

## Bioinformática I

# Proteínas: da extração à estrutura 3D

*Ignez Caracelli*

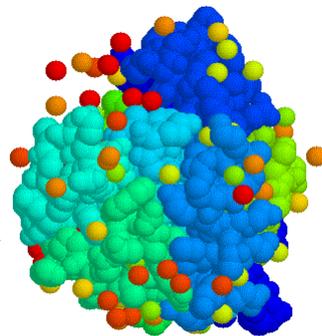
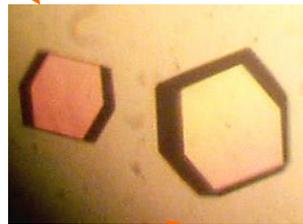
BioMat – DF

*Julio Zukerman Schpector*

LaCrEMM – DQ – UFSCar

## Passos necessários para estrutura 3D

**proteína purificada**



## Obtenção de proteína purificada

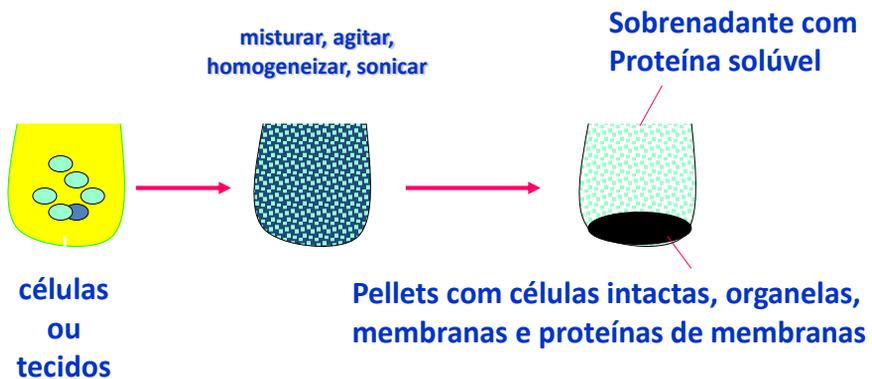
### extração

#### ISOLAMENTO

- material de partida → extrato bruto
- desintegração celular
- extração de enzimas solúveis e de membrana
- meio de extração

proteína purificada

### Isolamento



extração



isolamento



**PURIFICAÇÃO**

- métodos e condições experimentais
- estratégia na purificação de enzimas.

proteína purificada

purificação

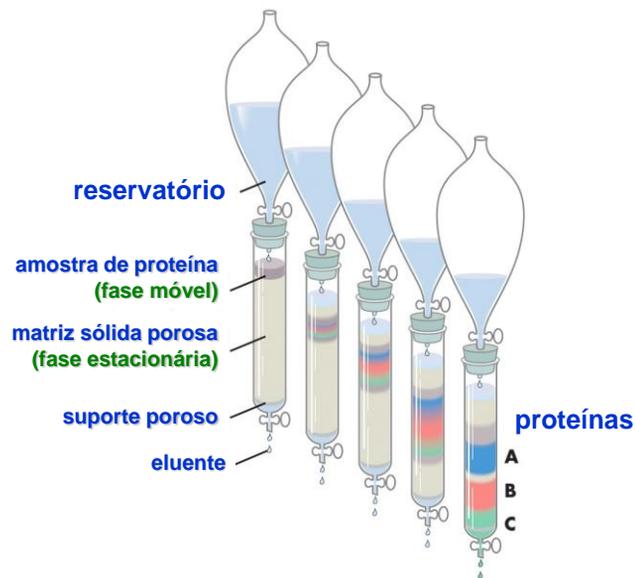
Tipo de Cromatografia	Característica da Proteína	Condição Inicial da Amostra	Eluentes	Condição Final da Amostra	Custo
Gel Filtração	Volume molecular	Volume da amostra <5% do volume da coluna	Qualquer solução aquosa	Amostra diluída em eluente	+
Troca Iônica	Carga	Baixa concentração iônica	Soluções salinas ou com pHs distintos da condição inicial	Amostra concentrada em solução salina	++
Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Alta concentração de sal	Soluções com baixa concentração salina	Amostra concentrada em solução salina	++
Fase Reversa	Hidrofobicidade	Não pode conter altas concentrações de sais	Solvente orgânico	Amostra sem sais em solventes voláteis	+++
Afinidade	Especificidade à ligantes	Condições específicas para ligação	Alta concentração de ligante ou sais	Amostra concentrada contendo ou não ligante	+++



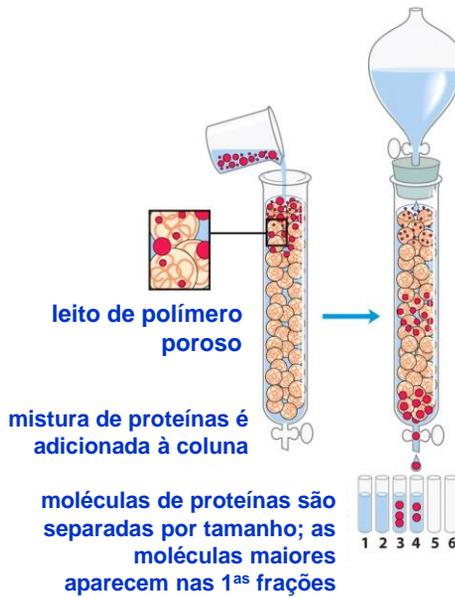
## Separação de Proteínas

- Fracionamento: solubilidade da proteína depende da temperatura, pH, força iônica
- Diálise
- Ultrafiltração
- Coluna cromatográfica
- Eletroforese

