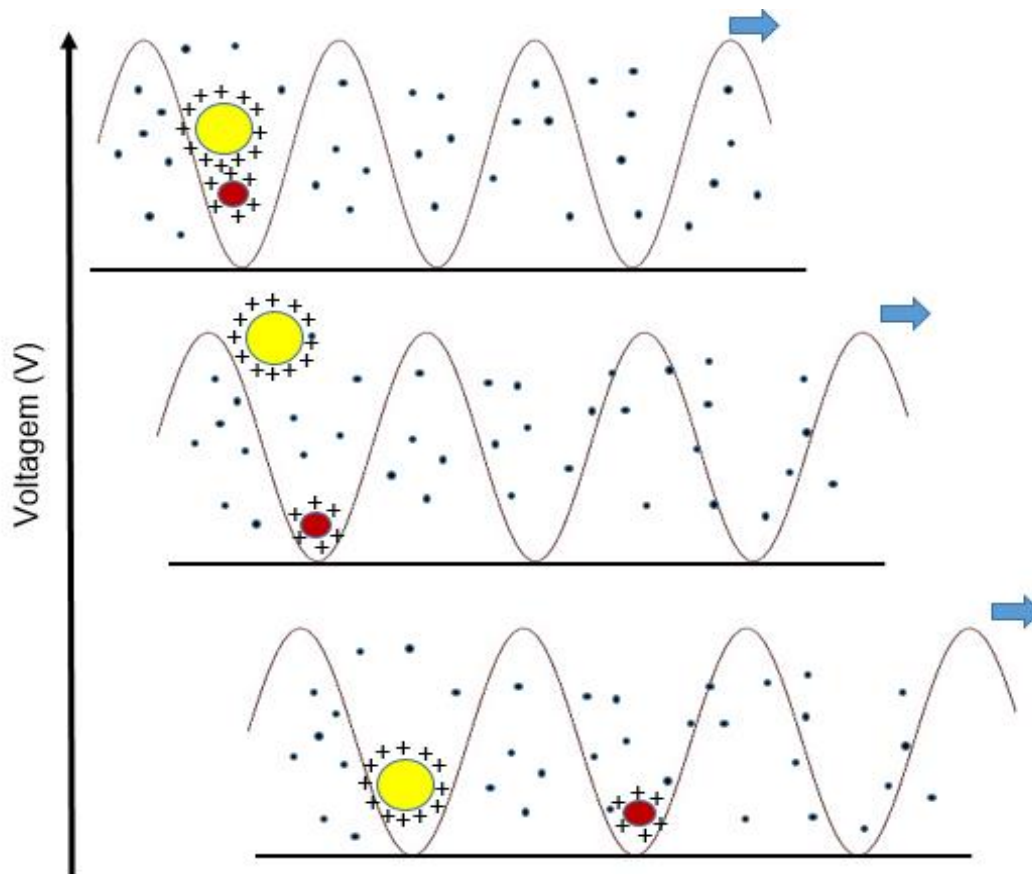
A espectrometria de massas tem se tornado especialmente útil no estudo de estruturas de proteínas. Muitas das técnicas empregam a estratégia *bottom-up*, pela qual é possível obter informações estruturais ao examinar pequenos fragmentos de proteínas. CID (*collision induced dissociation*), HCD (*higher energy collisional dissociation*) e espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS) são usados para sequenciar proteínas após digestão proteolítica seguida de identificação dos peptídeos gerados. Em MS/MS, peptídeos são induzidos a colidir com gás residual fragmentando-os em íons ainda menores, os quais podem fornecer informações da sequência de aminoácidos do analito [103]. Fragmentações pode ser induzida também por ECD (*electron capture dissociation*) ou ETD (*electron transfer dissociation*). Em ECD, elétrons livres são transferidos ao peptídeo [104-106], enquanto ETD emprega radicais aniônicos para disparar a fragmentação [107-109].

A fragmentação de peptídeos em um espectrômetro de massas é um fenômeno que ocorre em fase gasosa e tem sido extensivamente discutida na literatura. No entanto, o mecanismo pelo qual esses fragmentos são formados ainda não está esclarecido [110, 111]. Fragmentos oriundos de CID são formados da quebra da ligação entre o nitrogênio da amida e o carbono carbonílico na sequência da proteína (**Figura 9**). Se a carga permanecer no segmento C-terminal recém-formado, este é chamado de *b*-íon; e se permanecer no recém-formado N-terminal, é denotado como um *y*-íon (**Figura 9**). Fragmentação usando ECD/ETD ocorre com a quebra entre o nitrogênio da amida e o carbono alfa, produzindo *c*-íons (carga no C-terminal) e *z*-íons (carga no N-terminal) [105, 112, 113]. As identificações destes fragmentos de peptídeos podem ser especialmente úteis quando uma protease não específica é utilizada para digestão [114, 115].



**Figura 9. Esquema de fragmentação de peptídeo.** CID induz fragmentação de íons *b/y* entre o nitrogênio da amida e o carbono carbonil (vermelho) enquanto ECD/ETD induz fragmentação de íons *c/z* entre a amida do nitrogênio e o carbono alfa (verde). A presença de fragmentação de íons *a/x* é rara e ocorre entre o carbono alfa e o carbono carbonil (azul).

Estruturas de proteínas também podem ser estudadas em fase gasosa usando IMS (*ion mobility spectrometry*) e, subsequentemente, comparadas com suas estruturas em solução [116]. Em experimentos usando IMS, os íons são empurrados através de uma região que contém um gás inerte em um campo elétrico fraco (**Figura 10**). Os íons são acelerados a uma taxa proporcional à carga, mas experimentam uma força oposta gerada pelo gás que preenche a célula. Como resultado, os íons moverão através da célula IMS a uma taxa proporcional à sua carga, mas inversamente proporcional ao seu CCS (*collisional cross section*),  $\Omega$ . Proteínas na forma nativa, enoveladas, possuem um menor valor de  $\Omega$  e se movem através da célula IMS rapidamente. Contrariamente, as proteínas desnaturadas movem-se mais lentamente por terem um valor de  $\Omega$  maior [116].

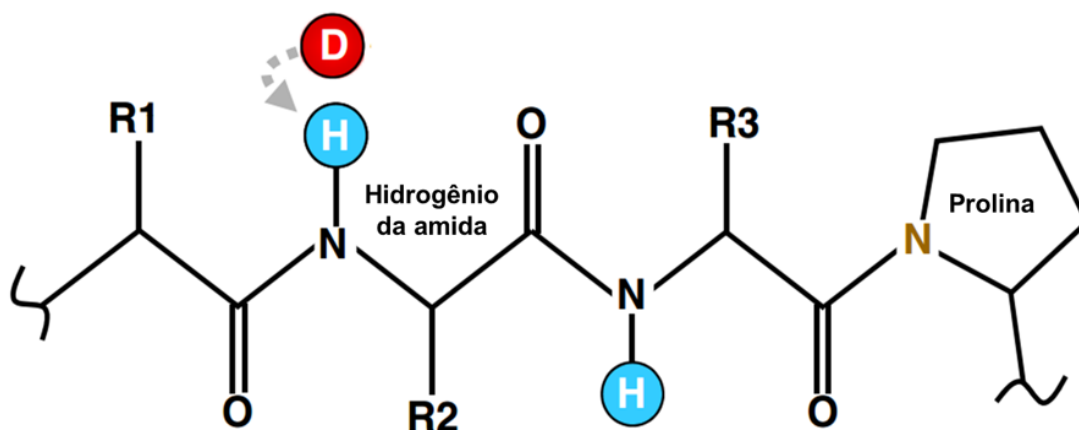


**Figura 10. Onda viajando em um separador IMS.** Uma onda é formada pela combinação de RF e uma transiente voltagem DC. Espécies de íons com maior mobilidade viajarão mais rapidamente. Íons que possuem baixa mobilidade são impedidos de ser acelerados devido a colisões com o gás e deslizam atrás das ondas.

### 1.3. TROCA DO HIDROGÊNIO POR DEUTÉRIO ASSOCIADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

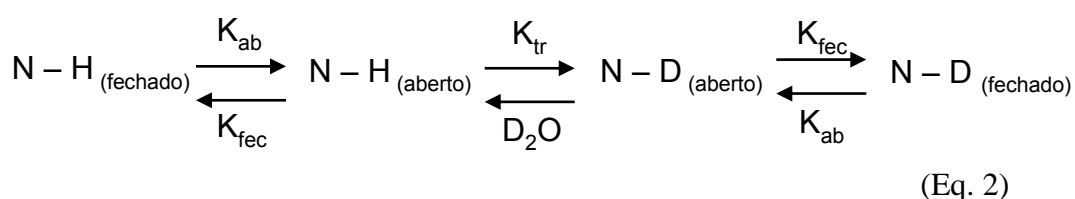
Troca de hidrogênio por deutério, *hydrogen deuterium exchange* (HDX), é uma poderosa ferramenta para estudar estrutura e dinâmica de proteínas [117]. HDX acoplado com ESI-MS é também muito utilizado no estudo de interações proteína-proteína e proteína-ligantes em solução [118-121]. Em HDX, a proteína é exposta ao solvente contendo D<sub>2</sub>O ou uma proteína completamente deuterada é exposta a H<sub>2</sub>O. Regiões da proteína que não estão envolvidas em pontes de hidrogênio têm uma rápida cinética de troca, enquanto que regiões que estão no interior da proteína ou envolvidas em pontes de hidrogênio têm uma cinética de troca muito mais lenta [122]. Dependendo da acessibilidade do solvente e da força de ligação do hidrogênio, diferentes hidrogênios de amidas na cadeia polipeptídica (N-H) podem diferir nas taxas de trocas isotópicas (**Figura 11**) [123]. A troca também pode acontecer nos sítios O-H, N-H e S-H das cadeias laterais; no entanto, esses





**Figura 11. Representação esquemática da troca do Deutério pelo Hidrogênio.** Aminoácidos representados pertencentes à uma única sequência polipeptídica.

deutérios são perdidos durante a cromatografia líquida (LC), em um processo chamado *back-exchange*. Assim, as cadeias laterais não contribuem nas medidas do deslocamento de massas [124]. O mecanismo geral do funcionamento do HDX pode ser descrito de acordo com a equação abaixo:



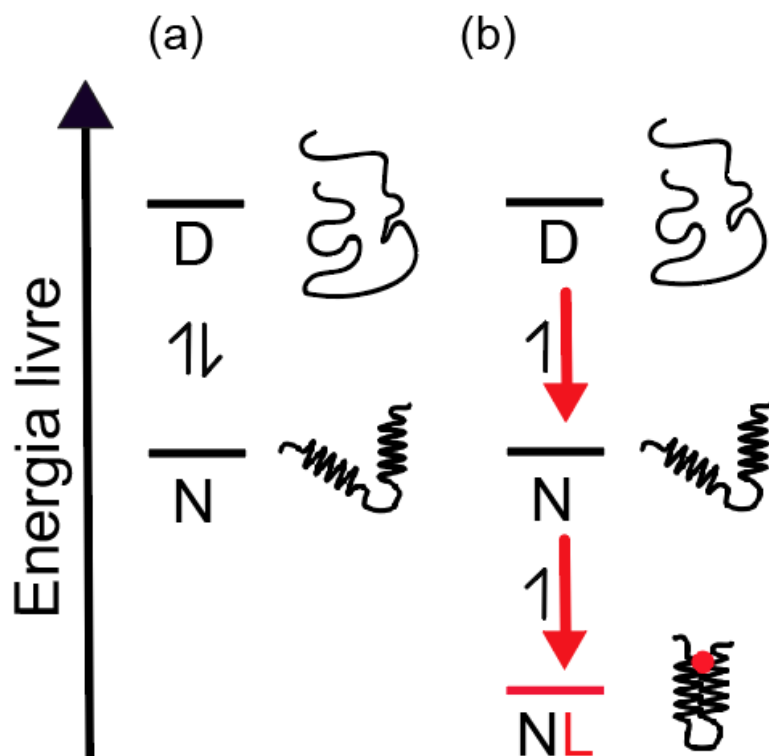
onde  $K_{\text{ab}}$ ,  $K_{\text{fec}}$ , e  $K_{\text{tr}}$  são as constantes de abertura, de fechamento e de troca, respectivamente. Cada hidrogênio de amida em uma proteína pode exibir uma única combinação de  $K_{\text{ab}}$ ,  $K_{\text{fec}}$  e  $K_{\text{tr}}$ . Para que ocorra a troca em uma região da proteína, a amida de interesse deve estar acessível ao solvente, o que significa que pontes de hidrogênio serão transientemente quebradas [125].

### 1.3.1. EX1 E EX2

Sob condições nativas, a maioria das proteínas em uma dada população ocupa o seu estado mínimo de energia. No entanto, devido à natureza dinâmica das proteínas, uma pequena fração da população transientemente visita estados de alta energia, retornando posteriormente ao seu estado nativo (**Figura12A e B**). Nessas condições de alta energia, a estrutura da proteína difere muito do seu estado nativo, tal que certas regiões podem se

desdobrar e pontes de hidrogênio podem ser desfeitas (**Figura 12A**). Através da utilização de HDX, é possível determinar até que ponto proteínas ocupam esses níveis de energia mais elevados [126-131]. O grau no qual a proteína desvia da sua estrutura nativa, quando em estados de mais alta energia, será visto via HDX de acordo com o grau de captação de deutério. Na presença de D<sub>2</sub>O, todos os hidrogênios das amidas irão eventualmente trocar por deutério. As taxas nas quais essas trocas ocorrem podem ser atribuídas primeiramente ao grau de flexibilidade das estruturas secundárias e também a contribuições de acessibilidade ao solvente, de acordo com a equação 2 [125]. Regiões altamente organizadas como alfa-hélices e folhas-beta trocam hidrogênio por deutério muito mais lentamente se comparados com estruturas desestruturadas como os *loops*. Esta ideia pode ser estendida para estudos de sítios de ligação de proteínas. Ligantes são conhecidos por estabilizar estruturas de proteínas. Portanto, sob a inclusão de um ligante, o equilíbrio de uma dada proteína seguiria o princípio de Le Chatelier, sendo deslocado para o estado de ligação com o ligante (**Figura 12B**). Esse deslocamento reduz a porcentagem das amostras de proteínas experimentando maiores estados de energia e, conseqüentemente, a observação da diminuição na captação de deutério no HDX.

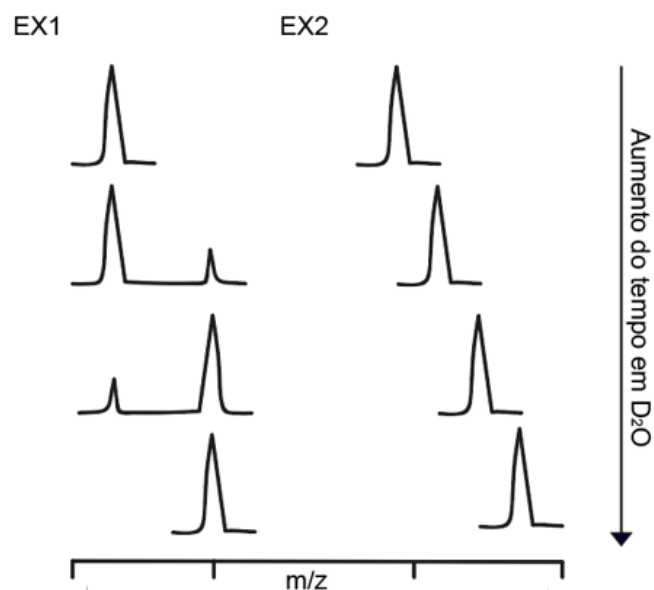
Existem dois principais regimes vistos na cinética de HDX para proteínas no estado nativo: EX1 e EX2 (**Figura 13**). O regime de troca EX2 é normalmente observado para proteínas nativas em pH fisiológico onde a maioria da marcação acontecerá com  $K_{fec} \gg K_{tr}$ . Este regime de troca é manifestado via picos em envelopes que se deslocam para maior m/z, à medida que o tempo de exposição ao deutério aumenta (**Figura 13**).



**Figura 12. A dinâmica do equilíbrio de proteínas.** A) Em condições nativas, proteínas estão em equilíbrio com o estado nativo (N) e estados de maiores energias, como estados desdobrados (D). B) A incorporação de um ligante (círculo vermelho), desloca o equilíbrio destes estados de alta energia para um novo estado NL, geralmente mais estável após a ligação.

Contrariamente, EX1 não é muito comum em pH fisiológico. Neste cenário, a taxa de troca é maior que a taxa de fechamento da proteína ( $K_{tr} \gg K_{fec}$ ). Esse regime pode ser promovido pela presença de agentes desnaturantes ou altas temperaturas. EX1 é caracterizado por uma distribuição bimodal de massas (**Figura 13**).

Experimentos de HDX-MS contínuo são realizados como a seguir (**Figura 14**). Primeiramente, a proteína é exposta a  $D_2O$  nas condições em que ela se encontra nativa (pH 7, 25°C). Então, alíquotas são retiradas a cada tempo desejado, e a reação de troca é parada rapidamente ao diminuir o pH e a temperatura (pH 2.3, 0°C) [132]. Assim, proteínas podem ser analisadas na forma intacta ou podem ser proteoliticamente digeridas, utilizando uma protease ácida como a pepsina. Uma protease ácida é necessária porque outras enzimas como a tripsina não funcionam em baixo pH, que é requerido na solução para parar a reação. Inicialmente, a digestão com pepsina era feita em solução, mas atualmente estão disponíveis colunas com pepsina imobilizada designada para HPLC [114, 115, 133].

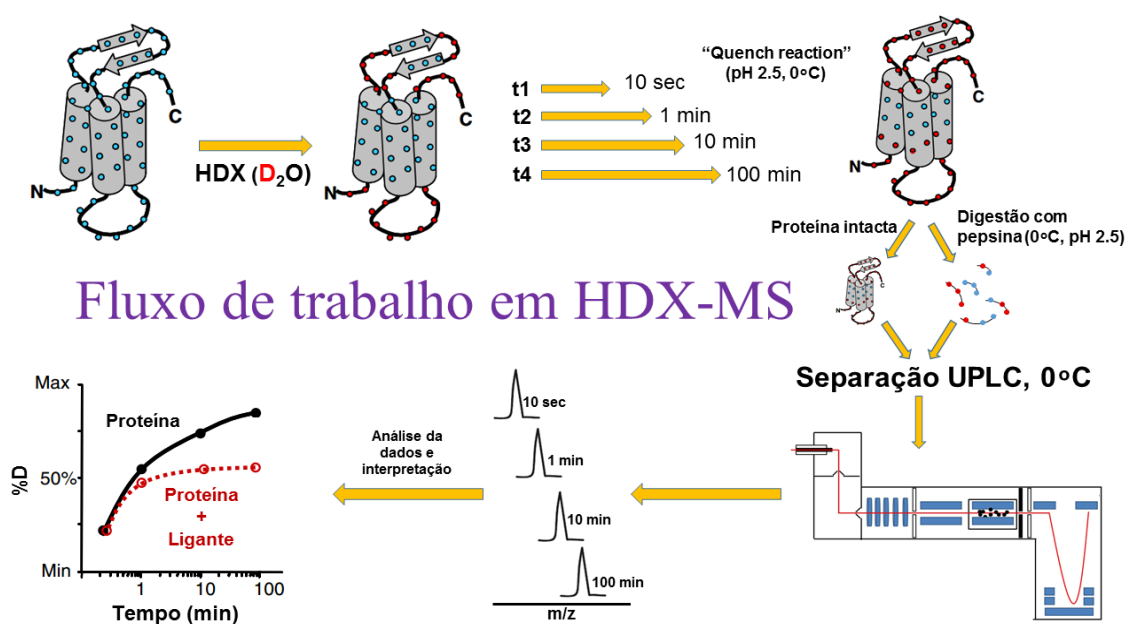


**Figura 13. Desenho esquemático demonstrando os regimes EX1 e EX2.** No EX1, observa-se distribuição isotópica bimodal dos peptídeos, enquanto EX2 é caracterizado especialmente por distribuição isotópica única.

A separação dos fragmentos pépticos, antes da análise por espectrometria de massas, utilizando *high performance liquid chromatography* (HPLC) *online* tem se tornado padrão. Existe, no entanto, um problema no qual as amidas deuteradas podem sofrer *back-exchange* durante o processo de separação [134, 135]. Para minimizar este *back-exchange*, o sistema é refrigerado a 15 °C durante a digestão e a 0 °C durante a separação cromatográfica [135]. O gradiente gerado no HPLC é também otimizado para diminuir o tempo de retenção sem comprometer a resolução. HPLC de fase reversa é usado para separar fragmentos peptídicos com acetonitrila agindo como eluente orgânico. Depois, os peptídeos são ionizados por ESI e, finalmente, analisados por MS, onde deutérios incorporados – os quais geram um deslocamento de massa – podem ser observados (**Figura 13**). Recentes avanços utilizando *ultra performance liquid chromatography* (UPLC) e LC semi ou completamente automatizado tem refinado o fluxo de trabalho em HDX, valendo ressaltar que HDX-MS pode ser também usado para estudos de cinética de proteínas [136]. *Pulsed* HDX-MS tem sido utilizado em experimentos de redobramento de proteína ao se expor brevemente a proteína a deutério à medida que esta redobra na escala de milissegundos [137, 138]. Consequentemente, regiões com menos deutério são indicativas da formação de estruturas secundárias ao longo do caminho do dobramento.