## Coluna cromatográfica



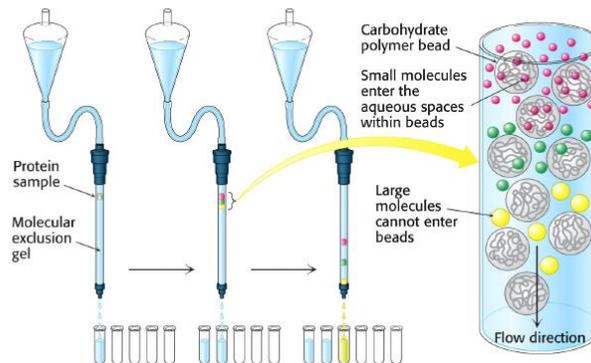
## Cromatografia filtração em gel



- cromatografia por exclusão de tamanho
- proteínas maiores correm mais rápido
- volume de amostra é limitado
- coluna usualmente longa

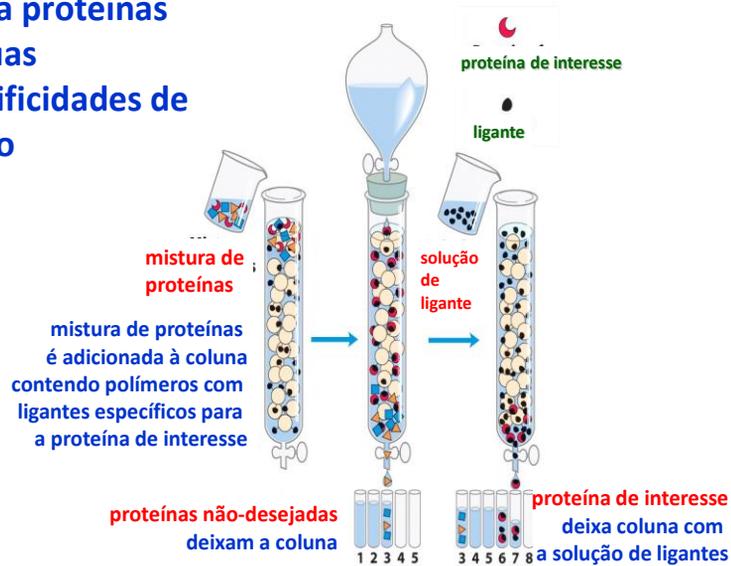
## Cromatografia filtração em gel

### Cromatografia de Filtração em Gel— Separação baseada no tamanho



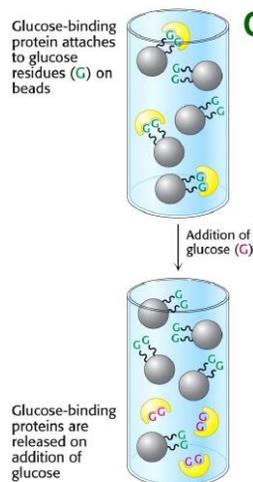
## Cromatografia de afinidade

- Separa proteínas por suas especificidades de ligação



## Cromatografia de afinidade

### Cromatografia de Afinidade

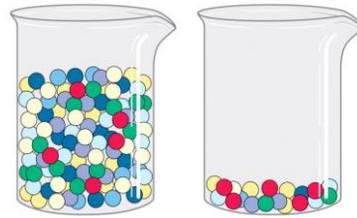


Pequenas moléculas são ligadas aos suportes e a mistura complexa de proteínas é aplicada.

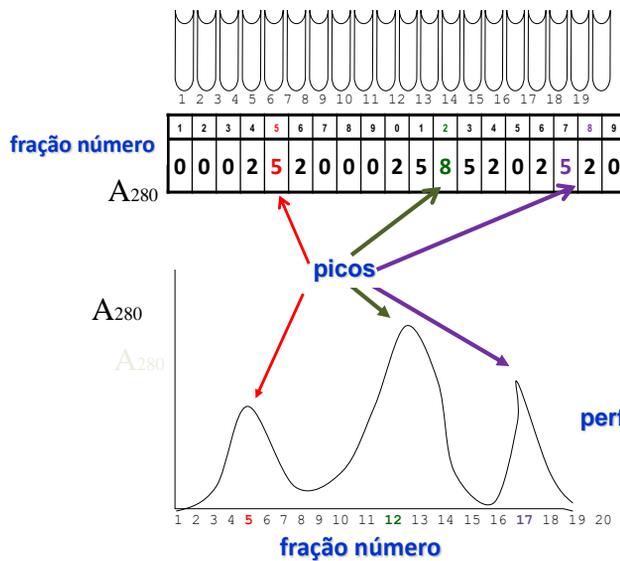
Proteínas ligadas podem ser eluídas com moléculas pequenas ou com reagentes desnaturantes (uréia, guanidina, etc.)

## Purificação de uma enzima hipotética

etapa	volume (mL)	proteína total (mg)	atividade (unidades)	atividade específica (unidades/mg)
extrato celular bruto	1400	10000	100 000	10
precipitação com sulfato de amônio	280	3000	96000	32
cromatografia de troca iônica	90	400	80000	200
cromatografia de gel filtração	80	100	60000	600
cromatografia de afinidade	6	3	45000	15000

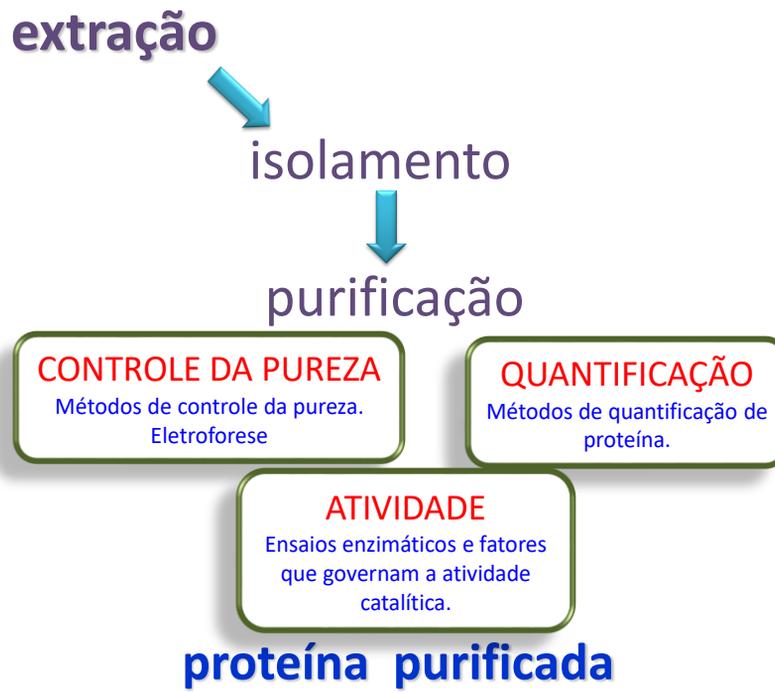


## Purificação

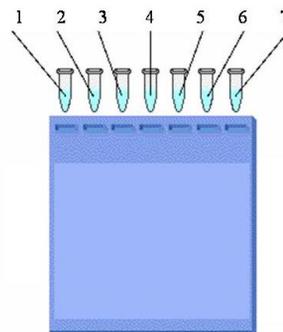
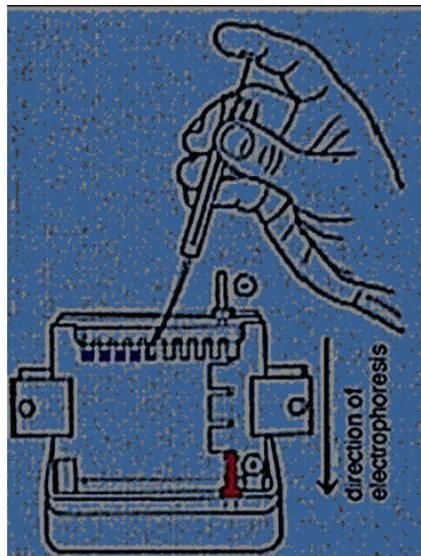


coletor de frações

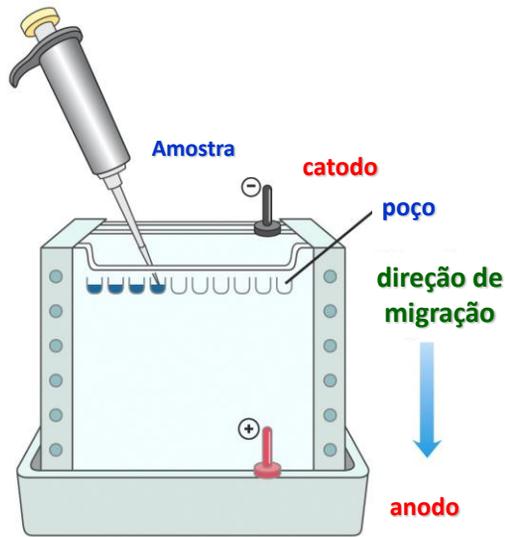
perfil de eluição



## Controle da pureza



## Eletroforese: SDS-PAGE



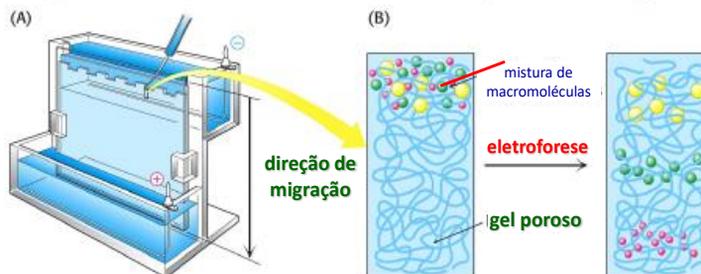
- proteínas migram de acordo com tamanho e forma
- a proteína é denaturada, as subunidades se separam

## Eletroforese: SDS-PAGE

### Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

As proteínas são separadas pelo tamanho em um campo elétrico.

As moléculas menores migram mais rapidamente através da matriz porosa do gel.