HDX-MS apresenta algumas limitações quando se analisa estrutura de proteínas. Experimentalmente, necessita-se de ampla cobertura de sequência da proteína em análise, que pode ser conseguida por identificação de peptídeos produzidos por digestão com uma protease

não específica. Proteases típicas e que possuem sítios de clivagem conhecidos, como tripsina [139], não são utilizadas, já que essa perde sua atividade catalítica em baixo pH. Pepsina e outras proteases não sítio-específicas podem sofrer autólise sob as condições ácidas empregadas [140]. O tamanho da proteína também é fator limitante devido ao número e comprimento dos peptídeos gerados por proteólise, aumentando o tempo consumido para identificar cada peptídeo corretamente e diminuindo a resolução espacial. Recentemente, o tempo investido na identificação de peptídeos tem diminuído dramaticamente com o aparecimento de novos softwares [141]. A sensibilidade à temperatura também pode ser um problema, aumentando o *back-exchange*. Limitações também aparecem quando HDX-MS é utilizado para estudo de proteínas-ligantes.



**Figura 14. Protocolo geral para um experimento básico de HDX.** Alíquotas são expostas a D<sub>2</sub>O e então pepsinizadas por tempos crescentes. Então, os peptídeos gerados são separados por HPLC de fase reversa. Os solventes A e B são usados para formar um gradiente durante separação dos peptídeos, onde o solvente A é água e B o solvente orgânico acetonitrila. Os peptídeos são então injetados pelo em espectrômetro de massas, que irá gerar dados da captação de deutério e consequente deslocamento de massa, que serão usados em análise de dados e interpretação dos resultados.

Ligantes geralmente estabilizam as proteínas às quais se associam e induzem a redução das taxas de HDX. As maiores mudanças tendem a acontecer em regiões que interagem diretamente com o ligante, embora efeitos alostéricos também possam desempenhar importantes papéis [129, 142]. Baixa afinidade do ligante frequentemente gera cinéticas indistinguíveis a respeito dos cenários com ligante e sem ligante. Desta forma, usar HDX-MS para determinar mudanças estruturais é limitado pela força de interação proteína-ligante.

---

## 2. OBJETIVOS

---

O objetivo geral da tese consiste na caracterização estrutural da proteína MRJP1, seus oligômeros e sua associação com apisimina.

Estão compreendidas as seguintes metas:

- 1) Caracterizar e entender a influência de modificações pós-traducionais como glicosilações de MRJP1 na formação de oligômeros e sua influência na estrutura terciária da proteína;
- 2) Associar técnicas espectroscópicas e bioquímicas à espectrometria de massas na caracterização estrutural e oligomérica de MRJP1.
- 3) Descrever uma possível função para apisimina no hetero-complexo MRJP1/apisimina.

---

### 3. JUSTIFICATIVA

---

Entender as relações entre estrutura e função proteica permanece um foco primário na biologia estrutural com consequências importantes nos campos da biologia molecular, genética, bioquímica, engenharia de proteínas e bioinformática. A estrutura tridimensional de uma proteína define não apenas seu tamanho e forma, mas também sua função.

Como já foi exposto no tópico “INTRODUÇÃO GERAL DA TESE”, nosso grupo tem se dedicado a determinar proteínas cerebrais relacionadas a comportamento e aprendizagem em abelhas *Apis mellifera*. Desta forma, o presente trabalho insere-se na linha de pesquisa “BIOQUÍMICA DO COMPORTAMENTO E DA APRENDIZAGEM”, ativa no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

De acordo com nossos achados, bem como outras evidências na literatura, a proteína MRJP1, objeto do presente trabalho, é uma proteína que tem papel de destaque na biologia de abelhas e que ainda não possui estrutura determinada por cristalografia de raios-X, nem mesmo por outras técnicas. A determinação da estrutura dessa proteína nos ajudará a entender a sua função, assim como também funções de outras proteínas correlatas.

Diante da evidente importância funcional de MRJP1 e reconhecendo que a estrutura tridimensional de uma macromolécula biológica está intimamente relacionada à sua função, faz-se necessário um estudo aprofundado da estrutura terciária e quaternária dessa proteína, a fim de relacionar ou, ao menos, direcionar futuros trabalhos a compreender sua relação estrutura/função.

---

## **4. CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS PRELIMINARES DE MRJP1 E SEUS CARBOIDRATOS**

---

### **1. INTRODUÇÃO**

O estudo das propriedades bioquímicas, biofísicas e físico-químicas de uma macromolécula é essencial para o entendimento das suas funções dentro de um dado organismo. Muitas técnicas como a cristalografia ainda se mantem inviável para uma vasta gama de macromoléculas, dentre elas as glicoproteínas. A ressonância magnética nuclear, apesar de ser uma poderosa ferramenta, possui grandes limitações especialmente quando se diz respeito ao tamanho de uma macromolécula a ser analisada. Para superar estes desafios, a fim de se obter uma maior compreensão da estrutura de uma proteína em seu nível atômico, caracterizações bioquímicas e biofísicas básicas se fazem necessárias para que os primeiros passos sejam dados. Para este fim, este capítulo dedica-se em dar contribuições na caracterização de MRJP1 e no entendimento da influência estrutural de seus carboidratos.

### **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1.1. Purificação de MRJP1 por cromatografia de troca iônica**

Uma amostra de 250 g de geleia real (Apivita, Rio Claro, Brasil) foi homogeneizada em 1.2 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5 (Tampão A) contendo 10 mM de EDTA e um coquetel de inibidores de proteases (cOmplete Mini, Roche, Mannheim, Alemanha). O extrato então foi misturado por 2 min em Vortex e centrifugado a 16.000 g por 30 min a temperatura ambiente. O material solúvel foi submetido a cromatografia líquida de troca iônica usando uma coluna Mono-Q® HR 10/10 (Pharmacia, Uppsala, Suécia) acoplado a um sistema de FPLC (Pharmacia, Uppsala, Suécia). A coluna foi equilibrada com tampão A sob um fluxo de 1.5 mL/min. A eluição foi realizada usando um gradiente de NaCl de 0-1 M em tampão A: 0-10 min, buffer A; 10-60 min, 0-0.2 M NaCl; 60-90 min, 0.2-0.5 M NaCl; 90-95 min, 0.5-



1 M NaCl; 95–100 min, 1 M NaCl. A cromatografia ocorreu a temperatura ambiente e foi acompanhada por absorção a 280 nm. Cada fração foi analisada por SDS-PAGE, tal que aquela de interesse foi dialisada contra água destilada a 4°C e liofilizada.

## **1.2. Eletroforese desnaturante em poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose**

Eletroforese desnaturante em poliacrilamida seguiu o protocolo original de Laemmli (Laemmli, 1970). Para a confecção dos géis, foram utilizadas placas de vidro de 16,5 cm x 15,5 cm, espaçadores de 0,75 mm e pentes com 10 poços. O gel foi polimerizado pela adição de 100 µl de persulfato de amônio 10 % e 10 µl de TEMED a cada 10 ml de solução de gel separador (13 %). O gel separador foi aplicado às placas e coberto com 500 µl de butanol para evitar contato com ar e conseqüente oxidação. Após polimerização, o butanol foi retirado, a superfície do gel foi lavada com água destilada e secada com papel filtro para retirar o excesso de água. Em seguida, foi adicionado o gel concentrador com 50 µl de persulfato de amônio 10 % e 5 µl de TEMED. Então, tampão de amostra foi adicionado às amostras de proteínas, que foram incubadas a 100 °C por 5 min para garantir desnaturação completa das proteínas. As eletroforeses foram realizadas com uma corrente constante de 25 mA à temperatura ambiente. Após o término da corrida, a coloração do gel foi realizada com solução contendo 0,07 g de Coomassie Blue R-250 em metanol 50 % e ácido acético 10 %, incubando-o sob agitação a temperatura ambiente por 2 h e descorando-o em seguida para visualização das bandas. O processo de coloração do gel não era realizado se o mesmo fosse utilizado para transferência de proteínas.

A técnica de transferência semi-seca foi realizada utilizando um sistema *Semi – Dry Transfer Cell* (BIO-RAD), com membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra membrane 0,45µm, Amersham). Após a corrida de eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana. Para isso, uma pilha de três pedaços de papéis de filtro previamente saturados com tampão de transferência foi colocada sobre o anodo do sistema de transferência. Sobre esta primeira pilha de papel de filtro, foi colocado o gel, e sobre o gel, a membrana de nitrocelulose seguida de outras três folhas de papel de filtro. O eletrodo aniônico foi acoplado ao sistema e a transferência, realizada com uma amperagem constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de membrana por aproximadamente 1 h.

## **1.3. Coloração de carboidratos de MRJP1**

Após transferência de proteínas de gel SDS-PAGE para uma membrana de

nitrocelulose, esta foi incubada em PBS por 10 min. Em seguida, o PBS foi retirado e a membrana passou por um outro processo de incubação com uma solução de 10 mM de metaperiodato de sódio dissolvido em 100 mM de tampão acetato, pH 5, por um período de 20 min. Em seguida, a membrana foi lavada 3 x com PBS por um período de 10 min cada lavagem. Adicionou-se, então, 40 µl de 0,125 mM de biotina hidrazida a 20 mL de 100 mM de tampão acetato pH 5.5, no qual a membrana ficou incubada por 20 min. Ao final da incubação, a membrana foi lavada novamente com PBS por 3 x, 10 min cada lavagem. Em seguida, incubou-se a membrana em 20 mL do agente bloqueador de membrana a 5% por 60 min. Novamente, realizou-se o processo de lavagem com PBS, como descrito acima. Em seguida, incubou-se em 20 mL de uma solução de estreptavidina peroxidase em uma diluição de 1:1000 em PBS por 30 min. Repetiu-se as lavagens. A revelação foi realizada utilizando o kit ECL *Glycoprotein Detection System* da GE Healthcare.

#### **1.4. Coloração com nitrato de prata**

Cada gel de SDS-PAGE foi submetido a coloração com nitrato de prata. O gel foi incubado “overnight” com solução fixadora. Na sequência, o gel foi submetido a duas lavagens de 20 min com uma solução contendo 50 % de etanol. Em seguida, o gel foi incubado com 0,02 % de tiosulfato de sódio e, depois, lavado três vezes com água Milli-Q. A impregnação foi feita com uma solução contendo 0,2 % de AgNO<sub>3</sub> e 0,075 % de formaldeído por 20 min e lavado novamente por três vezes com água Milli-Q. As proteínas foram reveladas com uma solução reveladora contendo 6 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (p/v), 0,05 % de formaldeído e 0,4 mg de tiosulfato de sódio (p/v). A reação foi parada com solução de 50 % de metanol e 12 % de ácido acético [10].

#### **1.5. Eletroforese bidimensional (2DE)**

Eletroforese bidimensional foi realizada utilizando sistemas IPGphor 3 (GE Healthcare) e Protean II xi Cell (BioRad, Hercules, EUA). A proteína foi solubilizada em 350 µL de tampão de lise contendo tampão pH 4–7. A focalização isoeétrica foi realizada com tiras de gradiente de pH imobilizado de 18 cm usando sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), em temperatura constante de 20°C. Tiras focalizadas em sarcófagos foram submetidas a corrente máxima de 50 µA e voltagem máxima de 8.000 V, enquanto que para aquelas focalizadas em sistema “manifold”, usou-se corrente e voltagem máximas de 75 µA e 10.000 V respectivamente. As tiras de pH 3–10 foram reidratadas em sarcófago por 6 h seguido por focalização a 30 V por 6 h, 500 V por 1 h, 1.000 V por 1 h e 8.000 V por 4 h,

totalizando 33.680 Vh. A reidratação ocorreu por 16 h e a focalização a 500 V por 1 h, 1.000 V (gradiente) por 1 h, 10.000 V (gradiente) por 3 h e 10.000 V por 1 h e 45 min, totalizando 35.300 Vh.

Realizou-se a redução das pontes dissulfeto das proteínas por incubação das tiras em tampão de equilíbrio [Tris-HCl 50 mM pH 8,8 ureia 6 M, glicerol 30% (v/v) e SDS 2%] contendo DTT 125 mM. A alquilação foi feita, em seguida, com carbamidometilação dos radicais sulfidríla (resíduos de cisteína) em tampão de equilíbrio com iodoacetamida 300 mM. As tiras foram transferidas para géis de poliacrilamida contendo SDS, com concentração fixa de acrilamida (10%). Os géis foram corados com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987), compatível com espectrometria de massa.

### **1.6. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

Espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering* – DLS) é uma técnica útil para a análise da homogeneidade, distribuição, tamanho ou agregação de moléculas em solução.

A MRJP1 purificada foi dissolvida em tampão Hepes 50 mM e centrifugada a 16.000 g durante 15 min a 20 °C. Todas as soluções utilizadas foram previamente submetidas a filtragem (0,22 µm). Os experimentos foram realizados em equipamento Malvern Zetasizer Nano Series Z5 em cubeta de acrílico correspondente para um volume final de 1.000 µL. O comprimento de onda de luz utilizado foi de 633 nm. As amostras foram analisadas quanto à dispersão, número e volume hidrodinâmico da MRJP1, a partir da relação entre o sinal da intensidade da luz espalhada e a massa da amostra em solução.

### **1.7. Preparo de amostras para espectrometria de massas na identificação de glicopeptídeos**

MRJP1 foi dissolvida em 20 mM de TEAB (*triethylammonium bicarbonate*) para uma concentração de 20 µg/µL, reduzidas com 20 mM de DTT a 56 °C por 45 min, alquiladas com 40 mM de iodoacetamida em temperatura ambiente e no escuro por 60 min, e, em seguida, digerida “overnight” a 37 °C com 1 µg de tripsina (Promega, Madison, USA). Após a digestão, as amostras foram acidificadas com TFA para uma concentração final de 0,1 % e dessalinizadas com microcolunas em ponteiras de 10 µl contendo resina de fase reversa Poros R3 (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA), empacotados com 1 cm comprimento, adaptado de [144].

### 1.8. Enriquecimento de glicopeptídeos

O digesto proteico foi submetido a enriquecimento de glicopeptídeos e digestão com PNGase F como descrito em (Mysling *et al.*, 2010), com pequenas modificações. Brevemente, resina de ZIC-HILIC (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) foi empacotada em microcoluna de 1 cm em ponteiros de 200 µl. A microcoluna empacotada foi primeiramente lavada com 20 µl de solução de eluição (5% de ácido fórmico) e então equilibrada com 40 µl de solução “load/wash” (80% ACN, 1% TFA). As amostras foram solubilizadas em 10 µl de solução “load/wash” em uma coluna usando uma seringa de 1 mL, lavadas com 40 µl de solução “load/wash” e os glicopeptídeos foram eluídos com 10 µl de solução de eluição e secos em centrífuga a vácuo. As amostras enriquecidas de glicopeptídeos foram divididas em duas e, em uma delas, os glicanos N-ligados foram removidos utilizando 0.2 unidades de PNGase F em 50 mM de TEAB. As análises de espectrometria de massas foram realizadas em ambas as amostras, a fim de observar a deaminação de asparaginas [145].

### 1.9. LC-MS/MS e análise de dados

Amostras dessalinizadas foram ressuspendidas em 1 % de ácido fórmico e 2 µg (quantificadas em sistema Qubit) de cada foram submetidas a LC-MS/MS em um sistema DIONEX 3000 nanoUPLC (Thermo Scientific, Waltham, USA) acoplado *on line* a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Waltham, USA).

A cromatografia foi feita em um sistema de duas colunas capilares: (i) trap column (150 µm de diâmetro interno e dois cm de comprimento) e (ii) coluna analítica (75 µm de diâmetro interno, 15 cm de comprimento), empacotadas (*home made*) com resina de fase reversa ReproSil-Pur C18-AQ, 5 µm (Dr. Maisch GmbH, Germany) e lavadas por 5 min com 98 % de tampão A (0.1 % ácido fórmico) e 2 % de tampão B (0.1 % de ácido fórmico, 95 % de acetonitrila). A eluição foi realizada utilizando um gradiente de 2 % de tampão B para 30 % de tampão B por 90 min, 30 % para 98% de tampão B por 5 min, 98 % de tampão B por 10 min, voltando para 2 % de tampão B por 1 min e reequilibrando por 15 min em 2 % de tampão B (um total de 121 min e 300 nl/min). Os espectros de massas foram gerados no modo de aquisição positivo e *data-dependent MS scan*. Cada *MS scan* no orbitrap (intervalo de m/z de 400-1300 e resolução de 120.000) foi seguido de MS/MS dos 15 íons mais intensos. A fragmentação foi realizada por colisão de alta energia (HCD) com exclusão dinâmica por 15 s dos peptídeos já selecionados uma vez para fragmentação por MS/MS. Dados brutos foram visualizados utilizando Xcalibur v.2.1 (Thermo Scientific, Waltham, USA). O processamento dos dados foi realizado usando Proteome Discoverer v.1.3 (Thermo Scientific, Waltham,

USA). Os arquivos raw gerados pelo espectrômetro foram submetidos a identificação no Proteome Discoverer com algoritmo SequestHT contra banco de dados de proteínas de *Apis mellifera* (baixado em julho de 2014) a partir do UniProt / Swiss-Prot e UniProt / TrEMBL. Proteínas contaminantes (vários tipos de queratinas humanas, BSA e tripsina porcina) foram também adicionados à base de dados e todas as proteínas contaminantes foram removidas manualmente da lista de resultados. As pesquisas foram realizadas com os seguintes parâmetros: 10 ppms de erro no MS e 0,06 Da de erro no MS/MS, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e deamidação de asparaginas e oxidação de metioninas como modificações variáveis.

### 1.10. Microscopia de força atômica

As imagens foram adquiridas em um microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu, Kyoto, Japan). O equipamento foi operado em modo contato intermitente. A sonda utilizada foi uma Tap190AI-G (Budget Sensors, Sofia, Bulgária), com aplicabilidade em contato intermitente, fabricada com silício, revestida com alumínio e caracterizada por um cantilever longo. Os resultados obtidos foram analisados através dos programas Shimadzu SPM-9600 e o WSxM versão 4.0.

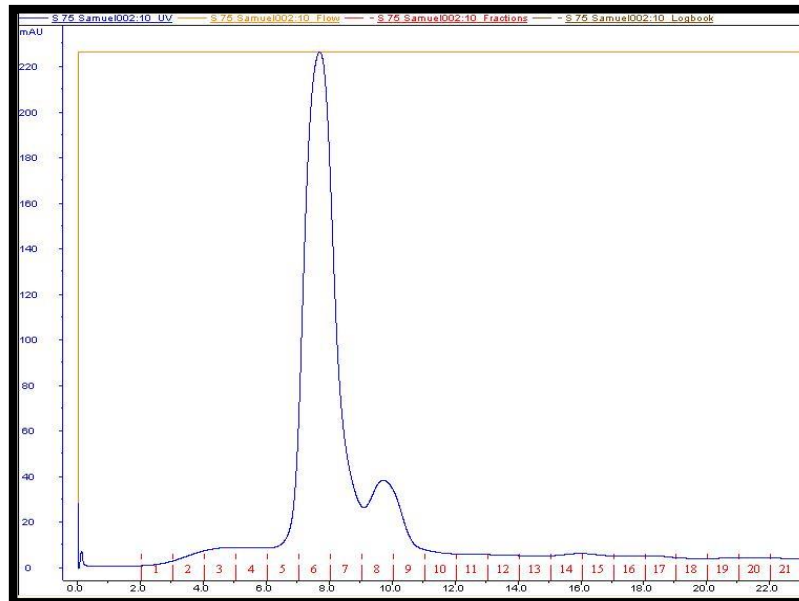
## 2. Resultados

MRJP1 foi submetida a um processo de purificação de proteínas solúveis oriundas da GR utilizando cromatografia de troca iônica, como descrito em [146]. Isso foi feito com o objetivo de conseguir formas monodispersas da MRJP1. Em seguida, a proteína purificada e liofilizada foi ressuspensa em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, glicina 0,5 M, NaCl 0,15 M, pH 7 e submetida a cromatografia de exclusão molecular, em que dois miligramas de proteína foram injetados em uma coluna Superdex 75. Foi possível observar um pico principal de MRJP1, cuja coleta permitiu obter uma forma mais pura de MRJP1 (**Figura 1**).

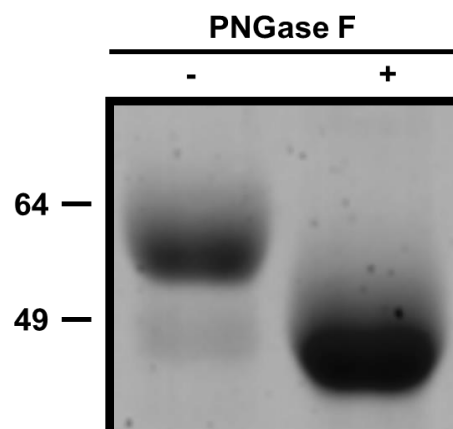
Para analisar se a proteína se encontrava na forma monodispersa ou se apresentava estados oligoméricos, realizamos experimentos de DLS para se determinar a polidispersividade ( $Pd$ ), que é um parâmetro a ser usado principalmente para interpretação de amostras com distribuição monomodal. Este parâmetro é usado como indicador da homogeneidade de distribuição das moléculas na amostra. Valores de  $Pd$  menores que 15% indicam uma solução monodispersa e maiores que 30%, uma quantidade significativa de polidispersividade [143]. Aqui, constatamos que apesar da separação por cromatografia de exclusão molecular, a proteína MRJP1 ainda se apresentava polidispersa (resultados não

mostrados), inviabilizando ensaios de cristalização.

Após várias tentativas sem sucesso de purificação de formas monodispersas e assumindo que a MRJP1 é uma glicoproteína [6], decidimos analisar a possível influência dos carboidratos ligados à proteína e sua influência na polidispersividade e formação de oligômeros. Com esse intuito, utilizamos a PNGase F, que é capaz de clivar resíduos N-ligados em asparagina. Após a retirada dos carboidratos, foi possível observar que a MRJP1 perdeu cerca de 7 kDa em sua massa molecular (**Figura 2**).