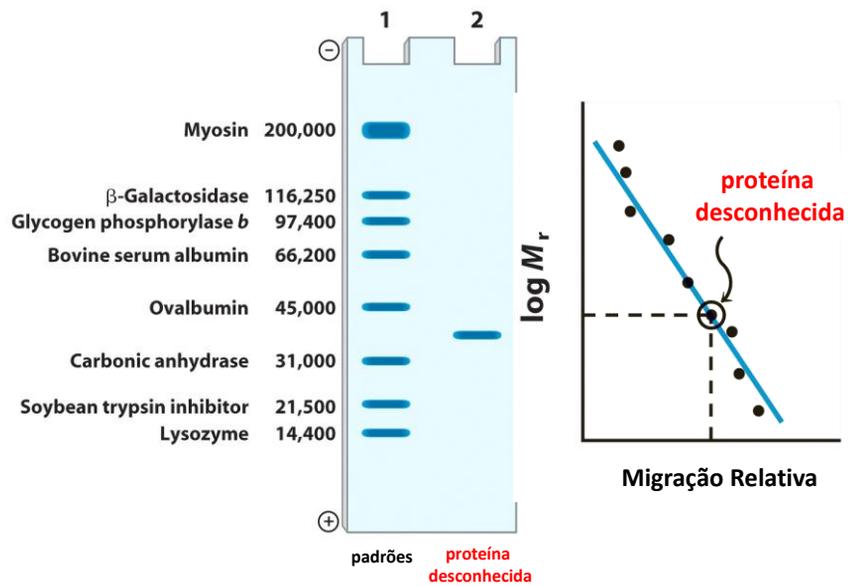


## Eletroforese: corante

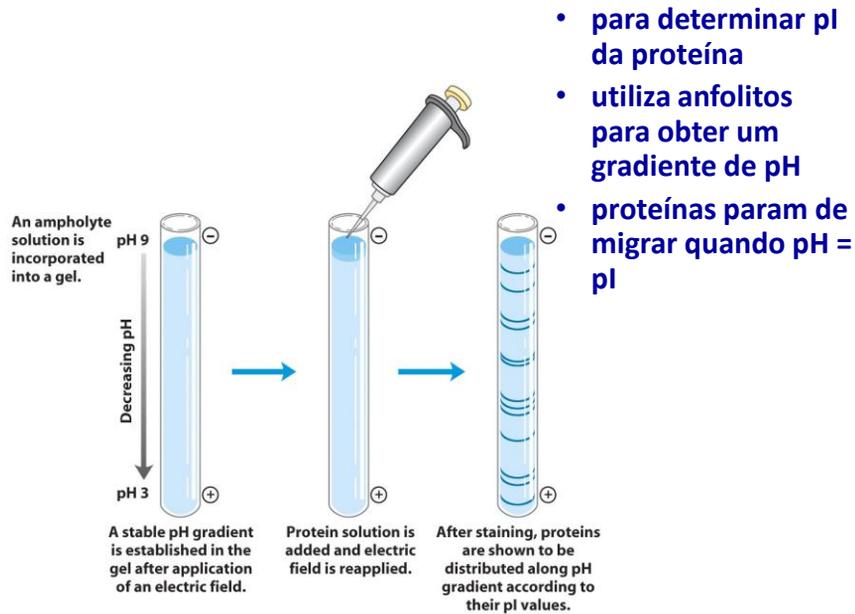
Coomassie blue



## Eletroforese: curva de calibração

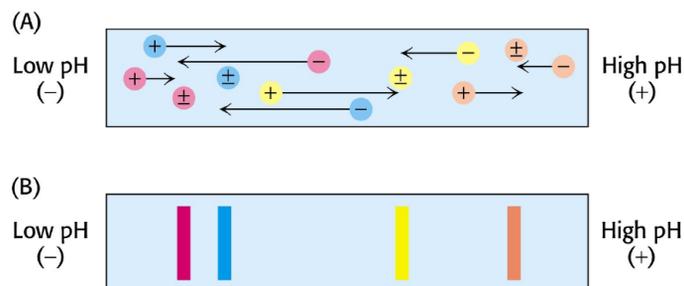


## Eletroforese: focalização isoeétrica



## Eletroforese: focalização isoeétrica

Focalização isoeétrica realiza a migração das proteínas carregadas em um campo elétrico



## Eletroforese: Focalização isoeétrica

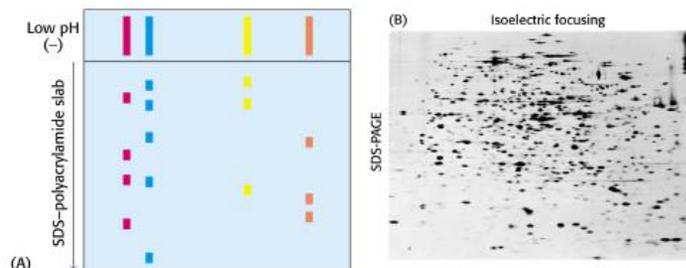
Cada proteína tem o seu ponto isoeétrico (pI). Este é o pH no qual a proteína não tem carga elétrica.

Uma proteína com muitos aminoácidos básicos (Arg, Lys e His) terá um pI básico maior do que 7,0 e uma proteína com muitos resíduos ácidos (Glu e Asp) terá um pI ácido menor do que 7,0.

Gradientes estáveis de pH nos géis podem ser criados usando polianfólitos e proteínas carregadas nestes géis migrarão para os seus pIs correspondentes.

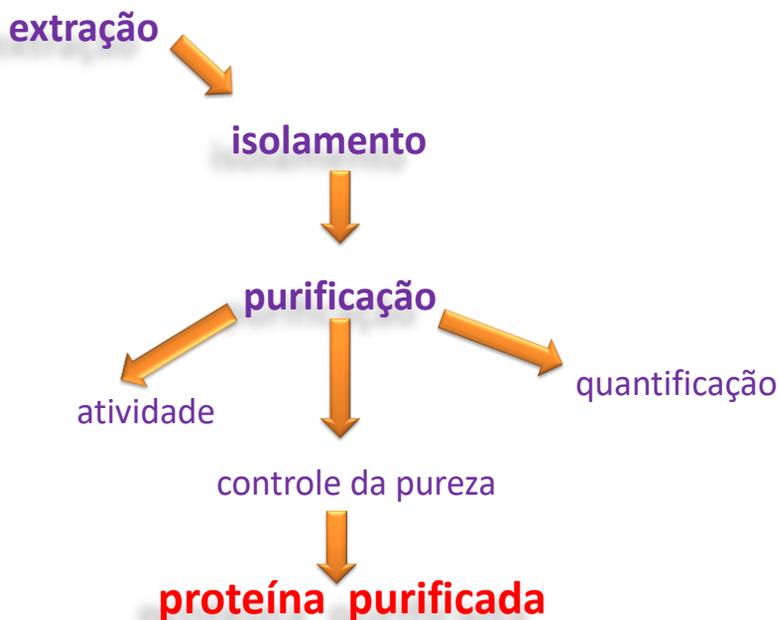
## Eletroforese: Focalização isoeétrica

Focalização isoeétrica é frequentemente combinada com SDS-PAGE para gerar géis bidimensionais.

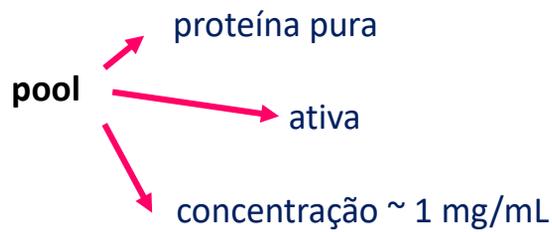
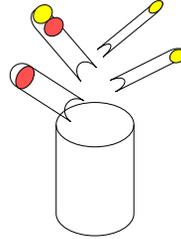


## Pontos isoelétricos de algumas proteínas

proteína	pI
pepsina	< 1,0
albumina de ovo	4,6
albumina de plasma sanguíneo	4,9
urease	5,0
$\beta$ -lactoglobulina	5,2
hemoglobina	6,8
mioglobina	7,0
quimotripsinogênio	9,5
citocromo C	10,7
lisozima	11,0



## ao final da purificação



## proteína purificada ativa



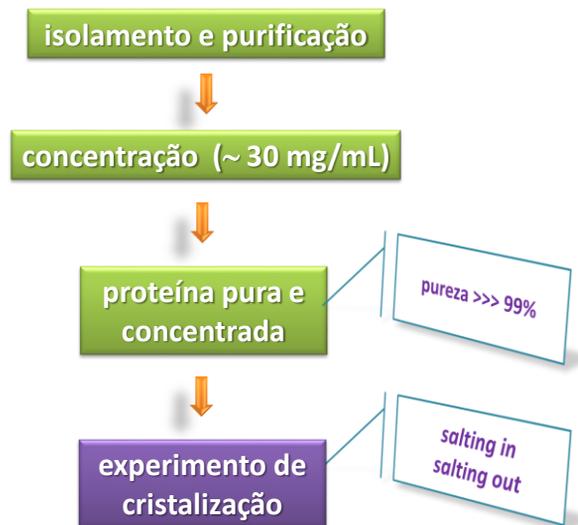
concentração ~ 1 mg/mL  
baixa quantidade



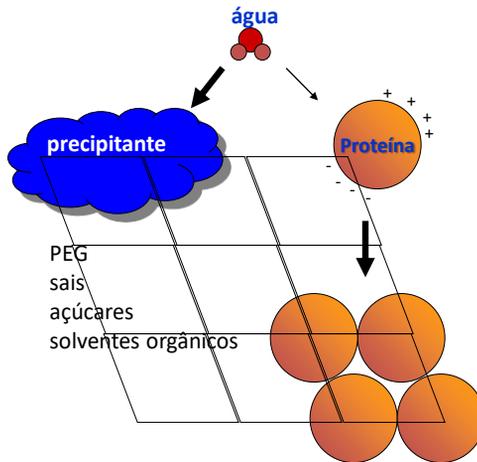
concentração ~ 10 mg/mL ou mais  
quantidade ~ 30 mg

## Métodos típicos para concentração

- .evaporação sob vácuo (cuidado com o tampão!!!)
- .liofilização (cuidado com o tampão!!!!)
- .diálise
- .filtração
- .centrifugação (centricon)
- .eletroforese preparativa
- .retenção em suportes cromatográficos



## Por que a proteína cristaliza?

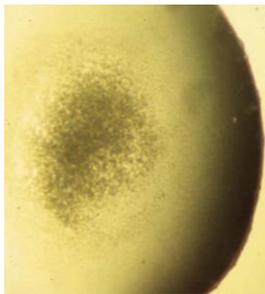


- ocorre se o processo for favorável do ponto de vista da termodinâmica
- os precipitantes removem água do meio forçando as moléculas a se associarem

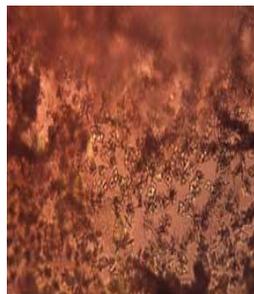
## (1) Cristal de proteína



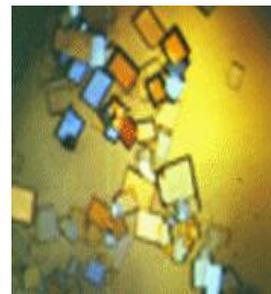
precipitação × cristalização



precipitado



micro-cristais



cristais 3D

cristalização: ainda mais arte do que científica  
 processo termodinâmico (o que se pensa entender)