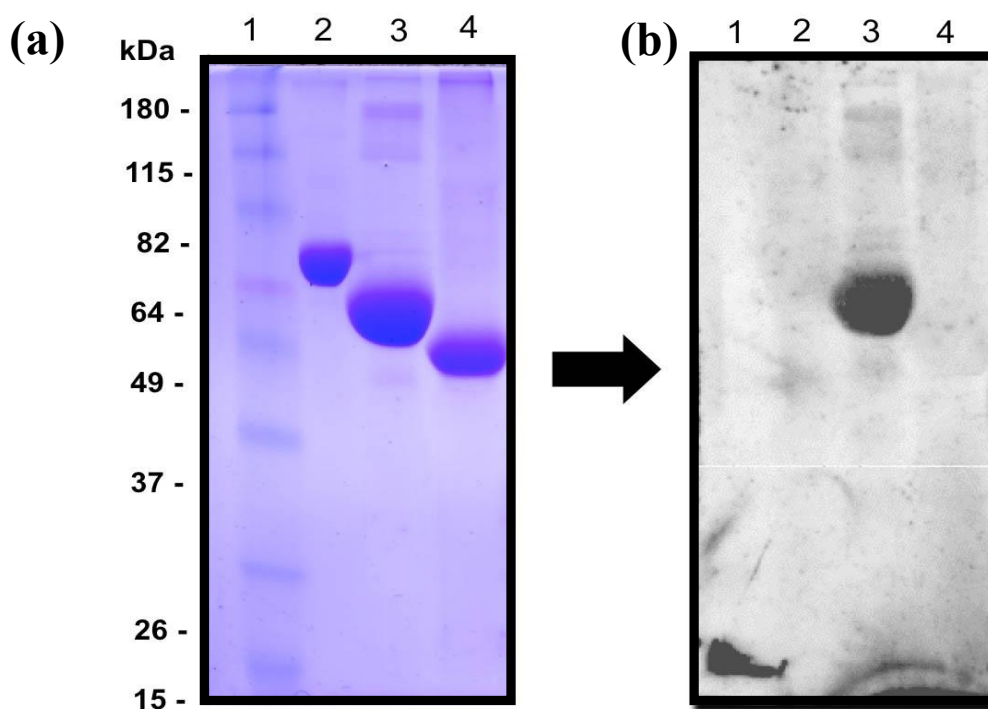
**Figura 1. Cromatografia de exclusão molecular de MRJP1** em tampão carbonato/bicarbonato 0,02 M, pH 10,0, com glicina 0,5 M. Dois miligramas de proteína foram injetados em coluna Superdex 75 (GE Healthcare). O tampão de eluição foi carbonato/bicarbonato 0,02 M, Gly 0,5 M, pH 10,0. Eluição acompanhada por absorção óptica a  $\lambda = 280$  nm.



**Figura 2. SDS-PAGE para comparar o peso molecular de MRJP1 glicosilada e deglicosilada.** A diferença na massa da proteína após deglicosilação observada demonstra a eficiência da PNGase F em deglicosilar MRJP1.

Para certificar que a proteína foi completamente deglicosilada, realizamos

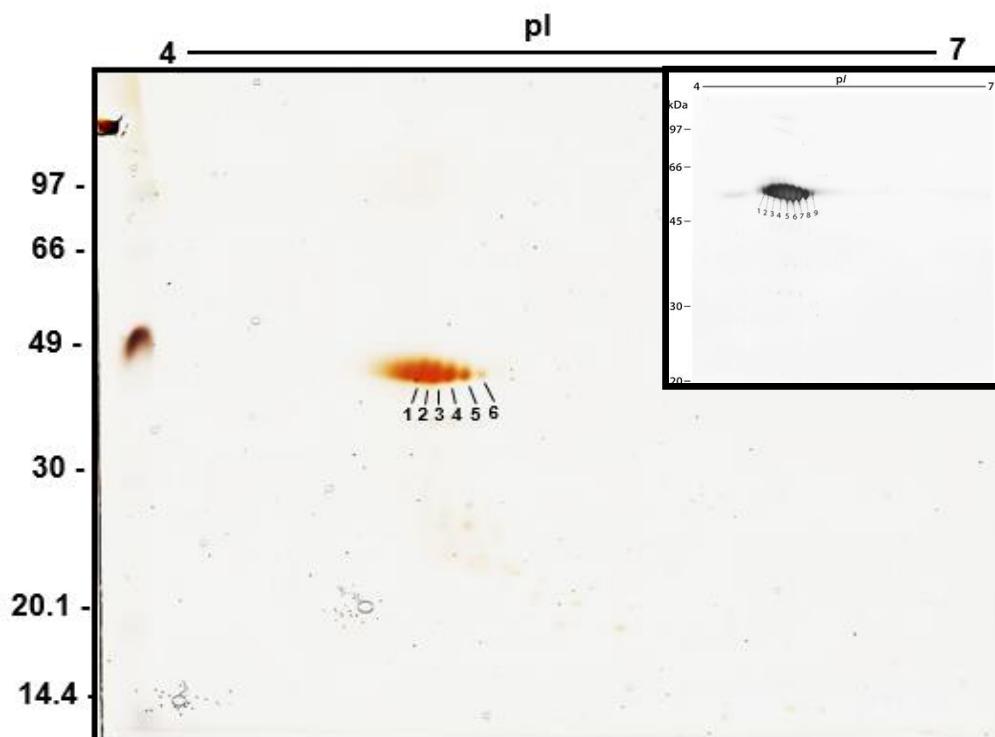
experimentos de coloração de carboidratos, pelos quais foi possível constatar uma completa deglicosilação da MRJP1. Este experimento foi especialmente importante uma vez que não sabíamos se MRJP1 possuía apenas glicanos N-ligado. Neste caso, glicanos O-ligado não seriam removidos da proteína devido à especificidade da enzima utilizada. Então, neste experimento, utilizamos como controle negativo uma proteína não glicosilada, a albumina bovina BSA. Como controle positivo (proteína sobre a qual deveria ocorrer a marcação dos carboidratos), utilizamos a própria MRJP1 glicosilada. Uma terceira amostra correspondendo à MRJP1 deglicosilada com PNGase F foi analisada e observamos que a marcação de carboidratos característica não aconteceu no controle negativo e nem na proteína deglicosilada. Por outro lado, houve uma intensa marcação em MRJP1 (proteína controle positivo). Sendo assim, demonstramos a eficiência da deglicosilação enzimática e confirmamos que a MRJP1 possui apenas N-glicanos (**Figura 3**).



**Figura 3. Demonstração da eficiência da deglicosilação.** À esquerda (a), um gel SDS-PAGE demonstrando o perfil proteico do experimento. Foi aplicado 4 µg de cada proteína. (1) Marcador de massa molecular, (2) Controle negativo – BSA, (3) MRJP1 glicosilada e (4) MRJP1 deglicosilada. À direita (b), revelação dos carboidratos marcados.

Como foi demonstrado em [146], a MRJP1 existe em nove diferentes proteoformas quando analisadas em gel 2-DE. A fim de saber se essas diferentes proteoformas de MRJP1 são oriundas de diferentes graus de glicosilação, assim como sugerido por aqueles mesmos autores [146], realizamos experimentos de eletroforese bidimensional com os mesmos parâmetros deles. O perfil proteico apresentou-se com *pI*s entre 4,7 e 5,2, assemelhando-se

àquele observado no trabalho citado acima (**Figura 4**). Além do mais, foi possível observar todas as nove proteoformas anteriormente descritas. No entanto, apenas as seis últimas proteoformas se tornaram bem distintas, podendo ser isoladas do gel. As manchas de proteínas mais à esquerda do gel apresentaram-se com aparência difusa, indistinguíveis entre si, mas com aparente diferença em seu ponto isoelétrico.



**Figura 4.** 2-DE da fração 6 separada em FPLC de troca aniônica. Um gradiente imobilizado de pH 4–7 foi utilizado na primeira dimensão e SDS-PAGE em poliacrilamida 10%, na segunda dimensão. Dez microgramas de proteína deglicosilada foram analisadas. Experimento realizado por Cruz et. al. 2011 [146] pode ser observado no *inset*.

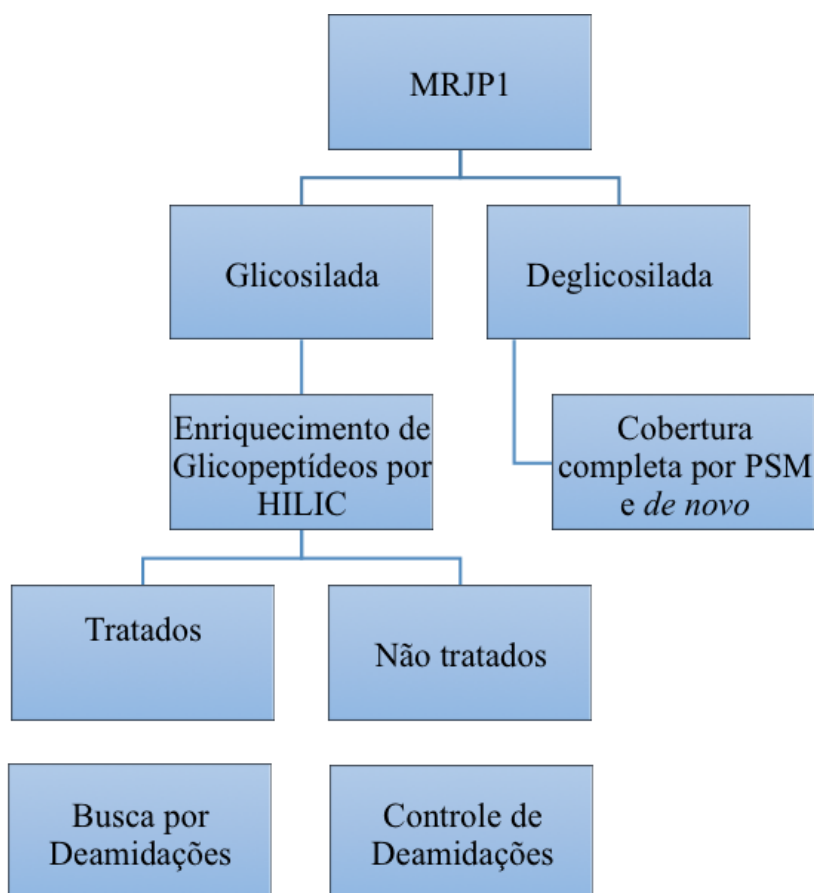
### 1.1. Caracterização de sequência primária por espectrometria de massas e mapeamento de sítios de glicosilação.

Dando continuidade à caracterização de MRJP1, resolvemos usar espectrometria de massas para determinar sítios de glicosilação baseados na deamidação de asparagina, um processo de modificação química decorrente da clivagem enzimática por PNGase F.

Para o desenvolvimento deste experimento, utilizamos a proteína MRJP1 de duas formas (**Figura 5**). A primeira corresponde à MRJP1 glicosilada, que, após digestão trípica, foi submetida a enriquecimento de glicopeptídeos. Este material enriquecido foi então distribuído em dois diferentes tubos. Um tubo foi tratado com PNGase F (tratado) e o outro não submetido a tratamento enzimático (não tratado). Na amostra tratada, foi realizada busca por deamidações, enquanto o não tratado nos serviu como controle para o experimento. Sabendo que as deamidações podem ocorrer naturalmente, foi fundamental o controle da



proteína sem deglicosilação para garantir que sítios de deamidação detectados fossem devido à presença de carboidratos ligados à cadeia peptídica e não a artefato do preparo da amostra.



**Figure 5. Fluxograma representando a estratégia experimental do mapeamento de sítios de glicosilação bem como cobertura completa de MRJP1.** Em amostras tratadas, utilizamos PNGase F para deglicosilar MRJP1 e em não tratadas não houve ação enzimática.

Na **Tabela 1**, estão listados os dois sítios de glicosilação encontrados em peptídeos trípticos da MRJP1 identificados por PSM (*peptide spectrum match*) cujas deamidações estavam presentes no sítio consenso de N-glicosilações (NXS/T/C, X≠P) detectados somente na amostra tratada.

**Tabela 1. Glicopeptídeos identificados em MRJP1**

Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	$\Delta M$ [ppm]	RT [min]
QVEIPHDVAVnATTGK	148	2	1	O18330	N11(Deamidated)	4.37	2	1679.85661	-2.00	15.89
LWVLDSGLVnNTQPmeS PK	150	4	1	O18330	N10(Deamidated); M15(Oxidation); C16(Carbamidomethyl)	3.06	3	2176.04001	-0.64	34.86

**Glicopeptídeos N-ligados encontrados em MRJP1.** Deamidações encontram-se no sítio consenso e não foram identificados na amostra controle.

No segundo experimento, MRJP1 foi submetida a digestão tríptica e, em seguida, a

deglicosilação enzimática por PNGase F. Estas amostras foram analisadas por espectrometria de massas com duas abordagens de identificação de espectros (PSM e *de novo*) visando a identificação de outras modificações pós-traducionais biologicamente relevantes e que pudessem justificar a presença de proteoformas da proteína em géis 2-DE, aliado à tentativa de cobertura completa da sequência proteica.

Utilizando o PSM, foi possível obter a cobertura de grande parte da sequência da MRJP1, no entanto, como pôde ser observado (**Figura 6**), dois grandes peptídeos 1 e 2 (sublinhados em vermelho), que poderiam abrigar modificações relevantes, não foram identificados. Outras pequenas sequências de aminoácidos também não foram identificadas, provavelmente por estarem fora da faixa de leitura, devido ao seu pequeno tamanho, tornando inviável a detecção.

Para tentar buscar mais informações sobre eventuais modificações pós-traducionais da MRJP1, bem como informações a respeito daqueles peptídeos não identificados por PSM, utilizamos uma outra ferramenta de identificação de espectros de MS baseada em sequenciamento *de novo*, utilizando-se o *software* PEAKS™. Neste caso, não foram especificados na busca outros tipos de modificação pós-traducional, exceto carbamidometilação de cisteínas, oxidação de metioninas e deamidação de asparaginas.

Ao contrário do PSM, o sequenciamento *de novo* pôde identificar outras modificações pós-traducionais não previamente especificadas para a busca, assim como 3 possíveis mutações na sequência primária (**Figura 7**). A primeira mutação foi observada no resíduo 135, onde uma leucina foi substituída por uma fenilalanina, ambos de características hidrofóbicas e com pequena diferença em sua massa molecular. A segunda mutação observada foi no resíduo 149, onde uma metionina foi substituída por uma tirosina. Neste caso, houve a substituição de um aminoácido hidrofóbico (metionina) por um polar sem carga (tirosina). A terceira e última mutação foi no resíduo 174, onde houve substituição de uma valina por uma prolina, dois aminoácidos hidrofóbicos. Os 20 primeiros aminoácidos permaneceram não identificados, enquanto o peptídeo 2 não identificado por PSM, compreendendo entre os aminoácidos 236 e 249, pôde ser identificado utilizando o PEAKS™.



**Figura 6. Cobertura de sequência da MRJP1 identificada por PSM usando o software ProteomeDiscoverer/ProteinCenter.** C - carbamidação; D - deamidação e O - oxidação de metionina. As letras abaixo da sequência de aminoácidos representam modificações que já estão descritas na literatura. N - deamidação de asparagina, possivelmente um sítio de glicosilação N-ligado e AA, duas modificações em aminoácidos também já descritas na literatura. Os peptídeos sublinhados 1 e 2 não foram detectados.



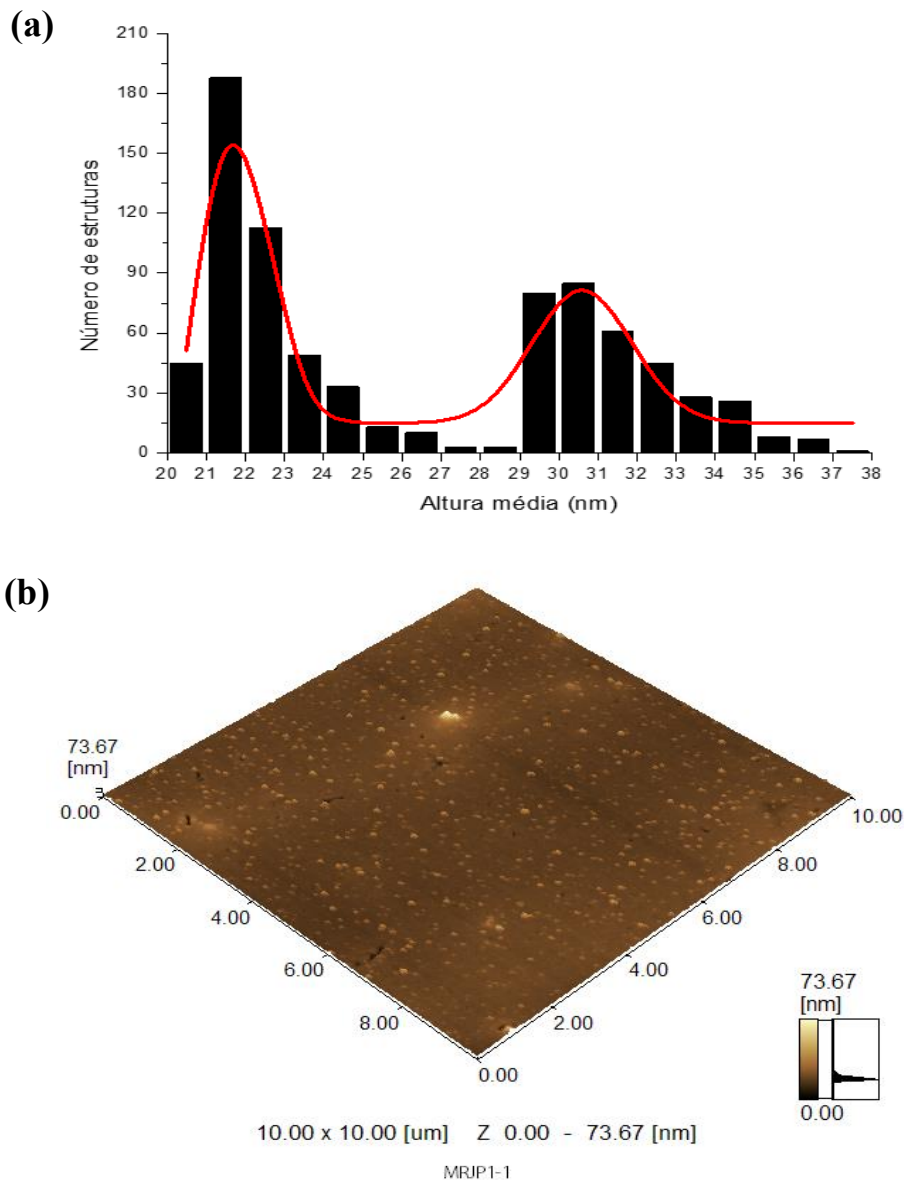
**Figura 7. Cobertura de sequência e modificações pós traducionais da MRJP1 utilizando o PEAKS™.** À direita na figura, está a legenda de todas as possíveis modificações pós traducionais encontradas em MRJP1.

## 1.2. Caracterizações iniciais de MRJP1 por microscopia de força atômica.

Experimentos preliminares de microscopia de força atômica foram realizados a fim de dar continuidade às caracterizações estruturais de MRJP1 e seus oligômeros. Na **Figura 8a**, observamos as alturas médias de populações de MRJP1 quando analisadas por microscopia de força atômica. Duas principais populações podem ser observadas, uma variando principalmente entre 21 e 23 nm e outra entre 29,5 e 31,5 nm (**Figura 8a**). Na **Figura 8b**, observamos a imagem de estruturas correspondentemente à MRJP1.

Uma grande estrutura pode ser observada na parte superior da figura **8b**, provavelmente tal estrutura corresponde a um grande agregado. Vale ressaltar que

experimentos de AFM foi realizado em modo seco, o que pode ter induzido a formação de agregados ao longo de toda análise. Mesmo sob essas condições, apenas duas populações foram observadas e com diferentes alturas.



**Figura 8. Microscopia de força atômica de MRJP1.** A) Agrupamento médio de diferentes populações de MRJP1 analisados por microscopia de força atômica. B) Imagem observada pela microscopia.

#### 4. DISCUSSÃO

Mais da metade de todas as glicoproteínas conhecidas são N-ligadas por ligação covalente de glicanos a resíduos de asparaginas dentro da sequência consenso Asn-X-Ser/Thr,

X≠Pro. Embora esse tipo de modificação tenha sido atribuída somente a eucariotos superiores, as glicosilações N-ligadas são, na verdade, uma antiga via metabólica descoberta antes da diversificação das archeas, bactérias e eucariotos, existindo, desta maneira, em todos os três domínios da vida [147, 148].

Para se ampliar o conhecimento sobre modificações pós-traducionais na MRJP1, investigamos especialmente deamidações em resíduos de asparagina, usando estratégias baseadas em 2-DE e espectrometria de massas *bottom-up*. Os sítios de glicosilação, bem como a influência dos carboidratos de MRJP1 aqui descritos, nos fornecem importante conhecimento no sentido de determinar e entender a imensa versatilidade da proteína em estudo.

Quando analisada por 2-DE, constatou-se que a MRJP1 possui nove diferentes proteoformas [146]. Utilizando as mesmas condições experimentais publicadas [146], um novo ensaio foi realizado com a proteína na sua forma deglicosilada. Aqui, observou-se o mesmo padrão de distribuição de manchas em gel 2DE (**Figura 4**), o que sugere que os carboidratos não possuem influência nas diferentes proteoformas da MRJP1. Tal perfil pode talvez ser atribuído a diferentes números de sítios de metilação na proteína, que faz com que as proteoformas migrem da faixa ácida para a básica proporcionalmente ao número de cargas extras que carreguem [149, 150]. Poucos sítios de fosforilações foram detectados na MRJP1 e não poderiam gerar o polimorfismo observado por 2DE [150]. As metilações podem potencializar a baixa reatividade da carbamido na asparagina, onde os glicanos são covalentemente ligados ao aminoácido; ou seja, as metilações podem facilitar a glicosilação de proteínas [149]. Vale ressaltar que as MRJPs pertencem a uma família de glicoproteínas [41, 151], e isto implica que, provavelmente, as metilações presentes na GR estão diretamente relacionadas às glicosilações de MRJPs [150]. Além do mais, metilações ocorrem na maioria das MRJPs e essas modificações também podem ajudar a caracterizar a grande formação de micelas e a alta viscosidade encontrada na GR, podendo influenciar na auto-associação e adsorção derivada da hidrofobicidade [149, 150].

A deamidação em proteínas é um processo não enzimático que acontece em resíduos de asparaginas quando proteínas sofrem degradação [152]. Quando mapeamos os sítios de glicosilação da MRJP1, pesquisamos aqueles sítios onde ocorreram a deamidação e, para certificarmos de que essas modificações não eram decorrentes de um processo natural, utilizamos como controle os fragmentos trípticos da MRJP1 não submetidos ao processo de deglicosilação enzimática. Dois sítios de glicosilação foram encontrados nos resíduos 144 e 177 (**Tabela 1**), os quais já haviam sido descritos em predições teóricas e posteriormente

confirmados experimentalmente [153]. Além disso, reforçando os indícios de que tais sítios de deamidação são de fato sítios de N-glicosilação, os sinais desses dois peptídeos são os mais abundantes dentre todos os peptídeos com deamidações detectados na amostra enriquecida para glicopeptídeos e, conseqüentemente, geraram o maior número de PSMs identificados (**Tabela 1**).

Durante a realização das buscas de diferentes modificações pós-traducionais, várias delas foram encontradas, porém a maioria não apresentou um contexto biológico relevante, exceto três mutações. A mutação no resíduo 174, no qual ocorreu a substituição de uma valina por uma prolina, se faz especialmente interessante, pois, apesar de ambos serem hidrofóbicos, a prolina possui uma cadeia lateral atípica em relação aos demais aminoácidos. Sua cadeia lateral conecta-se à amida primária, fazendo que ocorra uma dobra na estrutura terciária da proteína onde haja prolina na cadeia polipeptídica. Isso possivelmente poderia alterar a estrutura tridimensional de MRJP1. As demais modificações observadas ocorreram possivelmente em decorrência do processo de preparo de amostra necessário para realização de experimentos *bottom-up* (**Figura 7**).

Em relação aos peptídeos não identificados por PSM (**Figura 6**), o peptídeo 2 foi identificado pelo PEAKS™, mas nenhuma modificação pós-traducional foi identificada nele. Um importante aspecto relacionado às proteínas da família MRJPs é que a maioria de seus componentes (MRJP1-9) possuem um peptídeo sinal na região N-terminal em sua sequência de aminoácidos, justificando a não detecção do peptídeo 1 marcado na **Figura 6**. Isso se justifica uma vez que as MRJPs possuem funções nutritivas na GR e são secretadas [45]. Ademais, assim como as *yellow proteins* [154], as MRJPs são glicoproteínas com cadeias de carboidratos N-ligados [151], os quais podem regular fatores envolvidos na sinalização extracelular [155].

Os dados encontrados por microscopia de força atômica mostraram a existência de duas principais populações. Experimentos com amostra nativa ainda são necessários para entender tal fenômeno. Mesmo 2-DE não poderia gerar alguma especulação a respeito uma vez que se trata de um experimento desnaturante. Como foi descrito nos resultados, experimentos de microscopia de força atômica foram realizados de modo que as amostras foram secas sobre uma superfície. Isso pode ter levado a agregação da proteína ou mesmo a um efeito falso positivo. Uma alternativa para contornar tal situação será utilizar outra estratégia da microscopia que permita análises de macromoléculas em solução. Dessa maneira, iremos prover uma situação mais próxima da realidade, uma vez MRJP1 já foi localizada no citoplasma e nos espaços intercelulares [42], locais característicos de possuírem

proteínas e eletrólitos em solução aquosa.

## 5. CONCLUSÃO

Experimentos preliminares de caracterizações estruturais da MRJP1 demonstraram a versatilidade e a complexidade desta glicoproteína. Observamos que as diferentes formas da MRJP1, quando submetidas a análises por 2DE, não são devidas a diferentes graus de glicosilação, uma vez que a realização desse mesmo ensaio com a proteína deglicosilada apresenta as mesmas proteoformas. Por espectrometria de massas, mapeamos dois sítios de glicosilação em MRJP1, localizados nos resíduos de aminoácidos 144 e 177. Além disso, três mutações foram identificadas nos resíduos 135, 149 e 174. Experimentos de microscopia de força atômica mostraram a prevalência de duas principais populações de MRJP1, variando entre 21 e 23 nm e 29,5 e 31,5 nm de altura.

Esses estudos preliminares forneceram valiosas informações para a continuidade deste trabalho. Na próxima etapa da tese, outras técnicas de espectrometria de massas, tais como HDX-MS e *top-down* nativo, associadas a outras técnicas bioquímicas e biofísicas nos permitirão aprofundar ainda mais no entendimento da estrutura, dinâmica e oligomerização de MRJP1.

Vale ressaltar que nenhuma proteína homóloga a esta está disponível em bancos de dados e, especificamente, nenhuma estrutura cristalográfica ainda foi resolvida com as MRJPs. A obtenção da estrutura 3D abrirá caminhos para resolução de outras proteínas, uma vez que modelagem por homologia estrutural é muito utilizada por aqueles que trabalham com macromoléculas biológicas.

---

**5. CHARACTERIZING THE STRUCTURE AND  
OLIGOMERIZATION OF  
MAJOR ROYAL JELLY PROTEIN 1 (MRJP1) BY  
MASS SPECTROMETRY AND COMPLEMENTARY  
BIOPHYSICAL TOOLS\***

---

\*Trabalho publicado no periódico Biochemistry como requisito para defesa da tese



## Characterizing the Structure and Oligomerization of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) by Mass Spectrometry and Complementary Biophysical Tools

Samuel C. Mandacaru,<sup>†,‡</sup> Luis H. F. do Vale,<sup>‡,§</sup> Siavash Vahidi,<sup>†</sup> Yiming Xiao,<sup>†</sup> Owen S. Skinner,<sup>§</sup> Carlos A. O. Ricart,<sup>‡</sup> Neil L. Kelleher,<sup>§</sup> Marcelo Valle de Sousa,<sup>\*,‡</sup> and Lars Konermann<sup>\*,†,§</sup>

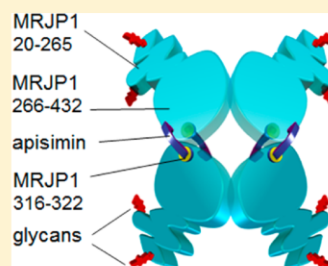
<sup>†</sup>Department of Chemistry, Western University, London, Ontario, Canada N6A 5B7

<sup>‡</sup>Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

<sup>§</sup>Proteomics Center of Excellence, Departments of Chemistry and Molecular Biosciences, Northwestern University, Evanston, Illinois 60611, United States

### Supporting Information

**ABSTRACT:** Royal jelly (RJ) triggers the development of female honeybee larvae into queens. This effect has been attributed to the presence of major royal jelly protein 1 (MRJP1) in RJ. MRJP1 isolated from royal jelly is tightly associated with apisimin, a 54-residue  $\alpha$ -helical peptide that promotes the noncovalent assembly of MRJP1 into multimers. No high-resolution structural data are available for these complexes, and their binding stoichiometry remains uncertain. We examined MRJP1/apisimin using a range of biophysical techniques. We also investigated the behavior of deglycosylated samples, as well as samples with reduced apisimin content. Our mass spectrometry (MS) data demonstrate that the native complexes predominantly exist in a (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) stoichiometry. Hydrogen/deuterium exchange MS reveals that MRJP1 within these complexes is extensively disordered in the range of residues 20–265. Marginally stable secondary structure (likely antiparallel  $\beta$ -sheet) exists around residues 266–432. These weakly structured regions interchange with conformers that are extensively unfolded, giving rise to bimodal (EX1) isotope distributions. We propose that the native complexes have a “dimer of dimers” quaternary structure in which MRJP1 chains are bridged by apisimin. Specifically, our data suggest that apisimin acts as a linker that forms hydrophobic contacts involving the MRJP1 segment <sup>316</sup>VLF<sup>322</sup>GLV<sup>322</sup>. Deglycosylation produces large soluble aggregates, highlighting the role of glycans as aggregation inhibitors. Samples with reduced apisimin content form dimeric complexes with a (MRJP1<sub>2</sub> apisimin<sub>1</sub>) stoichiometry. The information uncovered in this work will help pave the way toward a better understanding of the unique physiological role played by MRJP1 during queen differentiation.



Adult honeybees (*Apis mellifera*) form three castes. Females can develop into queen or worker bees, while males are known as drones.<sup>1,2</sup> Each colony has only a single queen that mates with drones and lays eggs. Worker bees are sterile but perform numerous tasks, including foraging for food and feeding of larvae.<sup>3</sup> The dimorphism of female bees is governed by the nutritional environment experienced by the larvae.<sup>4–7</sup> Future queens are fed royal jelly (RJ) throughout their development. Worker larvae receive RJ only for an initial period of 3 days, after which their food is switched to worker jelly.<sup>1,4</sup> Male larvae receive drone jelly. The various jellies differ in their protein composition, as well as their fructose:glucose ratio and vitamin content.<sup>8–10</sup>

RJ is secreted by the hypopharyngeal and mandibular glands of worker bees at an early stage of their life cycle, during which they are members of the nurse subcaste.<sup>10</sup> RJ contains proteins, carbohydrates, lipids, vitamins, salts, and free amino acids.<sup>11</sup> The so-called major royal jelly proteins (MRJPs) constitute roughly 90% of the total RJ protein.<sup>9</sup> This family comprises

nine homologous members, designated MRJP1–9.<sup>10,12,13</sup> The high percentage of essential amino acids in MRJPs underscores their nutritional role in bee larvae.<sup>9,14</sup>

The ability of RJ to modulate the development of female larvae may be partially related to the presence of histone deacetylase inhibitors,<sup>4</sup> microRNAs,<sup>3</sup> and other factors.<sup>10</sup> However, the key ingredient that drives queen development appears to be MRJP1, the most abundant protein in RJ.<sup>15</sup> Although the exact role of MRJP1 remains under dispute,<sup>16</sup> there is strong evidence that this protein triggers queen differentiation via an epidermal growth factor receptor (EGFR)-mediated signaling pathway.<sup>15,17</sup> MRJP1 also exhibits antibacterial effects,<sup>18</sup> as well as antihypertension<sup>19</sup> and growth factor-like activity in mammalian cells.<sup>10</sup>

Received: January 10, 2017

Revised: March 1, 2017

Published: March 2, 2017

MRJP1 is expressed as a chain consisting of 432 amino acids. Subsequent cleavage by a signal peptidase removes an N-terminal 19-residue segment,<sup>8</sup> resulting in a chain with an expected molecular weight (MW) of 46861 Da. During maturation, MRJP1 undergoes additional post-translational modifications.<sup>20</sup> Isoelectric focusing reveals the presence of nine MRJP1 isoforms that share a similar MW but have slightly different pIs between 4.7 and 5.2.<sup>21,22</sup> Differences in the nature and extent of post-translational modifications are thought to be chiefly responsible for this heterogeneity.<sup>9</sup>

Mature MRJP1 is a glycoprotein, and its glycans have been analyzed in great detail.<sup>23,24</sup> Sugars are bound mainly at N144 and N177, although other attachment sites also exist.<sup>24</sup> The glycans were shown to include a unique Gal $\beta$ 1–3GalNAc unit.<sup>23</sup> Deglycosylation by PNGase F causes a mass shift on sodium dodecyl sulfate (SDS) gels from an apparent MW of 56 kDa to an apparent MW of 47 kDa,<sup>25</sup> the latter being consistent with the amino acid sequence of the mature protein.<sup>9</sup>

When isolated from royal jelly, MRJP1 is copurified with the 54-residue (5.54 kDa)  $\alpha$ -helical peptide apisinin.<sup>26</sup> Apisinin promotes the association of MRJP1 into higher-order structures,<sup>11,26</sup> producing MRJP1/apisinin complexes that exhibit considerable thermal stability.<sup>22,27</sup> The composition of these complexes remains uncertain.<sup>10</sup> Electrophoretic densitometry suggested a 5:1 MRJP1:apisinin stoichiometry,<sup>11</sup> but other binding ratios could not be ruled out. Chromatographic, electrophoretic, and light scattering studies yielded size estimates of 280–420 kDa for these MRJP1/apisinin assemblies.<sup>11,22,26</sup> Binding is mediated solely by noncovalent interactions, as intermolecular disulfide bridges are absent.<sup>28</sup>

Structural investigations of MRJP1/apisinin complexes are a prerequisite for gaining a better understanding of the unique role that MRJP1 plays during queen development.<sup>15</sup> Unfortunately, it has not been possible thus far to generate high-resolution conformational data for this system.<sup>10</sup> In the work described here, we applied different mass spectrometry (MS) techniques and various other biophysical tools to close some of the existing knowledge gaps. Our primary goal was to elucidate aspects of the MRJP1/apisinin structure and dynamics under native conditions. In addition, we examined how the formation of higher-order complexes depends on the presence of apisinin (A) and glycan chains (G). We compared the behavior of native MRJP1 in the presence of apisinin (“A+”) and with glycans attached (“G+”) to that of samples that had undergone deglycosylation (“G–”) as well as partial apisinin removal (denoted as “A–”). The four types of samples generated in this way are denoted A+G+, A–G+, A–G–, and A+G–. Our data allow us to propose simple structural models for the complexes encountered under these different conditions.

## MATERIALS AND METHODS

**Sample Preparation.** Protein samples were prepared in 50 mM HEPES (pH 7.5), unless otherwise noted. The MRJP1/apisinin complex was purified as described previously,<sup>22</sup> resulting in stock solutions containing 50  $\mu$ M protein. A subset of these A+G+ samples was subjected to apisinin depletion. Size exclusion and ion exchange methods have previously been shown to be ineffective for separating apisinin from MRJP1, pointing to high-affinity noncovalent interactions.<sup>26</sup> The presence of intermolecular disulfide bonds can be ruled out because apisinin does not contain Cys residues.<sup>26</sup> We thus attempted to separate apisinin from MRJP1 by dialysis. Initial tests during which the MRJP1/apisinin complex was dialyzed

against native buffer or 7 M urea solutions did not result in any appreciable change in the apisinin:MRJP1 ratio, as judged by ESI-MS signal intensities after separation on a reversed phase column (BEH300 C4, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\times$  50 mm, Waters, Milford, MA). A more effective strategy for apisinin depletion was dialysis against dilute aqueous formic acid solutions at pH 2 for 14 days on ice [using molecular weight cutoff (MWCO) 20000 cassettes from Thermo, Waltham, MA]. This procedure reduced the apisinin:MRJP1 ratio by approximately 50% relative to that of the original A+G+ samples. The apisinin-depleted protein was exchanged back into nondenaturing HEPES at pH 7.5 and equilibrated for 24 h on ice prior to further analyses. The samples obtained in this way are denoted “A–G+”. MRJP1 deglycosylation (with or without apisinin depletion) was performed using PNGase F (Promega, Madison, WI),<sup>25</sup> producing deglycosylated samples A–G– and A+G–. Quantitative glycan removal was confirmed using SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).<sup>25</sup>

**Optical Spectroscopy.** CD data were recorded on a Jasco (Easton, MD) J-810 spectropolarimeter using a 1 mm optical path length. Protein-free blanks were subtracted from the reported data. Secondary structure analysis was performed using the Spectra Manager software package supplied by the instrument’s manufacturer. Fluorescence data were acquired using a Jasco FP-6500 spectrofluorimeter with an excitation wavelength of 285 nm.

**Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE).** For BN-PAGE,<sup>29,30</sup> protein samples were transferred into 50 mM bis-Tris-HCl buffer containing 15% (w/v) glycerol. Separation was performed on 5 to 18% (w/v) polyacrylamide gradient gels that were run at 15 mA and 4  $^{\circ}$ C for 4 h in an SE 600 electrophoresis system (Hofer, San Francisco, CA). The anode buffer consisted of 50 mM bis-Tris HCl, while the cathode buffer consisted of 50 mM Tricine, 15 mM bis-Tris, and 0.02% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad, Hercules, CA). Thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), lactate dehydrogenase (158 kDa), and bovine serum albumin (66 kDa) were used as calibrants. Apparent molecular weights ( $MW_{app}$ ) were determined from using distance of migration versus  $\log(MW)$  plots.<sup>29</sup>

**Native Top-Down Mass Spectrometry.** Native ESI-MS was performed as described previously<sup>31</sup> using a modified Orbitrap Q-Exactive instrument (Thermo Fisher, Bremen, Germany). Fragment ion spectra were calibrated internally and matched manually with a tolerance of 10 ppm using mMass.<sup>32</sup> MRJP1 samples were washed three times in a 100 mM neutral ammonium acetate solution, using Amicon filters with a MWCO 30000 membrane (Millipore, Darmstadt, Germany) prior to infusion. ESI was performed using a sheath-flow capillary electrophoresis device operated at a sprayer voltage of 1.5 kV.<sup>31,33</sup> ProSight PC 3.0 (Thermo Fisher) and ProSight Lite were used for data analysis.

**Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry.** MRJP1 samples (5  $\mu$ M) were mixed with D<sub>2</sub>O-based labeling buffer in a 1:9 volume ratio at 22  $^{\circ}$ C. Aliquots of 200  $\mu$ L were removed after 10 s, 1 min, 10 min, and 100 min and reactions quenched by adding an equal volume of an ice-cold solution containing 0.675 M guanidinium chloride, 1% formic acid, and 15  $\mu$ L of a 3 mg mL<sup>–1</sup> pepsin solution (final pH of 2.5). Offline pepsin digestion took place on ice for 1 min. The samples were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at –80  $^{\circ}$ C prior to analysis. The aliquots were then rapidly thawed to  $\sim$ 0  $^{\circ}$ C and manually injected into a nanoACQUITY UPLC instrument

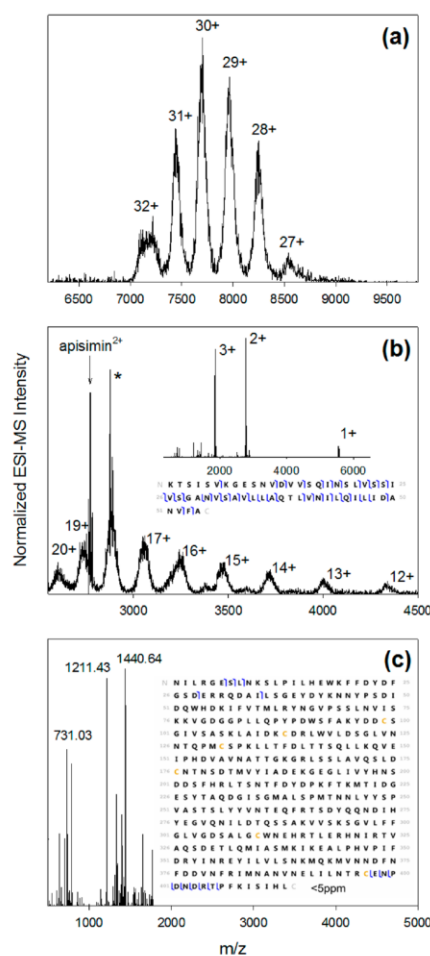
with HDX technology (Waters). Desalting and peptide separation were performed at 0 °C within 25 min on an equilibrated reversed phase column (BEH C8, 1.7  $\mu$ m particle size, 1 mm  $\times$  100 mm) using a water/acetonitrile gradient with 0.1% formic acid at a rate of 40  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Analysis was performed on a Waters Synapt G2 mass spectrometer. Zero-time controls ( $m_0$ ) for the correction of in-exchange were performed by exposing MRJP1 to quenching buffer, followed by D<sub>2</sub>O exposure, resulting in the same final solution composition that was seen for all other samples. Controls for fully exchanged MRJP1 ( $m_{100}$ ) for the correction of back exchange) were prepared by incubating 5  $\mu$ M MRJP1 in a labeling solution at pH 2.0 and 70 °C for 12 h. Normalized deuteration levels are reported as  $(m_t - m_0)/(m_{100} - m_0) \times 100\%$ , where  $m_t$  represents the centroid mass of the peptide of interest after HDX for time  $t$ . Extensive washing and blank injections were used between individual runs to prevent carryover, thereby eliminating false EX1 artifacts.<sup>34</sup> Peptide identification was performed using MS<sup>E</sup> and PLGS version 2.5.3 (Waters). HDX data were analyzed using DynamX version 3.0 (Waters). All experiments were conducted in triplicate.