## Métodos para cristalização

cristalização

precipitação

solubilidade da macromolécula

diferem em suas cinéticas

## Métodos para cristalização

cristalização

precipitação

MÉTODOS BÁSICOS

difusão de vapor (ca. 60%)

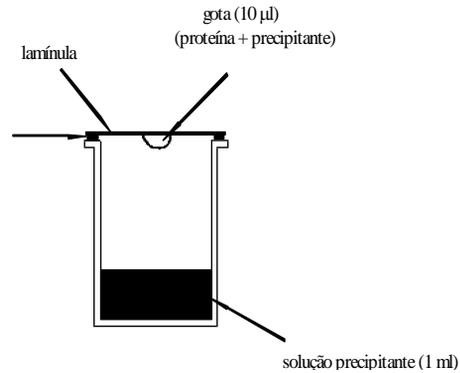
diálise (ca. 20%)

difusão em interface livre

batch

## DIFUSÃO DE VAPOR

“processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor em um meio fechado”



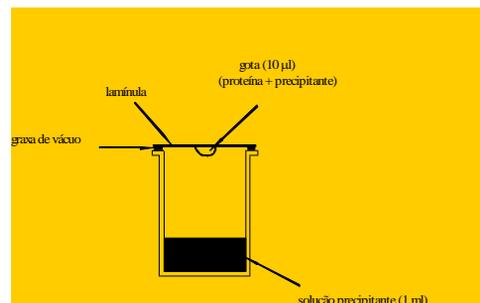
**solução inicial menos concentrada (GOTA)**

↓ perde solvente volátil ⇨ = potenciais químicos

**solução inicial mais concentrada (RESERVATÓRIO)**

## DIFUSÃO DE VAPOR

“processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor em um meio fechado”



$V_{res} \gg V_{gota} \Rightarrow$  equilíbrio atingido

pressão de vapor ← difusão de espécies voláteis  
gota = reservatório (água ou solvente orgânico)

## DIFUSÃO DE VAPOR

“processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor num meio fechado”

"hanging drop" (gota pendurada)  
 "sitting drop" (gota sentada)  
 "sandwich drop" (gota em sanduíche)

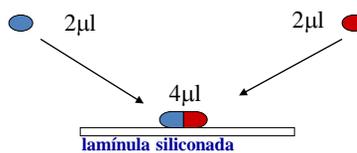
## Gota tradicional: lisozima

### tampão (precipitantes)

30% w/v PEG 5000  
 1 M NaCl  
 50 mM AcetatoNa pH 4,5

### lisozima (proteína)

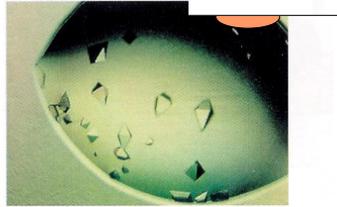
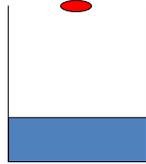
100 mg/ml  
 50 mM AcetatoNa pH 4,5





## Como crescer cristais?

- Começar com uma solução muito pura de proteína
- Criar uma solução supersaturada
- Esperar... (minutos, dias, semanas, meses...)

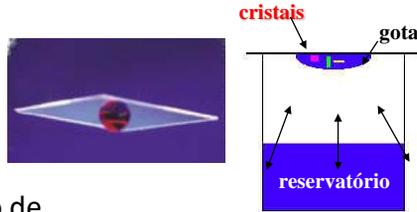


## Crescimento de Cristal de lisozima



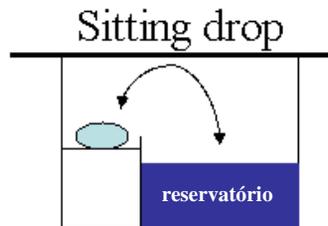
## Difusão de vapor: Hanging Drop

- largamente usado
- gota equaliza com o reservatório
- volume da gota diminui lentamente
- concentração da solução de proteína aumenta lentamente



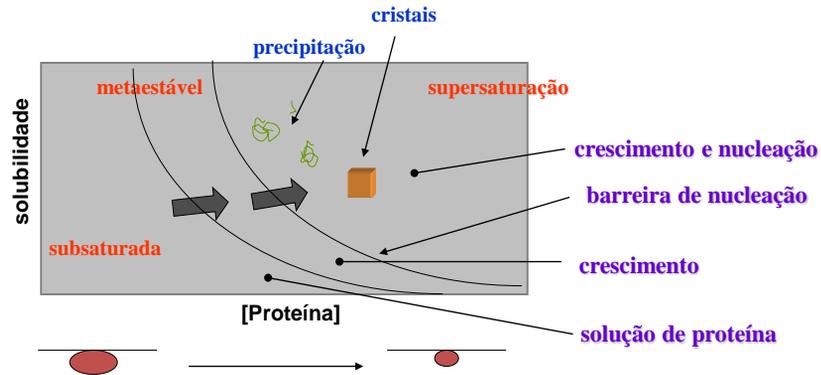
	[X]					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
[Y]	B1	B2	B3	B4	B5	B6
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	D1	D2	D3	D4	D5	D6