Thirty-four peptic peptides could be consistently observed with adequate signal/noise (S/N) ratios across all four types of samples. The HDX/MS peptic digestion map is depicted in Figure S1, using the standard residue numbering of full-length MRJP1.<sup>9</sup> Only peptides that were observed under all four conditions are shown, providing a sequence coverage of 55%. This relatively low coverage is partially attributed to the presence of glycans in G+ samples, which precluded the detection of peptides in the vicinity of glycosylation sites N144 and N177.<sup>24</sup> Control experiments using trypsin yielded a sequence coverage of 64%, only slightly higher than that for pepsin (Figure S2). The sequence stretches covered by trypsin mapping resemble those detected after pepsin digestion. The limited sequence coverage seen with both proteases is consistent with the fact that MRJP1 experiences various post-translational modifications<sup>9,20</sup> in addition to glycosylation. Any such covalent modifications will interfere with peptide matching, which relies on comparisons with the cDNA-derived MRJP1 sequence.<sup>9</sup> Analyses of the apisimin HDX behavior were not possible because of the low signal intensity of the corresponding peptides.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Stoichiometry of Native MRJP1/Apisimin Complexes.

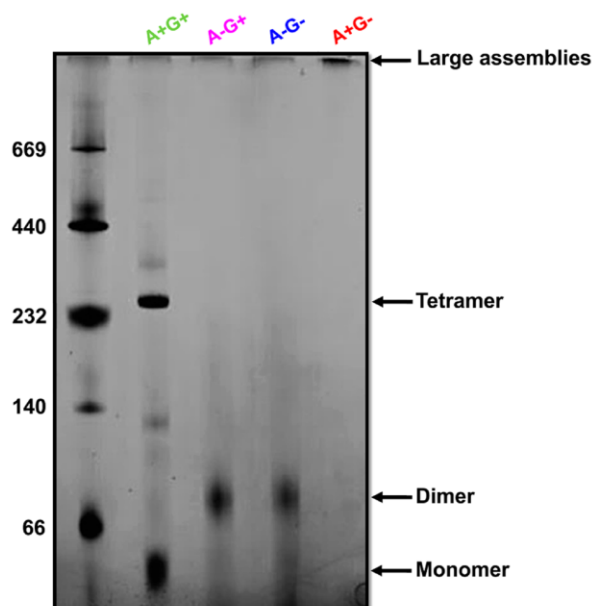
As a first step toward a comprehensive characterization of the MRJP1/apisimin system, we determined the composition of unmodified (A+G+) samples. Native ESI-MS<sup>35–38</sup> of A+G+ yielded a series of peaks, corresponding to MRJP1/apisimin complex ions with an average mass of 231.88 kDa and charge states of 27+ to 32+ (Figure 1a). Collisional activation of 30+ precursor ions released monomeric species with an average mass of 51.97 kDa and charge states of 12+ to 20+ (Figure 1b). This dissociation behavior is similar to asymmetric charge partitioning events seen for other complexes.<sup>35</sup> The spectrum in Figure 1b also shows an intense apisimin<sup>2+</sup> signal, consistent with the expected 5.54 kDa mass of the peptide. Activation of the intact complex ( $m/z$  7000–8000) in the HCD<sup>39</sup> cell yielded a remarkably clean spectrum with three dominant peaks corresponding to apisimin 1+ to 3+ (Figure 1b, inset). Pseudo-MS<sup>3</sup> was implemented by subjecting monomeric MRJP1<sup>12+</sup> to HCD, generating fragment ions that were matched to the expected sequence<sup>9</sup> (Figure 1c). The matched fragments



**Figure 1.** (a) Native ESI mass spectrum of the MRJP1/apisimin complex isolated from RJ (A+G+ sample). (b) Collisional activation of 30+ precursor ions releases highly charged MRJP monomers and apisimin. The peak marked with an asterisk corresponds to apisimin<sup>2+</sup> with an unidentified 222.15 Da adduct. The inset in panel b shows apisimin ions in charge states of 1+ to 3+, generated by collisional activation of the intact complex. (c) Deconvoluted top-down fragmentation spectrum of MRJP1<sup>12+</sup> precursor ions. The inset in panel c shows the graphical fragment map, with cleavage sites corresponding to N-terminal (b-type) ions and C-terminal (y-type) ions that could be matched to the protein sequence with a mass accuracy of <5 ppm. The fragmentation map of apisimin is included in the inset of panel b.

correspond to cleavages within the 35 N-terminal and 16 C-terminal residues, consistent with reports that glycosylation<sup>24</sup> and other post-translational modifications<sup>9</sup> affect only residues closer to the center of the sequence.





**Figure 2.** BN-PAGE analyses of protein–protein interactions. Lane 1 contained MW markers. Lanes 2–5 show data for MRJP1 samples A+G+, A–G+, A–G–, and A+G–, respectively.

The data depicted in Figure 1 unambiguously reveal the binding stoichiometry of the MRJP1/apisimin complexes in A+G+ samples. The measured mass (231.88 kDa) represents 4 times the measured MRJP1 mass plus 4 times the mass of apisimin ( $4 \times 51.97 \text{ kDa} + 4 \times 5.54 \text{ kDa} = 230.04 \text{ kDa}$ ). The slight difference between the two values (231.88 kDa vs 230.04 kDa) likely reflects the loss of weakly bound nonspecific adducts during collisional activation, as previously reported for other protein complexes.<sup>35</sup> Overall, we conclude that native A+G+ samples contain a substantial fraction of complexes with a (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) stoichiometry. The ESI-MS-derived mass is in reasonable agreement with estimates of ~290 kDa that had been obtained using light scattering.<sup>22</sup> We do not rule out the possibility that larger aggregates may form under mildly denaturing conditions (e.g., at pH 9), as reported previously.<sup>22,26</sup>

The measured monomer mass (51.97 kDa) significantly exceeds that expected from the MRJP1 amino acid sequence (46.86 kDa).<sup>9</sup> This 5.11 kDa difference is attributed largely to MRJP1 glycosylation.<sup>23–25</sup> Glycosylation usually causes mass heterogeneity,<sup>40,41</sup> consistent with the substantial width (full width at half-maximum of ~1 kDa) of the spectral signals in Figure 1b. Other post-translational modifications may contribute to MRJP1 mass heterogeneity, as well.<sup>9,20</sup>

In addition to (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>), native ESI-MS reveals the presence of monomeric MRJP1 in A+G+ samples (Figure S3). Unfortunately, detection biases and differences in ionization efficiency make it difficult to estimate the molar ratio of monomeric MRJP1 to (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) in solution from these ESI-MS data.<sup>38,42</sup>

**Effects of Glycan and Apisimin on the Quaternary Structure of MRJP1.** BN-PAGE is a complementary approach for monitoring biomolecular interactions. The association with Coomassie dye imparts negative charge to quasi-native proteins within the gel, allowing their electrophoretic separation while preserving interactions with binding partners.<sup>25,30</sup> BN-PAGE was particularly useful for interrogating the properties of MRJP1 samples after apisimin depletion (A–) and after glycosylation (G–), because it was difficult to generate high-quality native ESI mass spectra (not shown) under those conditions. Hence, we applied BN-PAGE to MRJP1 samples of the type A+G+, A–G+, A–G–, as well as A+G– (Figure 2).

A+G+ samples exhibit an intense band at a  $MW_{app}$  of ~287 kDa corresponding to the native (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) complex. In addition, these samples show monomeric protein at a  $MW_{app}$  of ~55 kDa. These data are in agreement with the native ESI-MS data depicted in Figure 1.

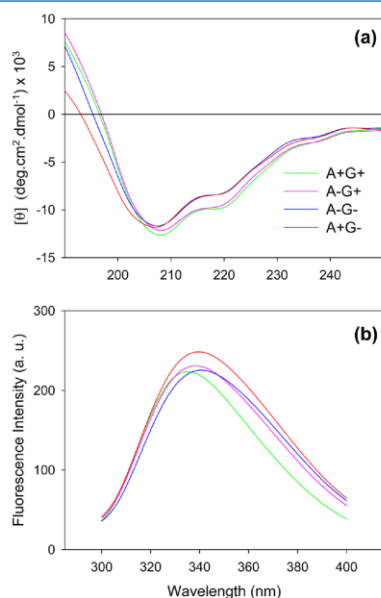
A–G+ and A–G– samples both exhibit BN-PAGE bands at a  $MW_{app}$  of ~86 kDa. To interpret these bands, we recall two points that became apparent during sample preparation (as noted above). (i) Apisimin exhibits a very high binding affinity for MRJP1.<sup>26</sup> (ii) As a result of this high affinity, apisimin depletion in our “A–” samples was incomplete. The apisimin:MRJP1 ratio of these preparations was reduced by ~50% compared to that of the original A+G+ samples. Accordingly, it seems likely that the  $MW_{app} \approx 86 \text{ kDa}$  bands predominantly correspond to (MRJP1<sub>2</sub> apisimin<sub>1</sub>) assemblies. The measured  $MW_{app}$  is lower than expected for such 2:1 complexes (theoretical MWs of 109.5 kDa for A–G+ and 99.3 kDa for A–G–). However, such deviations are quite common

in BN-PAGE, where exposed hydrophobic areas can favor excessive Coomassie binding. Such conditions cause elevated electrophoretic mobilities that give rise to abnormally low  $MW_{app}$  values.<sup>43</sup> A+G- samples form large assemblies that cannot migrate into the gel (last lane in Figure 2).

In summary, the combination of native ESI-MS and BN-PAGE yields a consistent picture of the binding stoichiometries for the different types of samples studied here. A+G+ samples contain (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) complexes, as well as MRJP1 monomers. A-G+ and A-G- conditions give rise to the formation of (MRJP1<sub>2</sub> apisimin<sub>1</sub>) complexes. The prevalence of dimeric MRJP1 assemblies in these perturbed samples suggests that native (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) possesses a "dimer of dimers" architecture. A similar situation is encountered for many other tetrameric proteins, where two pairs of tightly bound chains come together to form the overall complex.<sup>44–46</sup> Large assemblies of the type (MRJP1<sub>m</sub> apisimin<sub>n</sub>), where  $m \gg 4$  and  $n \gg 4$ , are encountered for A+G- samples.

Our data support the view<sup>11,26</sup> that apisimin promotes the noncovalent association of MRJP1. Apisimin depletion shifts the binding stoichiometry from species containing four MRJP1 chains to assemblies that contain only two MRJP1 chains (Figure 2). After deglycosylation, the presence of apisimin triggers the formation of large aggregates [A+G- (Figure 2)]. The fact that these large assemblies form only after glycan removal points to the role of glycans as aggregation inhibitors, in line with reports for other proteins.<sup>47–49</sup>

**Characterization by Optical Spectroscopy.** Far-UV CD spectra provide insights into secondary structure<sup>50</sup> (Figure 3a). A+G+ samples exhibited a main minimum at 208 nm.



**Figure 3.** (a) Far-UV CD spectra and (b) Trp fluorescence emission spectra of the four types of MRJP1 samples.

Deconvolution of this spectrum suggests 47% antiparallel  $\beta$ -sheet and 28% random coil, with the remainder being due to  $\alpha$ -helices, parallel  $\beta$ -sheet, and  $\beta$ -turns. Apisimin depletion and/or deglycosylation caused only minor changes in the CD spectra. A+G- samples displayed a small shift in the position of the CD minimum from 208 to 207 nm, suggesting a 5% reduction in antiparallel  $\beta$ -sheet content and a subtle (2%) increase in random coil character. While these percentages represent only semiquantitative estimates,<sup>51,52</sup> Figure 3a nonetheless indicates that MRJP1 exhibits a relatively high degree of disorder under all conditions studied.

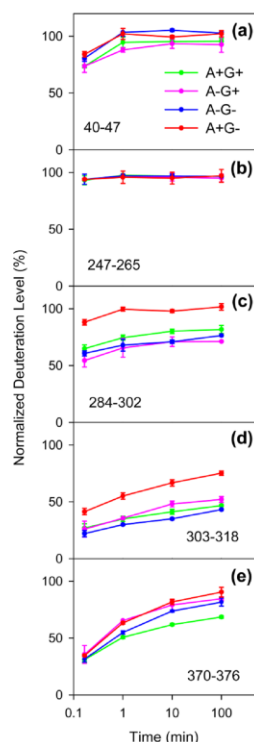
MRJP1 possesses five Trp residues. The Trp emission maximum for A+G+ was at 335 nm (Figure 3b). The other three types of samples showed spectra that were slightly red-shifted, with maxima of 338 nm (A-G+), 341 nm (A-G-), and 340 nm (A+G-). These UV emission properties report on the environment of Trp side chains.<sup>53</sup> The observed spectral shifts relative to A+G+ indicate structural changes from a hydrophobically buried environment to a conformation in which Trp side chains become slightly more solvent accessible.<sup>54,55</sup> Thus, some hydrophobic contacts that exist in native MRJP1 (A+G+) become disrupted after apisimin depletion and/or deglycosylation.

The spectroscopic data of Figure 3 also provide insights into the nature of the large (MRJP1<sub>m</sub> apisimin<sub>n</sub>) assemblies formed under A+G- conditions. The CD and fluorescence signatures of these species remain quite similar to those seen for the other sample types. This behavior reflects the fact that the A+G- assemblies do not precipitate. Insoluble precipitates would show spectra with greatly reduced signal amplitudes and diminished S/N ratios.<sup>56,57</sup> In other words, our data imply that A+G- conditions produce soluble aggregates, resembling the behavior seen for several other proteins under mildly denaturing conditions.<sup>58,59</sup>

**Hydrogen/Deuterium Exchange.** HDX/MS is a sensitive tool for examining how protein structure and dynamics respond to changes in biomolecular interactions or other external factors.<sup>45,60–62</sup> HDX/MS measures the mass increase that results from the deuteration of backbone NH groups in D<sub>2</sub>O-based labeling buffer. At near-neutral pH, disordered segments undergo exchange with rate constants ( $k_{ex}$ ) on the order of  $\approx 1$  s<sup>-1</sup>.<sup>63–65</sup> HDX rates are greatly reduced in well-structured regions that are stabilized by backbone hydrogen bonds. These folded regions usually undergo deuteration in the EX2 regime, which is characterized by isotope envelopes that gradually shift toward higher masses. EX2 behavior is indicative of opening/closing transitions that take place on a time scale much faster than 1 s<sup>-1</sup>.<sup>63</sup> Conversely, correlated opening/closing events much slower than 1 s<sup>-1</sup> give rise to bimodal isotope distributions (commonly termed EX1 exchange).<sup>61,66,67</sup>

Representative HDX kinetic plots are depicted in Figure 4 (see Figure S4 for the complete data set). Most peptides exhibit deuteration levels greater than 50% already at the earliest labeling time point of 10 s. After 100 min, all peptides approach complete deuteration. This is in contrast to the behavior of many other proteins, which possess well-folded regions that are highly protected against HDX.<sup>45,68,69</sup> The across-the-board rapid deuteration seen here for MRJP1 under the various experimental conditions is reminiscent of data previously reported for intrinsically disordered proteins.<sup>64,65,70,71</sup>

To compare the properties of A+G+, A-G+, A-G-, and A+G- in a comprehensive fashion, we will focus on deuteration levels for  $t = 1$  min (Figure 5a–d). The deuteration patterns of



**Figure 4.** Kinetics of deuteration measured for various representative segments for the four types of MRJP1 samples. Each data point is the average of three independent measurements; error bars represent standard deviations.

the four samples show many similarities. With a fully deuterated N-terminal region as a starting point, the HDX levels decline to values of ~60% for segment 69–77, suggesting some weak hydrogen bonding in this region, possibly in combination with sequestration of NH groups in the protein interior. Between residues 91 and 265, MRJP1 is highly disordered with deuteration values close to 100% for A+G+, A–G–, and A+G–, while slight protection is seen in this range for A–G+ (Figure 5b). Protection is most pronounced for all four samples beyond residue 265, with many deuteration values between 25 and 75%. We conclude that the C-terminal region comprising residues 266–432, while still being quite dynamic, is the most structured part of MRJP1.

The subtle HDX changes caused by apisimin depletion and deglycosylation are best visualized by resorting to difference plots, using the A+G+ data as a reference. Negative values for A–G+ in the range of residues 202–302 reveal that A–G+ is slightly more protected in this region than A+G+ is (Figure 5e). The HDX properties of A–G– are quite similar to those of A+G+, which is evident from difference values close to zero throughout the entire sequence range (Figure 5f). The largest changes are seen for A+G–, where the C-terminal region of

residues 266–369 exhibits deuteration levels significantly elevated compared to those of A+G+ (Figure 5g).

To gain additional insights into the weak HDX protection observed under the four conditions, it is instructive to look at unprocessed mass spectra. Remarkably, all MRJP1 regions that showed incomplete deuteration exhibited bimodal isotope distributions, implying that HDX proceeds in the EX1 regime for all four conditions (Figure 6).<sup>61,66,67</sup> Already after 10 s, the EX1 distributions showed a well-developed high-mass component, with an amplitude on the order of 30–60% for most peptides. This behavior reveals that all of the MRJP1/ apisimin samples exist as partially structured species that are in equilibrium with conformers that are more unfolded. In addition, the reversible dissociation of higher-order structures into smaller building blocks (e.g., tetramer ↔ monomer transitions in the case of A+G+) could contribute to the observed EX1 behavior. The level of EX1 low-mass components diminished over time but remained detectable even after 100 min. These slow kinetics imply that the interconversion of partially structured species with more unfolded conformers takes place on a time scale of several hours.<sup>61,66,67</sup>

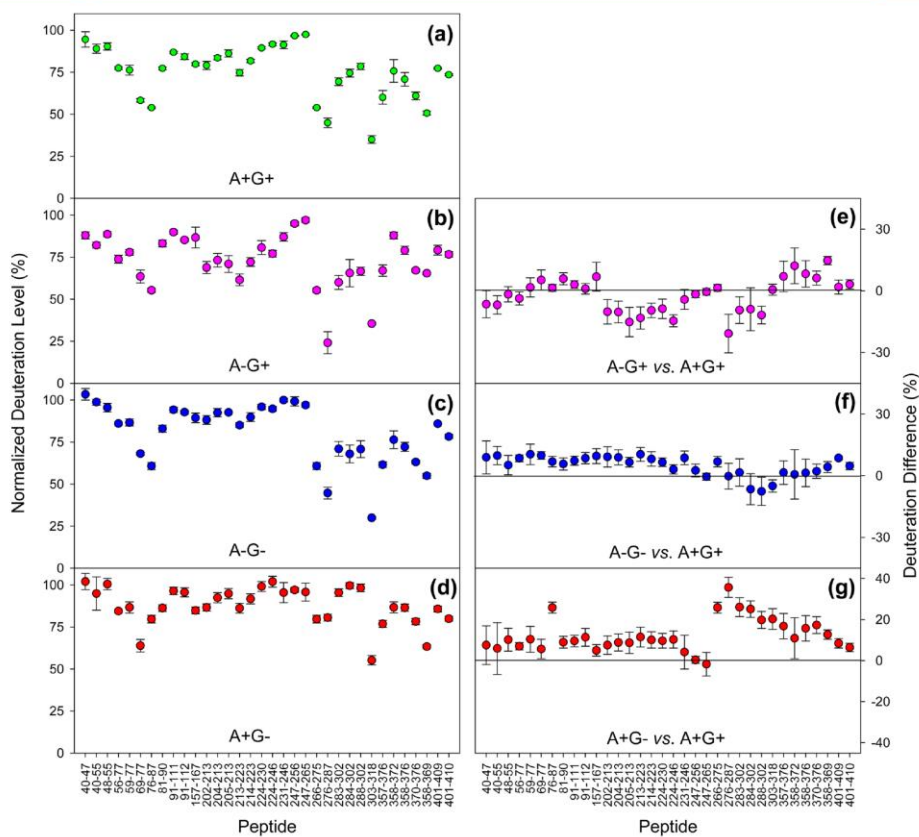
**Hydrophathy Analysis.** Most water-soluble proteins fold into structures in which nonpolar side chains are buried in the core, while hydrophilic residues remain solvent accessible.<sup>72,73</sup> Our data demonstrate that MRJP1/ apisimin complexes are quite disordered, without a well-developed core. However, it is known that even for such disordered proteins some clustering of nonpolar residues can take place, specifically in regions that are involved in intermolecular contacts.<sup>74,75</sup>

To identify possible MRJP1 regions that might show nonpolar clustering, we conducted a Kyte–Doolittle analysis,<sup>76</sup> using the standard scale that ranges from –4.5 for Arg as the most hydrophilic residue to +4.5 for Ile as the most hydrophobic. The average hydrophathy of MRJP1 is  $-0.44 \pm 1$ , reflecting the low percentage of nonpolar residues in this protein. The <sup>316</sup>VLFFGLV<sup>322</sup> segment stands out as the most hydrophobic region, which is evident from the prominent spike centered at residue 319 in Figure 7a. Interestingly, this region is most protected against deuteration in unmodified MRJP1 (Figures 4d and 5a). As in the case of other disordered proteins,<sup>74,75</sup> MRJP1 therefore contains at least one hydrophobic region that is relatively structured.

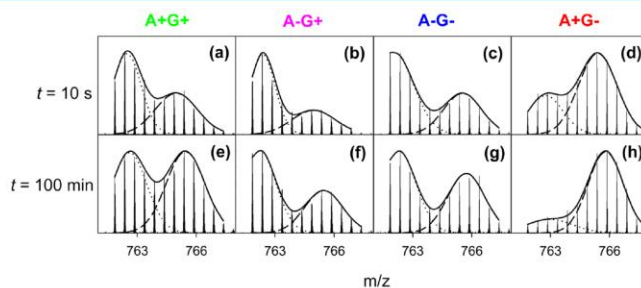
In contrast to MRJP1, apisimin is quite hydrophobic with an average hydrophathy of  $0.95 \pm 0.9$  (Figure 7b). This nonpolar character is particularly pronounced for the C-terminal half of the peptide (<sup>25</sup>IVS...VFA<sup>34</sup>) that has a hydrophathy of  $1.4 \pm 0.5$ .

**Implications for the Native MRJP1/Apisimin Complex.** The establishment of nonpolar contacts generally represents the dominant driving force for the formation of protein–protein interactions.<sup>77,78</sup> This is particularly the case for intrinsically disordered proteins, in which the corresponding nonpolar regions tend to be among the most structured elements.<sup>74,75</sup> Accordingly, the MRJP1 <sup>316</sup>VLFFGLV<sup>322</sup> region is a prime candidate for the formation of intermolecular contacts because this segment exhibits the highest hydrophobicity (Figure 7a). The <sup>316</sup>VLFFGLV<sup>322</sup> region was not completely covered in our HDX experiments. However, the partially overlapping segment 303–318 showed the strongest protection in MRJP1 (Figures 4d and 5a), supporting the view that this region is a key binding element.

Our data (Figure 2) as well as earlier work<sup>11,26</sup> demonstrate that the association of MRJP1 complexes is mediated by

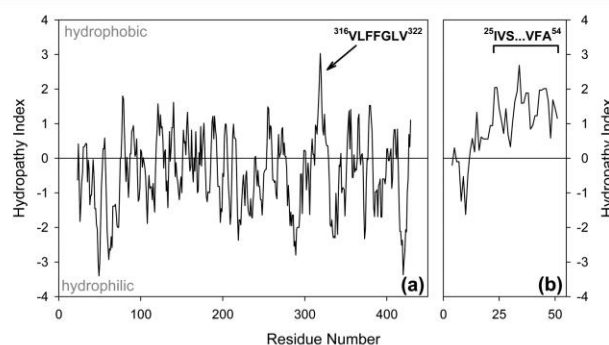


**Figure 5.** Deuteration levels measured for MRJP1 peptides after HDX for 1 min. Data for the four different conditions are indicated in panels a–d. Panels on the right-hand side show difference plots relative to the A+G+ data: (e) A–G+ minus A+G+, (f) A–G– minus A+G+, and (g) A+G– minus A+G+.

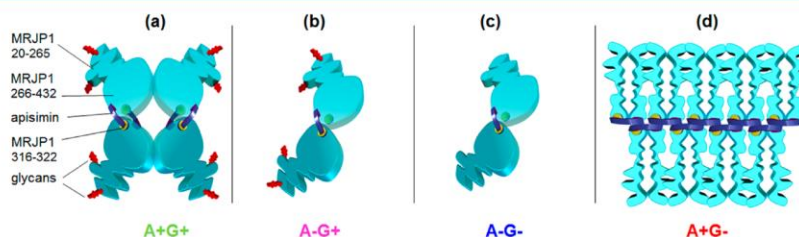


**Figure 6.** Measured isotope distributions of MRJP1 segment 276–287 after deuteration for 10 s (a–d), and 100 min (e–h). The four columns of this figure are for the different types of samples, as indicated along the top. Also shown in each panel are Gaussian decompositions of the bimodal isotope distributions. Additional peptide data are shown in Figure S5.





**Figure 7.** Kyte–Doolittle hydropathy analyses of (a) MRJP1 and (b) apisimin, generated using <http://web.expasy.org/protscale> with a seven-residue averaging window and linear weighting. Key hydrophobic segments proposed to be involved in intermolecular contacts are highlighted.



**Figure 8.** Cartoon models of MRJP1/apisimin complexes. (a) A+G+ conditions favor (MRJP1<sub>4</sub> apisinin<sub>4</sub>) assemblies; apisinin acts as a hydrophobic linker that connects the relatively structured MRJP1 C-terminal regions. The N-terminal regions are disordered. Apisinin-depleted samples (b) A-G+ and (c) A-G- form (MRJP1<sub>2</sub> apisinin<sub>1</sub>) complexes. (d) A+G- samples undergo apisinin-mediated formation of soluble aggregates. MRJP1 is colored light blue. Apisinin is colored dark purple. Glycans at N144 and N177 are colored red. The hydrophobic MRJP1 segment of residues 316–322 is colored yellow.

apisimin. The native ESI-MS data of Figure 1 uncovered the fact that these complexes possess a (MRJP1<sub>4</sub> apisinin<sub>4</sub>) stoichiometry, suggesting that apisinin acts as linker that binds MRJP1 monomers together. The hydrophobic nature of apisinin (Figure 7b) implies that these linkages are dominated by nonpolar contacts. It seems likely that linkages within the native (MRJP1<sub>4</sub> apisinin<sub>4</sub>) complex involve nonpolar contacts between the C-terminal half of apisinin (<sup>25</sup>IVS...VFA<sup>54</sup>) and the MRJP1 <sup>316</sup>VLF FGLV<sup>322</sup> segment (Figure 7).

## CONCLUSIONS

Previous efforts to generate high-resolution structural data for MRJP1 were unsuccessful. In the study presented here, we applied a range of biophysical techniques, each of which provides insights into specific aspects of protein conformations and interactions. The information obtained allows us to propose simple structural models of MRJP1/apisimin complexes that are encountered for the four types of samples studied here. All of the species (A+G+, A-G+, A-G-, and A+G-) are relatively disordered, and they undergo slow (EX1) interconversion with coexisting species that are even more unfolded.

Native A+G+ conditions favor the presence of (MRJP1<sub>4</sub> apisinin<sub>4</sub>) complexes (Figure 8a). The MRJP1 chains within these complexes are largely unstructured in the range of residues 20–265; this includes glycan attachment sites N144

and N177. Residues 266–432 adopt a marginally stable fold that may be organized in an antiparallel  $\beta$ -sheet conformation, as suggested by the CD data of Figure 3. The <sup>316</sup>VLF FGLV<sup>322</sup> hydrophobic segment is among the most structured segments. Apisinin acts as an  $\alpha$ -helical linker that binds the MRJP1 chains together. A key element of these interactions are nonpolar contacts between <sup>316</sup>VLF FGLV<sup>322</sup> and the hydrophobic C-terminal portion of apisinin (<sup>25</sup>IVS...VFA<sup>54</sup>). In addition, direct contacts between adjacent MRJP1 chains cannot be ruled out. The four MRJP1 molecules are assembled in a “dimer of dimers” architecture, implying the presence of two tight subunit–subunit interfaces and two loose interfaces (corresponding to the horizontal and vertical contacts in Figure 8a, respectively). The relatively low ESI charge states formed in the native solution (Figure 1a) indicate that despite their disorder, the overall structure of the (MRJP1<sub>4</sub> apisinin<sub>4</sub>) complexes is quite compact.<sup>79</sup>

In A-G+ and A-G- samples, the apisinin concentration is reduced by roughly 50% relative to those of the A+G+ preparations. Linker depletion causes dissociation of (MRJP1<sub>4</sub> apisinin<sub>4</sub>) into (MRJP1<sub>2</sub> apisinin<sub>1</sub>) subcomplexes, as indicated in panels b and c of Figure 8. This dissociation causes only minor changes in the overall conformational properties of the MRJP1 chains. However, Trp side chains become more solvent accessible, and newly exposed interfaces cause excessive



Coomassie dye binding, consistent with the disruption of protein–protein contacts.

The glycan chains at residues N144 and N177 play a role in controlling the degree to which apisimin can cause association of MRJP1 into larger aggregates. For other proteins, it has been demonstrated that glycans can inhibit aggregation, because steric clashes of the heavily hydrated sugar chains interfere with self-association of the protein.<sup>47–49</sup> In the case of MRJP1, deglycosylation results in apisimin-mediated association into large soluble assemblies of the type (MRJP1<sub>m</sub> apisimin<sub>n</sub>) where  $m \gg 4$  and  $n \gg 4$ . These A+G– conditions destabilize previously existing backbone hydrogen bonds in the range of residues 266–432 (Figure 8d).

From the proposed structural models of Figure 8, uncovering the exact mechanism by which MRJP1 might tap into EGFR-mediated events that trigger the development of bee larvae into queens still requires a great deal of work.<sup>15–17</sup> With the nutritional role of MRJP1 in mind,<sup>9,14</sup> the semiunfolded nature of (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) complexes in RJ may be important for ensuring efficient hydrolysis by proteases in the larval digestive tract.<sup>80</sup> Interestingly, proteomic analyses have uncovered significant differences in the makeup of the gastrointestinal enzymes of queens relative to that of worker bees and drones.<sup>81</sup> It seems likely that queen development is not triggered by the intact (MRJP1<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) complexes per se, but by proteolytic products that are generated in the digestive tract and absorbed into the hemolymph.

Considering the disordered nature of native MRJP1/apisimin complexes, it is not surprising that crystallization efforts (in M.V.d.S.'s laboratory, unpublished observations) were unsuccessful. In previous work on other proteins, HDX/MS was applied to pinpoint regions of disorder, thereby allowing the design of “disorder-depleted” constructs that then yielded high-quality crystals.<sup>82</sup> Our HDX/MS experiments identify residues 20–265 as the most disordered region within native MRJP1/apisimin assemblies. In future studies, it will be interesting to perform crystallization trials on constructs where this N-terminal part of MRJP1 has been deleted. Our data predict that such constructs should still be able to form tetrameric assemblies with apisimin (Figure 8a), because we believe the apisimin binding site to be in the vicinity of residue 320.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00020.

Peptic digestion map of MRJP1 (Figure S1), tryptic digestion map of MRJP1 (Figure S2), full native MS spectrum of the MRJP1/apisimin complex (Figure S3), summary of MRJP1 HDX/MS kinetics (Figure S4), and EX1 isotope distributions of selected peptides (Figure S5) (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*E-mail: mvsousa@unb.br.

\*E-mail: konerman@uwu.ca.

### ORCID

Neil L. Kelleher: 0000-0002-8815-3372

Lars Konermann: 0000-0002-5283-3165

## Funding

Funding was provided by Grants 479260/2010-9, 483191/2013-2, and 309338/2013-1 from the Brazilian Research Council and 0439/11 CT-INFRA-PROINFRA 02/2010 from Financiadora de Estudos e Projetos to M.V.d.S. Additional funding was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (DG 217080-2013 to L.K.) and by the National Institute on Drug Abuse (P30-DA018310 to N.L.K.). S.C.M. is recipient of a stipend from CAPES (99999.004417/2014-03). L.H.F.d.V. was supported by CNPq Research Grant 400301/2014-8 from the Brazilian government. O.S.S. was funded by National Science Foundation Graduate Research Fellowship 2014171659.

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ABBREVIATIONS

BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis; CD, circular dichroism; EGFR, epidermal growth factor receptor; ESI, electrospray ionization; HDX, hydrogen/deuterium ( $H^1/H^2$ ) exchange; MS, mass spectrometry; MW<sub>app</sub>, apparent molecular weight from gel electrophoresis; PNGase F, peptide:N-glycosidase F.

## ■ REFERENCES

- (1) Haydak, M. H. (1970) Honey Bee Nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* 15, 143–156.
- (2) Patel, N. G., Haydak, M. H., and Gochner, T. A. (1960) Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. *Nature* 186, 633–634.
- (3) Guo, X. Q., Su, S. K., Skogerboe, G., Dai, S. A. J., Li, W. F., Li, Z. G., Liu, F., Ni, R. F., Guo, Y., Chen, S. L., Zhang, S. W., and Chen, R. S. (2013) Recipe for a Busy Bee: MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination. *PLoS One* 8, e81661.
- (4) Spannhoff, A., Kim, Y. K., Raynal, N. J. M., Gharibyan, V., Su, M. B., Zhou, Y. Y., Li, J., Castellano, S., Sbardella, G., Issa, J. P. J., and Bedford, M. T. (2011) Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO Rep.* 12, 238–243.
- (5) Weinstock, G. M., et al. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949.
- (6) Shuel, R. W., and Dixon, S. E. (1960) The early establishment of dimorphism in the female honeybee, *Apis mellifera* L. *Insectes Soc.* 7, 265–282.
- (7) Wang, Y., and Li-Byarlay, H. (2015) Physiological and Molecular Mechanisms of Nutrition in Honey Bees. In *Advances in Insect Physiology* (Jurenka, R., Ed.) pp 25–58, Academic Press Ltd.-Elsevier Science Ltd., London.
- (8) Brouwers, E. V. M., Ebert, R., and Beetsma, J. (1987) Behavioral and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *J. Apic. Res.* 26 (26), 11–23.
- (9) Schmitzova, J., Kludiny, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J., and Simuth, J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1020–1030.
- (10) Buttstedt, A., Moritz, R. F. A., and Erler, S. (2014) Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological Reviews* 89, 255–269.
- (11) Tamura, S., Amano, S., Kono, T., Kondoh, J., Yamaguchi, K., Kobayashi, S., Ayabe, T., and Moriyama, T. (2009) Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer. *Proteomics* 9, 5534–5543.
- (12) Albert, T., and Kludiny, J. (2004) The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. *J. Insect Physiol.* 50, 51–59.

- (13) Schonleben, S., Sickmann, A., Mueller, M. J., and Reinders, J. (2007) Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1087–1093.
- (14) Furusawa, T., Rakwal, R., Nam, H. W., Shibato, J., Agrawal, G. K., Kim, Y. S., Ogawa, Y., Yoshida, Y., Kouzuma, Y., Masuo, Y., and Yonekura, M. (2008) Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one- and two-dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/glycoproteins. *J. Proteome Res.* 7, 3194–3229.
- (15) Kamakura, M. (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473, 478–483.
- (16) Buttstedt, A., Ihling, C. H., Pietzsch, M., and Moritz, R. F. A. (2016) Royalactin is not a royal making of a queen. *Nature* 537, E10–E12.
- (17) Kamakura, M. (2016) Royalactin is not a royal making of a queen Reply. *Nature* 537, E13–E13.
- (18) Brudzynski, K., Sjaarda, C., and Lannigan, R. (2015) MRJP1-containing glycoproteins isolated from honey, a novel antibacterial drug candidate with broad spectrum activity against multi-drug resistant clinical isolates. *Front. Microbiol.* 6, 711.
- (19) Fan, P., Han, B., Fang, M., Fang, Y., Zhang, L., Hu, H., Hao, Y., Qi, Y. P., Zhang, X. Z., and Li, J. K. (2016) Functional and Proteomic Investigations Reveal Major Royal Jelly Protein 1 Associated with Anti-hypertension Activity in Mouse Vascular Smooth Muscle Cells. *Sci. Rep.* 6, 30230.
- (20) Han, B., Fang, Y., Feng, M., Lu, X. S., Huo, X. M., Meng, L. F., Wu, B., and Li, J. K. (2014) In-Depth Phosphoproteomic Analysis of Royal Jelly Derived from Western and Eastern Honeybee Species. *J. Proteome Res.* 13, 5928–5943.
- (21) Hanes, J., and Simuth, J. (1992) Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey-bee (*Apis mellifera* L.). *J. Apic. Res.* 31, 22–26.
- (22) Cruz, G. C. N., Garcia, L., Silva, A. J., Barbosa, J., Ricart, C. A. O., Freitas, S. M., and Sousa, M. V. (2011) Calcium effect and pH-dependence on self-association and structural stability of the *Apis mellifera* major royal jelly protein 1. *Apidologie* 42, 252–269.
- (23) Kimura, Y., Nagai, H., Miyamoto, M., Kimura, M., and Yonekura, M. (2010) Identification of a Royal Jelly Glycoprotein That Carries Unique Complex-Type N-Glycans Harboring the T-Antigen (Gal beta 1–3GalNAc) Unit. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 74, 2148–2150.
- (24) Feng, M., Fang, Y., Han, B., Xu, X., Fan, P., Hao, Y., Qi, Y. P., Hu, H., Huo, X. M., Meng, L. F., Wu, B., and Li, J. K. (2015) In-Depth N-Glycosylation Reveals Species-Specific Modifications and Functions of the Royal Jelly Protein from Western (*Apis mellifera*) and Eastern Honeybees (*Apis cerana*). *J. Proteome Res.* 14, 5327–5340.
- (25) Ohashi, K., Natori, S., and Kubo, T. (1997) Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Eur. J. Biochem.* 249, 797–802.
- (26) Bilikova, K., Hanes, J., Nordhoff, E., Saenger, W., Klaudiny, J., and Simuth, J. (2002) Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Lett.* 528, 125–129.
- (27) Moriyama, T., Ito, A., Omote, S., Miura, Y., and Tsumoto, H. (2015) Heat Resistant Characteristics of Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) Oligomer. *PLoS One* 10, e0119169.
- (28) Tamura, S., Kono, T., Harada, C., Yamaguchi, K., and Moriyama, T. (2009) Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis mellifera*. *Food Chem.* 114, 1491–1497.
- (29) Schagger, H., Cramer, W. A., and Vonjagow, G. (1994) Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220–230.
- (30) Wittig, I., Braun, H.-P., and Schagger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 418–428.
- (31) Skinner, O. S., Do Vale, L. H. F., Catherman, A. D., Havugimana, P. C., Sousa, M. V. d., Compton, P. D., and Kelleher, N. L. (2015) Native GELFrEE: A New Separation Technique for Biomolecular Assemblies. *Anal. Chem.* 87, 3032–3038.
- (32) Strohalm, M., Kavan, D., Novak, P., Volny, M., and Havlicek, V. (2010) mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Anal. Chem.* 82, 4648–4651.
- (33) Wojcik, R., Dada, O. O., Sadilek, M., and Dovichi, N. J. (2010) Simplified capillary electrophoresis nanospray sheath-flow interface for high efficiency and sensitive peptide analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2554–2560.
- (34) Fang, J., Rand, K. D., Beuning, P. J., and Engen, J. R. (2011) False EX1 signatures caused by sample carryover during HX MS analyses. *Int. J. Mass Spectrom.* 302, 19–25.
- (35) Benesch, J. L. P., Ruotolo, B. T., Simmons, D. A., and Robinson, C. V. (2007) Protein Complexes in the Gas Phase: Technology for Structural Genomics and Proteomics. *Chem. Rev.* 107, 3544–3567.
- (36) Kaddis, C. S., and Loo, J. A. (2007) Native Protein MS and Ion Mobility: Large Flying Proteins with ESI. *Anal. Chem.* 79, 1778–1784.
- (37) Snijder, J., and Heck, A. J. R. (2014) Analytical Approaches for Size and Mass Analysis of Large Protein Assemblies. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 7, 43–64.
- (38) Kitova, E. N., El-Hawiet, A., Schnier, P. D., and Klassen, J. S. (2012) Reliable Determinations of Protein–Ligand Interactions by Direct ESI-MS Measurements. Are We There Yet? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23, 431–441.
- (39) Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., and Mann, M. (2007) Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Methods* 4, 709–712.
- (40) Nicolardi, S., Deelder, A. M., Palmblad, M., and van der Burgt, Y. E. M. (2014) Structural Analysis of an Intact Monoclonal Antibody by Online Electrochemical Reduction of Disulfide Bonds and Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 86, 5376–5382.
- (41) Shaw, J. B., Lin, T.-Y., Leach, F. E., III, Tolmachev, A. V., Tolić, N., Robinson, E. W., Koppenaal, D. W., and Paša-Tolić, L. (2016) 21 T Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer Greatly Expands Mass Spectrometry Toolbox. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27, 1929–1936.
- (42) Kuprowski, M. C., and Konermann, L. (2007) Signal Response of Co-Existing Protein Conformers in Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 2499–2506.
- (43) Crichton, P. G., Harding, M., Ruprecht, J. J., Lee, Y., and Kunji, E. R. S. (2013) Lipid, Detergent, and Coomassie Blue G-250 Affect the Migration of Small Membrane Proteins in Blue Native Gels. *J. Biol. Chem.* 288, 22163–22173.
- (44) Griffith, W. P., and Kaltashov, I. A. (2003) Highly asymmetric interactions between globin chains during hemoglobin assembly revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* 42, 10024–10033.
- (45) Sowole, M. A., Simpson, S. A., Skovpen, Y. V., Palmer, D. R. J., and Konermann, L. (2016) Evidence of Allosteric Enzyme Regulation via Changes in Conformational Dynamics: A Hydrogen/Deuterium Exchange Investigation of Dihydrodipicolinate Synthase. *Biochemistry* 55, 5413–5422.
- (46) Andreas, L. B., Reese, M., Eddy, M. T., Gelev, V., Ni, Q. Z., Miller, E. A., Emsley, L., Pintacuda, G., Chou, J. J., and Griffin, R. G. (2015) Structure and Mechanism of the Influenza A M2(18–60) Dimer of Dimers. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 14877–14886.
- (47) Rajan, R. S., Li, T. S., Aras, M., Sloey, C., Sutherland, W., Arai, H., Briddell, R., Kinstler, O., Lueras, A. M. K., Zhang, Y., Yeghnazar, H., Treuheit, M., and Brems, D. N. (2006) Modulation of protein aggregation by polyethylene glycol conjugation: GCSF as a case study. *Protein Sci.* 15, 1063–1075.
- (48) Caramelo, J. J., and Parodi, A. J. (2015) A sweet code for glycoprotein folding. *FEBS Lett.* 589, 3379–3387.
- (49) Banks, D. D. (2011) The Effect of Glycosylation on the Folding Kinetics of Erythropoietin. *J. Mol. Biol.* 412, 536–550.

*SUPPORTING INFORMATION*

**Characterizing the Structure and Oligomerization of  
Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1) by Mass Spectrometry and  
Complementary Biophysical Tools**

Samuel C. Mandacaru<sup>1,2</sup>, Luis H. F. do Vale<sup>2,3</sup>, Siavash Vahidi<sup>1</sup>, Yiming Xiao<sup>1</sup>, Owen S. Skinner<sup>3</sup>,  
Carlos A. O. Ricart<sup>2</sup>, Neil L. Kelleher<sup>3</sup>, Marcelo Valle de Sousa<sup>2\*</sup>,  
and Lars Konermann<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Chemistry, The University of Western Ontario, London, Canada*

<sup>2</sup>*Brazilian Center of Protein Research, Department of Cell Biology, University of Brasilia,  
Brasilia, Brazil*

This file contains:

Supporting Figure S1: Peptic digestion map of MRJP1.