## Difusão de vapor: Sitting Drop

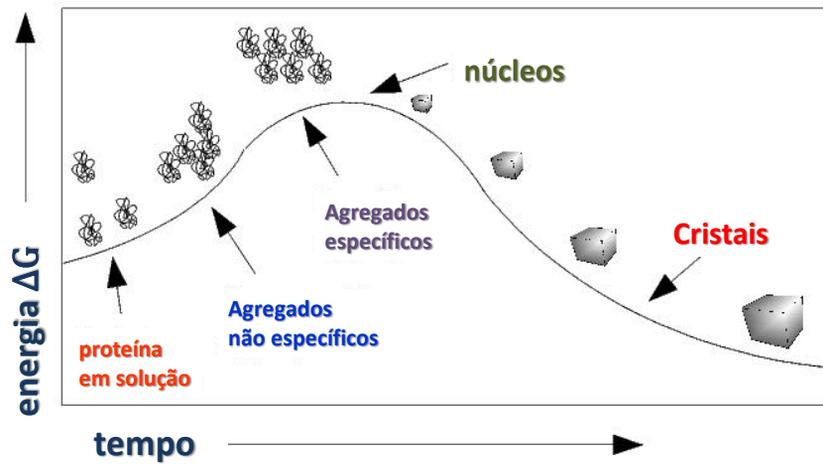


	[X]					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
[Y]	B1	B2	B3	B4	B5	B6
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	D1	D2	D3	D4	D5	D6

## Fases da solução de proteína



## Energia & Cristalização



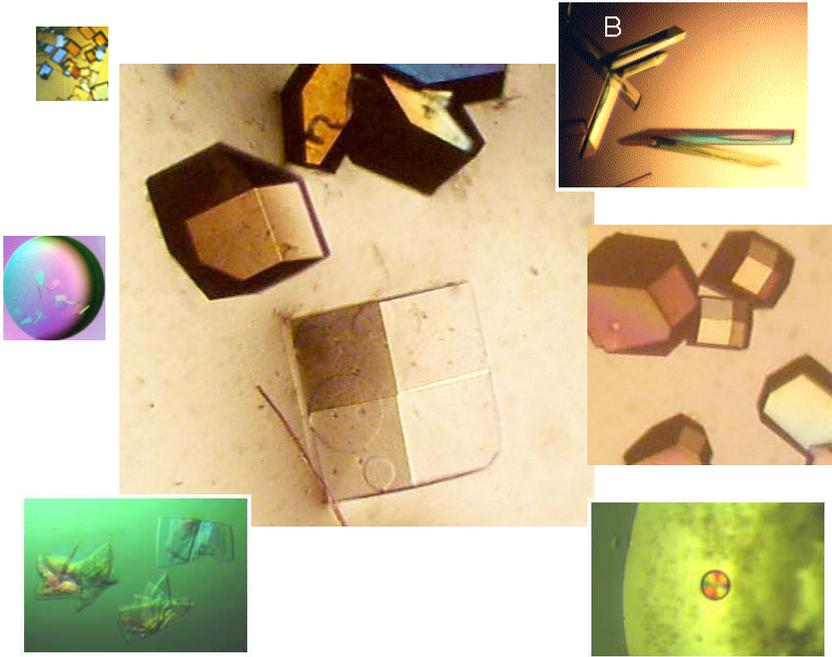
## Fatores que afetam o crescimento de cristais

- **força iônica \***
  - **íons específicos (Ca<sup>2+</sup>)**
  - **concentração da proteína \***
  - **detergentes**
  - **precipitante inorgânico**
  - **pH\***
  - **temperatura\***
  - **tempo**
  - **monodispersão\***
- \*mais importantes
- **vibrações**
  - **pressão**
  - **gravidade**
  - **pureza da proteína\***
  - **acesso ao solvente\***
  - **ligantes**
  - **etc....**