Supporting Figure S2: Tryptic digestion map of MRJP1.

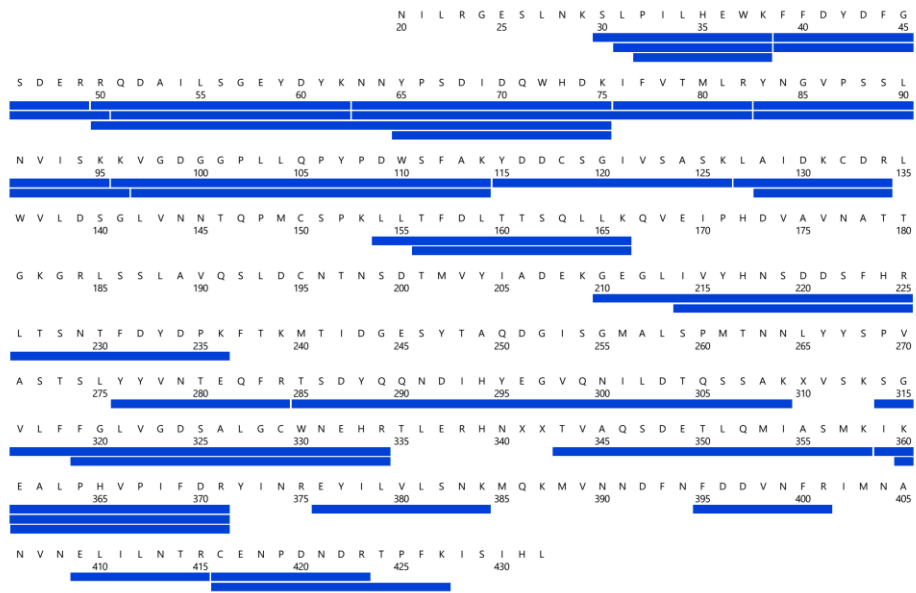
Supporting Figure S3: Full native MS spectrum of MRJP1/apisimin.

Supporting Figure S4: Summary of MRJP1 HDX/MS kinetics.

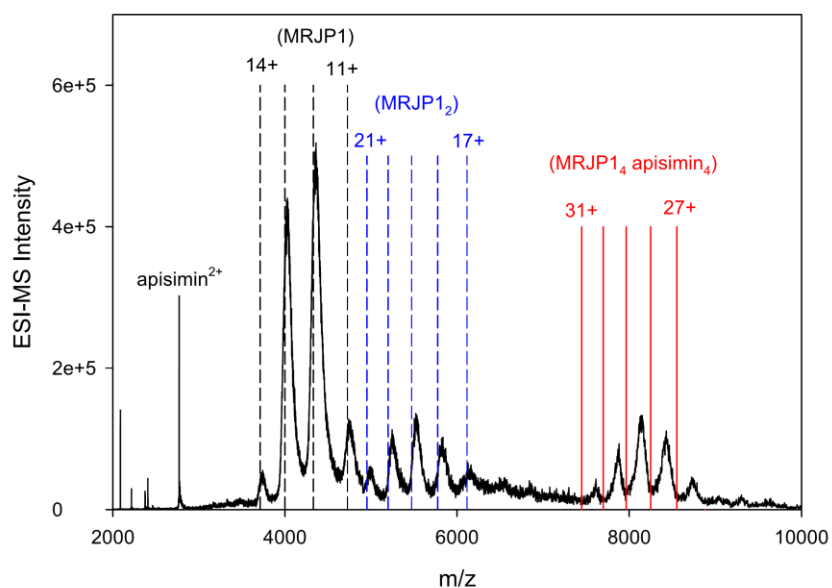
Supporting Figure S5: EX1 isotope distributions of selected peptides.



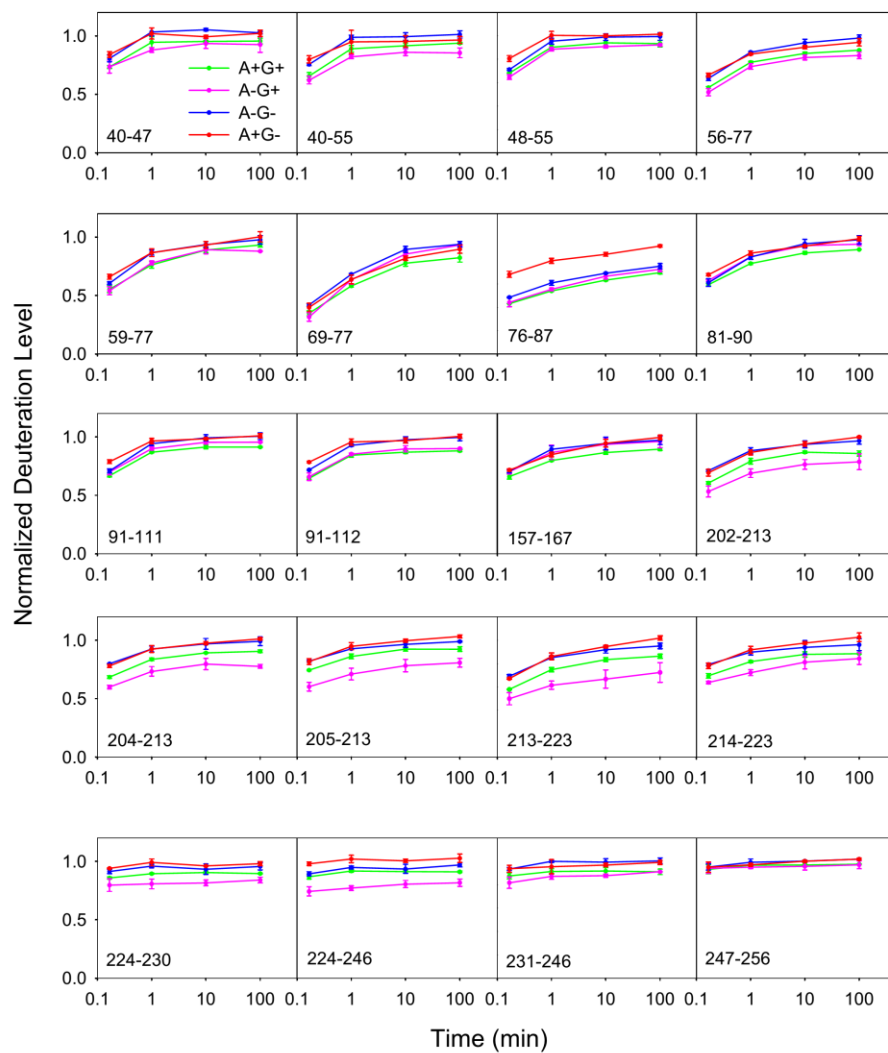
**Supporting Figure S1.** MRJP1 peptic peptides generated during the HDX-MS workflow. The sequence numbering represents that of the unprocessed full-length protein, as deduced from cDNA.<sup>(1)</sup> The sequence coverage is 55%.



**Supporting Figure S2.** MRJP1 peptides identified after tryptic digestion, using the cDNA derived published protein sequence.<sup>(1)</sup> The sequence coverage is 64%.

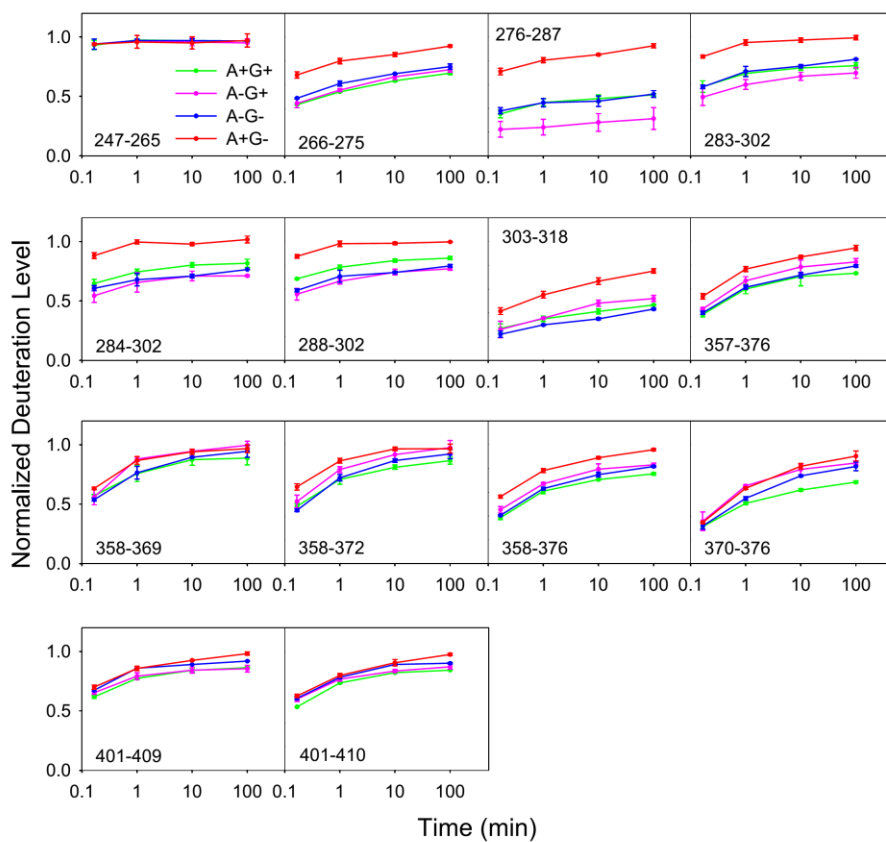


**Supporting Figure S3:** Native ESI mass spectrum of MRJP1/apisimin (A+G+) acquired under gentle source conditions. Peaks are assigned based on the mass values deduced from Figure 1 (main text). The full spectrum shown here indicates that the protein in solution exists as a mixture of tetrameric complexes (MRJP<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) and free monomeric MRJP1. Some dimeric MRJP1 is seen as well. The peak intensity ratios seen here cannot be directly related to solution phase concentrations due to differences in ionization efficiency and m/z bias of the mass analyzer used.<sup>(2)</sup> Both of these factors are expected to diminish the magnitude of (MRJP<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) signals. All peaks are shifted to higher m/z due to the retention of nonspecific adducts.<sup>(3)</sup> For the gentle source conditions used here, this effect is particularly pronounced for (MRJP<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>). Much better agreement between expected and measured (MRJP<sub>4</sub> apisimin<sub>4</sub>) is obtained when applying slightly more extensive source activation of the complex (see main text and Figure 1a).



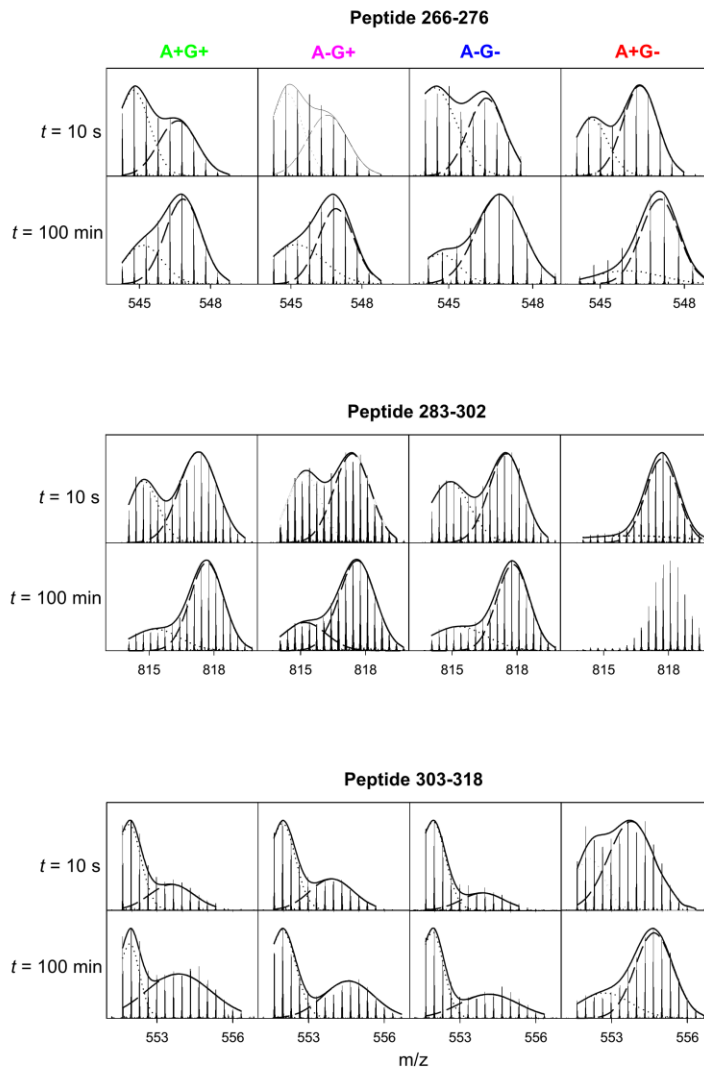
Supporting Figure S4 – Part I. (see caption on next page)





**Supporting Figure S4 – Part II.** Complete summary of the HDX kinetics measured (normalized deuteration level vs. labeling time) for all the peptic peptides monitored for A+G+, A-G+, A-G-, and A+G- samples. The sequence range covered by each peptide is indicated in the individual panels. Error bars (representing standard deviations) are shown for each point.





**Supporting Figure S5.** Examples of bimodal (EX1) MRJP1 isotope distributions after 10 s (top panels) and 100 minutes (bottom panels) of deuteration. Smooth lines indicate Gaussian deconvolutions into high mass and low mass components.

### SI References

1. Schmitzova, J., Kludiny, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J., and Simuth, J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L, *Cell. Mol. Life Sci.* *54*, 1020-1030.
2. Kuprowski, M. C., and Konermann, L. (2007) Signal Response of Co-Existing Protein Conformers in Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* *79*, 2499-2506.
3. Benesch, J. L. P., Ruotolo, B. T., Simmons, D. A., and Robinson, C. V. (2007) Protein Complexes in the Gas Phase: Technology for Structural Genomics and Proteomics, *Chem. Rev.* *107*, 3544-3567.

---

## 6. Considerações finais e Perspectivas

---

A proteína MRJP1 foi escolhida como nosso modelo experimental não somente por sua importância e complexidade, mas também por não existir trabalhos na literatura que descrevessem suas características estruturais na profundidade conseguida nesta tese. Esta proteína se faz especialmente importante devido ao seu papel biológico na abelha *Apis mellifera*, inseto que está em curso de declínio ao redor do mundo [156-162]. Conhecer a biologia da abelha nos mais diversos níveis, inclusive o bioquímico, é essencial para uma preservação mais eficiente da espécie. O trabalho descrito nesta tese mostrou como a associação de várias técnicas de bioquímica e biofísica, com ênfase em espectrometria de massas, podem ser utilizadas em conjunto para descrever propriedades e características de uma proteína em detalhes. Possivelmente, algumas das características estruturais determinadas para MRJP1 ou talvez a combinação de todas elas gerem as importantes e diversas funções de MRJP1.

Mesmo sabendo que uma das alternativas para cristalização de glicoproteínas é a deglicosilação da mesma, essa estratégia não se fez válida para MRJP1. Tentativas anteriores de cristalização dessa proteína por nosso grupo em colaboração com especialistas se mostraram frustradas. De fato, nossos experimentos de HDX-MS demonstraram que após remoção dos carboidratos a proteína tende a formar agregados solúveis. Nossos dados de HDX-MS também clarificaram a natureza dinâmica de MRJP1, especialmente na porção N-terminal, que possui característica de ser intrinsecamente desordenada. Provavelmente, essas características estruturais inviabilizaram a cristalização. Assim, sugerimos que o caminho mais viável para se conseguir um cristal a ser difratado seria a produção de MRJP1 truncada, onde somente regiões estáveis que interagem com apisimina sejam cristalizadas.

Mesmo após um extensivo estudo sobre a estrutura do heterocomplexo MRJP1/apisimina, ainda não está claro como tal complexo pode desempenhar funções essenciais no desenvolvimento larval em rainhas. No entanto, podemos seguir a seguinte linha

de raciocínio: o complexo composto de MRJP1<sub>4</sub>/apisimina<sub>4</sub> é construído a partir da formação dímero de dímero com estequiometria MRJP1<sub>2</sub>/apisimina<sub>1</sub>. Ou seja, o complexo é dependente da associação promovida pela apisimina. Tal mecanismo pode servir como controle de diferentes funções da mesma proteína. Ou seja, o tetrâmero pode ter funções diferentes daquelas dos dímeros, assim como dos monômeros. O mesmo pensamento pode ser usado para a deglicosilação de MRJP1. Diferentes graus de glicosilação podem estimular ou inibir diferentes eventos e cascatas de sinalização intracelular.

É bastante comum na natureza encontrar proteínas que são intrinsicamente desordenadas, mas que desempenham importantes funções em um organismo. Proteínas intrinsicamente desordenadas (PIDs) são capazes de desempenhar muitas funções, uma vez que seus segmentos desordenados podem interagir com várias proteínas fazendo com que uma mesma proteína possa ser reutilizada em diferentes vias de sinalização [163].

As PIDs estão sujeitas a várias modificações pós-traducionais e eventos de *splicing* alternativo, adicionando complexidade às redes reguladoras e promovendo mecanismos de sinalização tecido-específica [164]. Além do mais, estas proteínas podem participar na montagem de complexos de sinalização e na dinâmica de auto-associação de organelas nucleares e citoplasmática [164]. Como foi demonstrado por Kamakura, 2011 [65], a interação de MRJP1 com células do desenvolvimento se dá a partir do receptor EGFR, um importante receptor envolvido em várias vias de sinalização celular.

Como perspectiva de médio ou longo prazo, a determinação da estrutura tridimensional de MRJP1 lançará luz sobre como esta interage com seu receptor disparando sequências de sinais intracelulares responsáveis pelo notável efeito biológico nas larvas. Também, essa estrutura 3D será essencial como ponto de partida para se entender os mecanismos moleculares e funções biológicas de MRJP1 em órgãos como o cérebro de abelhas por exemplo.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Barchuk, A.R., et al., *Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee Apis mellifera*. BMC developmental biology, 2007. **7**(1): p. 1.
2. Bomtorin, A.D., et al., *Hox gene expression leads to differential hind leg development between honeybee castes*. PloS one, 2012. **7**(7): p. e40111.
3. Patel, N., M. Haydak, and T. Gochnauer, *Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food*. Nature, 1960. **186**(4725): p. 633-634.
4. Lensky, Y. and Y. Rakover, *Separate protein body compartments of the worker honeybee (Apis mellifera L.)*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1983. **75**(4): p. 607-615.
5. Knecht, D. and H. Kaatz, *Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees*. Apidologie, 1990. **21**(5): p. 457-468.
6. Ohashi, K., S. Natori, and T. Kubo, *Change in the Mode of Gene Expression of the Hypopharyngeal Gland Cells with an Age-dependent Role Change of the Worker Honeybee Apis mellifera L.* European journal of biochemistry, 1997. **249**(3): p. 797-802.
7. Kubo, T., et al., *Change in the Expression of Hypopharyngeal-Gland Proteins of the Worker Honeybees (Apis mellifera L.) with Age and/or Role*. Journal of biochemistry, 1996. **119**(2): p. 291-295.
8. Takenaka, T., *Chemical compositions of royal jelly*. Honeybee Science (Japan), 1982.
9. Marko, P., I. PECHÁŇ, and J. VITTEK, *Some phosphorus compounds in royal jelly*. 1964.
10. Blum, M.S., A.F. Novak, and S. Taber, *10-hydroxy- $\Delta$ 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly*. Science, 1959. **130**(3373): p. 452-453.
11. Watanabe, K., et al., *Stimulation of cell growth in the U-937 human myeloid cell line by honey royal jelly protein*. Cytotechnology, 1998. **26**(1): p. 23-27.
12. Okamoto, I., et al., *Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo*. Life sciences, 2003. **73**(16): p. 2029-2045.
13. Mannoor, M., et al., *Honeybee royal jelly inhibits autoimmunity in SLE-prone NZB $\times$  NZW F1 mice*. Lupus, 2009. **18**(1): p. 44-52.
14. Majtán, J., et al., *The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1–major honeybee royal jelly protein–on TNF $\alpha$  release*. International immunopharmacology, 2006. **6**(2): p. 269-278.
15. Kamakura, M., N. Suenobu, and M. Fukushima, *Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum*. Biochemical and Biophysical research communications, 2001. **282**(4): p. 865-874.
16. Zimmermann, A., *Liver regeneration: the emergence of new pathways*. Medical Science Monitor, 2002. **8**(3): p. RA53-RA63.
17. Kohno, K., et al., *Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2004. **68**(1): p. 138-145.
18. Oka, H., et al., *Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses*. International immunopharmacology, 2001. **1**(3): p. 521-532.
19. Townsend, G.F., J.F. MORGAN, and B. HAZLETT, *Activity of 10-hydroxydecenoic acid from royal jelly against experimental leukaemia and ascitic tumours*. 1959.
20. Townsend, G.F., et al., *Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids I. 10-*

- hydroxy-2-decenoic acid from royal jelly*. Cancer research, 1960. **20**(4): p. 503-510.
21. Izuta, H., et al., *10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells*. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2009. **6**(4): p. 489-494.
  22. FUJII, A., et al., *Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats*. The Japanese Journal of Pharmacology, 1990. **53**(3): p. 331-337.
  23. Taniguchi, Y., et al., *Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice*. International immunopharmacology, 2003. **3**(9): p. 1313-1324.
  24. Koya-Miyata, S., et al., *Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2004. **68**(4): p. 767-773.
  25. Abdelatif, M., M. Yakoot, and M. Etmaan, *Safety and efficacy of a new honey ointment on diabetic foot ulcers: a prospective pilot study*. Journal of wound care, 2008. **17**(3).
  26. Zamami, Y., et al., *Royal jelly ameliorates insulin resistance in fructose-drinking rats*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2008. **31**(11): p. 2103-2107.
  27. Vittek, J., *Effect of royal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with atherosclerosis*. Experientia, 1995. **51**(9-10): p. 927-935.
  28. Kamakura, M., T. Moriyama, and T. Sakaki, *Changes in hepatic gene expression associated with the hypocholesterolaemic activity of royal jelly*. Journal of pharmacy and pharmacology, 2006. **58**(12): p. 1683-1689.
  29. Guo, H., et al., *Royal jelly supplementation improves lipoprotein metabolism in humans*. Journal of nutritional science and vitaminology, 2007. **53**(4): p. 345-348.
  30. Mishima, S., et al., *Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo*. Journal of ethnopharmacology, 2005. **101**(1): p. 215-220.
  31. Tokunaga, K.-h., et al., *Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2004. **27**(2): p. 189-192.
  32. Kamakura, M., et al., *Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice*. Journal of nutritional science and vitaminology, 2001. **47**(6): p. 394-401.
  33. Nagai, T., et al., *Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis*. Food chemistry, 2001. **75**(2): p. 237-240.
  34. Nagai, T. and R. Inoue, *Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly*. Food chemistry, 2004. **84**(2): p. 181-186.
  35. Nagai, T., et al., *Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly*. Journal of medicinal food, 2006. **9**(3): p. 363-367.
  36. Hashimoto, M., et al., *Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2005. **69**(4): p. 800-805.
  37. Hattori, N., et al., *Identification of AMP N 1-oxide in royal jelly as a component neurotrophic toward cultured rat pheochromocytoma PC12 cells*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2006. **70**(4): p. 897-906.
  38. Hattori, N., et al., *Royal jelly facilitates restoration of the cognitive ability in trimethyltin-intoxicated mice*. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2009. **2011**: p. 26.
  39. Narita, Y., et al., *Effects of long-term administration of royal jelly on pituitary weight and gene expression in middle-aged female rats*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2009. **73**(2): p. 431-433.
  40. Peiren, N., et al., *The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics,

2005. **1752**(1): p. 1-5.
41. Scarselli, R., et al., *Towards royal jelly proteome*. Proteomics, 2005. **5**(3): p. 769-776.
  42. Garcia, L., et al., *Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development*. Journal of proteome research, 2009. **8**(3): p. 1464-1473.
  43. Hernández, L.G., et al., *Worker honeybee brain proteome*. Journal of proteome research, 2012. **11**(3): p. 1485-1493.
  44. Peixoto, L.G., et al., *Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera**. Journal of insect physiology, 2009. **55**(8): p. 671-677.
  45. Drapeau, M.D., et al., *Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees*. Genome Research, 2006. **16**(11): p. 1385-1394.
  46. Schmitzova, J., et al., *A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L.* Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 1998. **54**(9): p. 1020-1030.
  47. Alberts, B., *The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists*. Cell, 1998. **92**(3): p. 291-294.
  48. Kucharski, R., et al., *A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain*. Naturwissenschaften, 1998. **85**(7): p. 343-346.
  49. Winston, M.L., *The biology of the honey bee*. 1991: harvard university press.
  50. Huang, Z.-Y., et al., *Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis*. Journal of insect physiology, 1991. **37**(10): p. 733-741.
  51. Huang, Z.-Y., G. Robinson, and D. Borst, *Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees*. Journal of Comparative Physiology A, 1994. **174**(6): p. 731-739.
  52. Malecová, B., et al., *Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food*. Gene, 2003. **303**: p. 165-175.
  53. Charlab, R., et al., *Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(26): p. 15155-15160.
  54. Johnson, J., J. Li, and B. Christensen, *Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti**. Insect biochemistry and molecular biology, 2001. **31**(11): p. 1125-1135.
  55. Valenzuela, J.G., et al., *Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens characterization of a protective salivary protein*. The Journal of experimental medicine, 2001. **194**(3): p. 331-342.
  56. Maleszka, R. and R. Kucharski, *Analysis of *Drosophila* yellow-B cDNA reveals a new family of proteins related to the royal jelly proteins in the honeybee and to an orphan protein in an unusual bacterium *Deinococcus radiodurans**. Biochemical and Biophysical research communications, 2000. **270**(3): p. 773-776.
  57. Nash, W., H. Kamerow, and C. Merrill, *Identification of a yellow gene-specific protein in *Drosophila melanogaster* by two-dimensional gel electrophoresis*. Biochemical genetics, 1983. **21**(11-12): p. 1135-1142.
  58. Kornezos, A. and W. Chia, *Apical secretion and association of the *Drosophila* yellow gene product with developing larval cuticle structures during embryogenesis*. Molecular and General Genetics MGG, 1992. **235**(2-3): p. 397-405.
  59. Inestrosa, N.C., et al., *Abnormal development of the locomotor activity in yellow larvae of *Drosophila*: a cuticular defect?* Genetica, 1996. **97**(2): p. 205-210.
  60. Dow, M.A., *The genetic basis of receptivity of yellow mutant *Drosophila melanogaster* females*. Behavior genetics, 1976. **6**(2): p. 141-143.

61. Albert, Š. and J. Klauđiny, *The MRJP/YELLOW protein family of Apismellifera: Identification of new members in the EST library*. Journal of insect physiology, 2004. **50**(1): p. 51-59.
62. Groot, A.P.d., *Protein and amino acid requirements of the honeybee (Apis mellifica L.)*. 1953.
63. Šimúth, J., et al., *Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- $\alpha$  release is a regular component of honey*. Journal of agricultural and food chemistry, 2004. **52**(8): p. 2154-2158.
64. Šimúth, J., *Some properties of the main protein of honeybee (Apis mellifera) royal jelly*. Apidologie, 2001. **32**(1): p. 69-80.
65. Kamakura, M., *Royalactin induces queen differentiation in honeybees*. Nature, 2011. **473**(7348): p. 478-483.
66. Anderson, N.G. and N.L. Anderson, *Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future*. Electrophoresis, 1996. **17**(3): p. 443-453.
67. Zhang, Y., et al., *Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics*. Chemical reviews, 2013. **113**(4): p. 2343-2394.
68. Mann, M. and N.L. Kelleher, *Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(47): p. 18132-18138.
69. Domon, B. and R. Aebersold, *Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy*. Nature biotechnology, 2010. **28**(7): p. 710-721.
70. Michalski, A., et al., *Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes*. Molecular & Cellular Proteomics, 2012. **11**(3): p. O111. 013698.
71. Thakur, S.S., et al., *Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without prefractionation*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(8): p. M110. 003699.
72. Kettenbach, A.N., J. Rush, and S.A. Gerber, *Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides*. Nature protocols, 2011. **6**(2): p. 175-186.
73. Bantscheff, M., et al., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2012. **404**(4): p. 939-965.
74. Kaltashov, I.A., S.J. Eyles, and D.M. Desiderio, *Mass spectrometry in structural biology and biophysics: architecture, dynamics, and interaction of biomolecules*. Vol. 45. 2012: John Wiley & Sons.
75. Heck, A.J. and R.H. van den Heuvel, *Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry*. Mass spectrometry reviews, 2004. **23**(5): p. 368-389.
76. Berkenkamp, S., F. Kirpekar, and F. Hillenkamp, *Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids*. Science, 1998. **281**(5374): p. 260-262.
77. Fenn, J.B., *Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture)*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(33): p. 3871-3894.
78. Tang, L. and P. Kebarle, *Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution*. Analytical chemistry, 1993. **65**(24): p. 3654-3668.
79. Kebarle, P. and U.H. Verkerk, *Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*. Mass spectrometry reviews, 2009. **28**(6): p. 898-917.
80. Taylor, G. *Conditions under which dispersion of a solute in a stream of solvent can be used to measure molecular diffusion*. in *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 1954: The Royal Society.



81. Frs, L., *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity'*, Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci, 1882. **14**: p. 87.
82. Kaltashov, I.A. and A. Mohimen, *Estimates of protein surface areas in solution by electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2005. **77**(16): p. 5370-5379.
83. Nguyen, S. and J.B. Fenn, *Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(4): p. 1111-1117.
84. Hogan Jr, C.J., et al., *Combined charged residue-field emission model of macromolecular electrospray ionization*. Analytical chemistry, 2008. **81**(1): p. 369-377.
85. Konermann, L., et al., *Unraveling the mechanism of electrospray ionization*. Analytical chemistry, 2012. **85**(1): p. 2-9.
86. Konermann, L., A.D. Rodriguez, and J. Liu, *On the formation of highly charged gaseous ions from unfolded proteins by electrospray ionization*. Analytical chemistry, 2012. **84**(15): p. 6798-6804.
87. Sciuto, S.V., J. Liu, and L. Konermann, *An electrostatic charge partitioning model for the dissociation of protein complexes in the gas phase*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2011. **22**(10): p. 1679-1689.
88. Iribarne, J. and B. Thomson, *On the evaporation of small ions from charged droplets*. The Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
89. Watson, J.T. and O.D. Sparkman, *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*. 2007: John Wiley & Sons.
90. Roboz, J., *Introduction to mass spectrometry: instrumentation and techniques*. 1968: Interscience publishers New York.
91. Douglas, D.J., A.J. Frank, and D. Mao, *Linear ion traps in mass spectrometry*. Mass spectrometry reviews, 2005. **24**(1): p. 1-29.
92. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Analytical chemistry, 2000. **72**(6): p. 1156-1162.
93. Scigelova, M. and A. Makarov, *Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics*. Proteomics, 2006. **6**(S2): p. 16-21.
94. Zubarev, R.A. and A. Makarov, *Orbitrap mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2013. **85**(11): p. 5288-5296.
95. Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer*. Mass spectrometry reviews, 1998. **17**(1): p. 1-35.
96. Konermann, L., R.G. McAllister, and H. Metwally, *Molecular Dynamics Simulations of the Electrospray Process: Formation of NaCl Clusters via the Charged Residue Mechanism*. The Journal of Physical Chemistry B, 2014. **118**(41): p. 12025-12033.
97. Yue, X., S. Vahidi, and L. Konermann, *Insights into the mechanism of protein electrospray ionization from salt adduction measurements*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2014. **25**(8): p. 1322-1331.
98. Dawson, P.H., *Quadrupole mass spectrometry and its applications*. 2013: Elsevier.
99. Verentchikov, A.N., W. Ens, and K.G. Standing, *Reflecting time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ion source and orthogonal extraction*. Analytical chemistry, 1994. **66**(1): p. 126-133.
100. Waugh, A.R., *Time-of-flight mass spectrometry*. 1988, Google Patents.
101. Li, G. and G.M. Hieftje, *Time-of-flight mass spectrometer*. 1997, Google Patents.
102. Hardman, M. and A.A. Makarov, *Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source*. Analytical chemistry, 2003. **75**(7): p. 1699-1705.
103. Covey, T.R., E.C. Huang, and J.D. Henion, *Structural characterization of protein*

- tryptic peptides via liquid chromatography/mass spectrometry and collision-induced dissociation of their doubly charged molecular ions.* Analytical chemistry, 1991. **63**(13): p. 1193-1200.
104. Kruger, N.A., et al., *Electron capture versus energetic dissociation of protein ions.* International journal of mass spectrometry, 1999. **182**: p. 1-5.
  105. Kruger, N.A., et al., *Electron capture dissociation of multiply charged peptide cations.* International journal of mass spectrometry, 1999. **185**: p. 787-793.
  106. McLafferty, F.W., et al., *Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by Fourier-transform ion cyclotron resonance.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2001. **12**(3): p. 245-249.
  107. Syka, J.E., et al., *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(26): p. 9528-9533.
  108. Molina, H., et al., *Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(7): p. 2199-2204.
  109. Rand, K.D., et al., *Protein hydrogen exchange measured at single-residue resolution by electron transfer dissociation mass spectrometry.* Analytical chemistry, 2009. **81**(14): p. 5577-5584.
  110. Mueller, D., M. Eckersley, and W. Richter, *Hydrogen transfer reactions in the formation of "Y+ 2" sequence ions from protonated peptides.* Organic mass spectrometry, 1988. **23**(3): p. 217-222.
  111. Tang, X.J., P. Thibault, and R.K. Boyd, *Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation.* Analytical chemistry, 1993. **65**(20): p. 2824-2834.
  112. Zubarev, R.A., et al., *Electron capture dissociation of gaseous multiply-charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom affinity.* Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(12): p. 2857-2862.
  113. Srikanth, R., et al., *Improved sequencing of oxidized cysteine and methionine containing peptides using electron transfer dissociation.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(8): p. 1499-1506.
  114. Ahn, J., et al., *Pepsin immobilized on high-strength hybrid particles for continuous flow online digestion at 10 000 psi.* Analytical chemistry, 2012. **84**(16): p. 7256-7262.
  115. Busby, S.A., M.J. Chalmers, and P.R. Griffin, *Improving digestion efficiency under H/D exchange conditions with activated pepsinogen coupled columns.* International journal of mass spectrometry, 2007. **259**(1): p. 130-139.
  116. Bohrer, B.C., et al., *Biomolecule analysis by ion mobility spectrometry.* Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.), 2008. **1**: p. 293.
  117. Woodward, C., I. Simon, and E. Tüchsen, *Hydrogen exchange and the dynamic structure of proteins.* Molecular and cellular biochemistry, 1982. **48**(3): p. 135-160.
  118. Chalmers, M.J., et al., *A two-stage differential hydrogen deuterium exchange method for the rapid characterization of protein/ligand interactions.* Journal of Biomolecular Techniques, 2007. **18**(4): p. 194.
  119. Rand, K.D., et al., *Electron capture dissociation proceeds with a low degree of intramolecular migration of peptide amide hydrogens.* Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(4): p. 1341-1349.
  120. Sperry, J.B., et al., *A mass spectrometric approach to the study of DNA-binding proteins: interaction of human TRF2 with telomeric DNA.* Biochemistry, 2008. **47**(6): p. 1797-1807.
  121. Rodriguez, A.D., S.D. Dunn, and L. Konermann, *ATP-induced dimerization of the*

- FOF1 epsilon subunit from Bacillus PS3: a hydrogen exchange-mass spectrometry study.* Biochemistry, 2014. **53**(24): p. 4072-80.
122. Woodward, C., *Advances in protein hydrogen exchange by mass spectrometry.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1999. **10**(8): p. 672-674.
123. Mitra, G., et al., *Structural Perturbation of Human Hemoglobin on Glutathionylation Probed by Hydrogen– Deuterium Exchange and MALDI Mass Spectrometry.* Bioconjugate chemistry, 2011. **22**(4): p. 785-793.
124. Rand, K.D., et al., *Investigation of amide hydrogen back-exchange in Asp and His repeats measured by hydrogen ( $1\text{ H}/2\text{ H}$ ) exchange mass spectrometry.* International journal of mass spectrometry, 2011. **302**(1): p. 110-115.
125. Skinner, J.J., et al., *Protein dynamics viewed by hydrogen exchange.* Protein Science, 2012. **21**(7): p. 996-1005.
126. Barrera, N.P. and C.V. Robinson, *Advances in the mass spectrometry of membrane proteins: from individual proteins to intact complexes.* Annual review of biochemistry, 2011. **80**: p. 247-271.
127. Pan, Y., et al., *Conformational dynamics of a membrane transport protein probed by H/D exchange and covalent labeling: The glycerol facilitator.* Journal of molecular biology, 2012. **416**(3): p. 400-413.
128. Iacob, R.E. and J.R. Engen, *Hydrogen exchange mass spectrometry: are we out of the quicksand?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(6): p. 1003-1010.
129. Percy, A.J., et al., *Probing protein interactions with hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry—a review.* Analytica chimica acta, 2012. **721**: p. 7-21.
130. Konermann, L., J. Pan, and Y.-H. Liu, *Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics.* Chemical Society Reviews, 2011. **40**(3): p. 1224-1234.
131. Kaltashov, I.A., et al., *Conformation and dynamics of biopharmaceuticals: transition of mass spectrometry-based tools from academe to industry.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(3): p. 323-337.
132. Zhang, Z. and D.L. Smith, *Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation.* Protein Science, 1993. **2**(4): p. 522-531.
133. Hamuro, Y., et al., *Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(7): p. 1041-1046.
134. Zhang, Z., C.B. Post, and D.L. Smith, *Amide hydrogen exchange determined by mass spectrometry: application to rabbit muscle aldolase.* Biochemistry, 1996. **35**(3): p. 779-791.
135. Wales, T.E., et al., *High-speed and high-resolution UPLC separation at zero degrees Celsius.* Analytical chemistry, 2008. **80**(17): p. 6815-6820.
136. Deng, Y., Z. Zhang, and D.L. Smith, *Comparison of continuous and pulsed labeling amide hydrogen exchange/mass spectrometry for studies of protein dynamics.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1999. **10**(8): p. 675-684.
137. Khanal, A., et al., *Pulsed hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for time-resolved membrane protein folding studies.* Journal of Mass Spectrometry, 2012. **47**(12): p. 1620-1626.
138. Konermann, L., Y. Pan, and B.B. Stocks, *Protein folding mechanisms studied by pulsed oxidative labeling and mass spectrometry.* Current opinion in structural biology, 2011. **21**(5): p. 634-640.
139. Olsen, J.V., S.-E. Ong, and M. Mann, *Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues.* Molecular & Cellular Proteomics, 2004. **3**(6): p. 608-

- 614.
140. Ahn, J., et al., *Assessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013. **1834**(6): p. 1222-1229.
  141. Lacerda, C.M., et al., *Analysis of iTRAQ data using Mascot and Peaks quantification algorithms*. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 2008. **7**(2): p. 119-126.
  142. Chalmers, M.J., et al., *Differential hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry analysis of protein–ligand interactions*. *Expert review of proteomics*, 2011. **8**(1): p. 43-59.
  143. Borgstahl, G.E., *How to use dynamic light scattering to improve the likelihood of growing macromolecular crystals*. *Macromolecular Crystallography Protocols: Volume 1, Preparation and Crystallization of Macromolecules*, 2007: p. 109-130.
  144. Gobom, J., et al., *Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry*, 1999. **34**(2): p. 105-116.
  145. Palmisano, G., et al., *Chemical deamidation: a common pitfall in large-scale N-linked glycoproteomic mass spectrometry-based analyses*. *Journal of proteome research*, 2012. **11**(3): p. 1949-1957.
  146. Cruz, G.C., et al., *Calcium effect and pH-dependence on self-association and structural stability of the *Apis mellifera* major royal jelly protein I*. *Apidologie*, 2011. **42**(3): p. 252-269.
  147. Weerapana, E. and B. Imperiali, *Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems*. *Glycobiology*, 2006. **16**(6): p. 91R-101R.
  148. Calo, D., L. Kaminski, and J. Eichler, *Protein glycosylation in Archaea: sweet and extreme*. *Glycobiology*, 2010. **20**(9): p. 1065-1076.
  149. Walsh, G. and R. Jefferis, *Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins*. *Nature biotechnology*, 2006. **24**(10): p. 1241-1252.
  150. Zhang, L., et al., *Towards posttranslational modification proteome of royal jelly*. *Journal of proteomics*, 2012. **75**(17): p. 5327-5341.
  151. Kimura, Y., et al., *Identification of a royal jelly glycoprotein that carries unique complex-type N-glycans harboring the T-antigen (Gal $\beta$ 1-3GalNAc) unit*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2010. **74**(10): p. 2148-2150.
  152. Robinson, N.E. and A. Robinson, *Molecular clocks: deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in peptides and proteins*. 2004: Althouse press.
  153. Feng, M., et al., *In-depth N-Glycosylation reveals species-specific modifications and functions of the royal jelly protein from western (*Apis mellifera*) and eastern honeybees (*Apis cerana*)*. *Journal of proteome research*, 2015. **14**(12): p. 5327-5340.
  154. Geyer, P.K., C. Spana, and V.G. Corces, *On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of *Drosophila melanogaster**. *The EMBO journal*, 1986. **5**(10): p. 2657.
  155. Haines, N. and K.D. Irvine, *Glycosylation regulates Notch signalling*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2003. **4**(10): p. 786-797.
  156. Potts, S.G., et al., *Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe*. *Journal of Apicultural Research*, 2010. **49**(1): p. 15-22.
  157. Desmedt, L., et al., *Absence of food alternatives promotes risk-prone feeding of unpalatable substances in honey bees*. *Scientific reports*, 2016. **6**.
  158. Dosselli, R., et al., *Flight behaviour of honey bee (*Apis mellifera*) workers is altered by initial infections of the fungal parasite *Nosema apis**. *Scientific reports*, 2016. **6**.
  159. Brown, M.J. and R.J. Paxton, *The conservation of bees: a global perspective*. *Apidologie*, 2009. **40**(3): p. 410-416.

160. Potts, S.G., et al., *Global pollinator declines: trends, impacts and drivers*. Trends in ecology & evolution, 2010. **25**(6): p. 345-353.
161. Uhl, P., et al., *Interspecific sensitivity of bees towards dimethoate and implications for environmental risk assessment*. Scientific reports, 2016. **6**.
162. Wu-Smart, J. and M. Spivak, *Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development*. Scientific reports, 2016. **6**.
163. Babu, M.M., et al., *Intrinsically disordered proteins: regulation and disease*. Current opinion in structural biology, 2011. **21**(3): p. 432-440.
164. Wright, P.E. and H.J. Dyson, *Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015. **16**(1): p. 18-29.