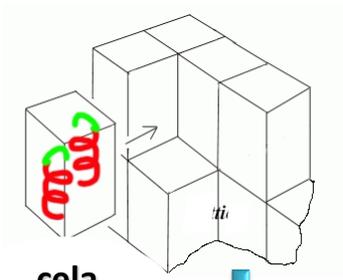
<http://www.hamptonresearch.com/>

## Experimentos iniciais de cristalização

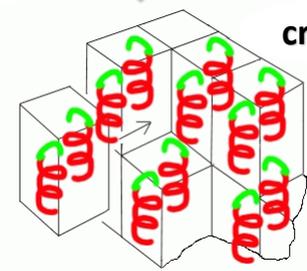




  
molécula



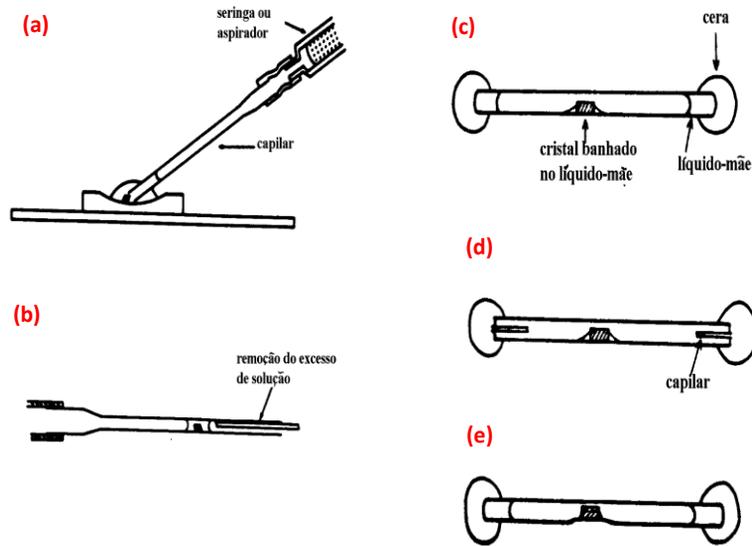
cela unitària



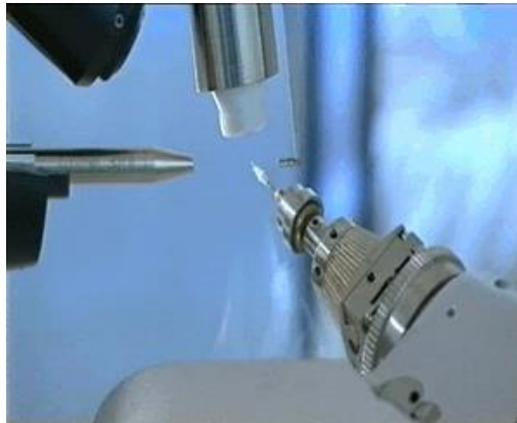
crystal

**Cristal**

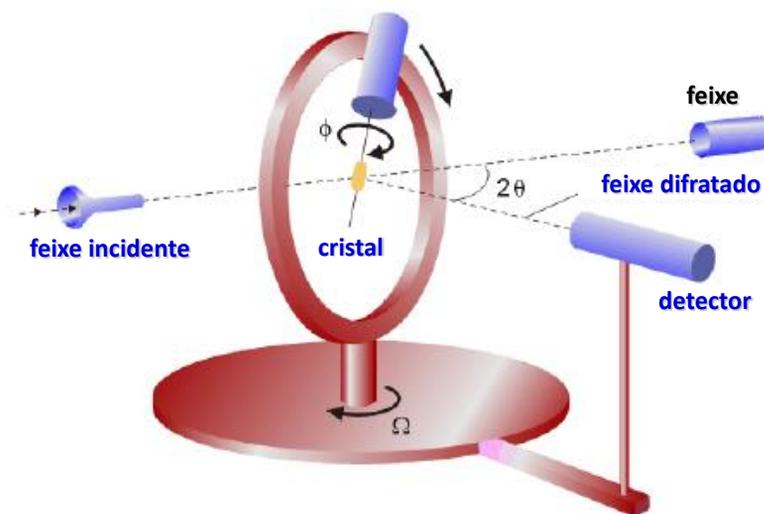
## Montagem do cristal



## Cristal pronto para coleta de dados



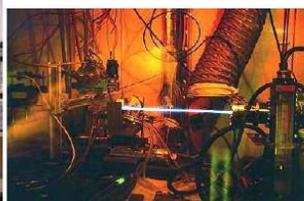
## Sistema Básico de Difração de Raio X



## Coleta de Dados



ESRF, ID14

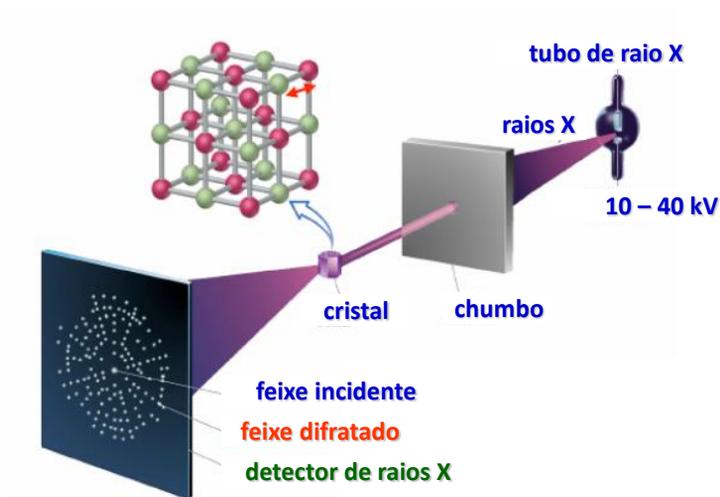


Radiação síncrotron

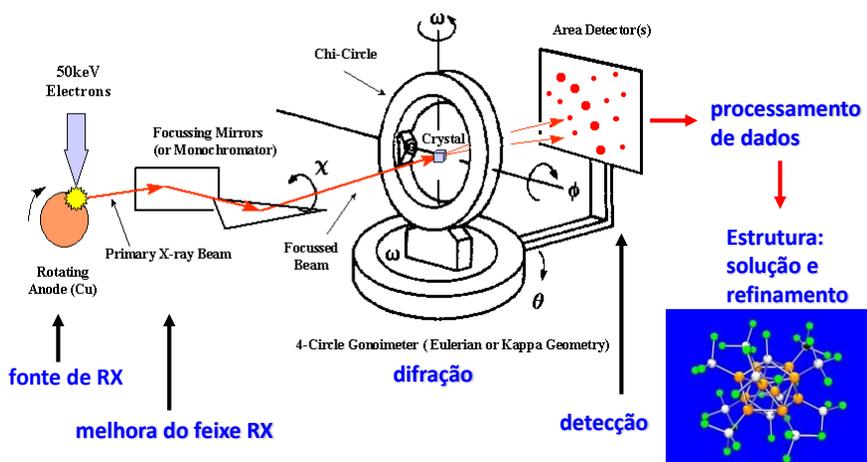


Goniômetro

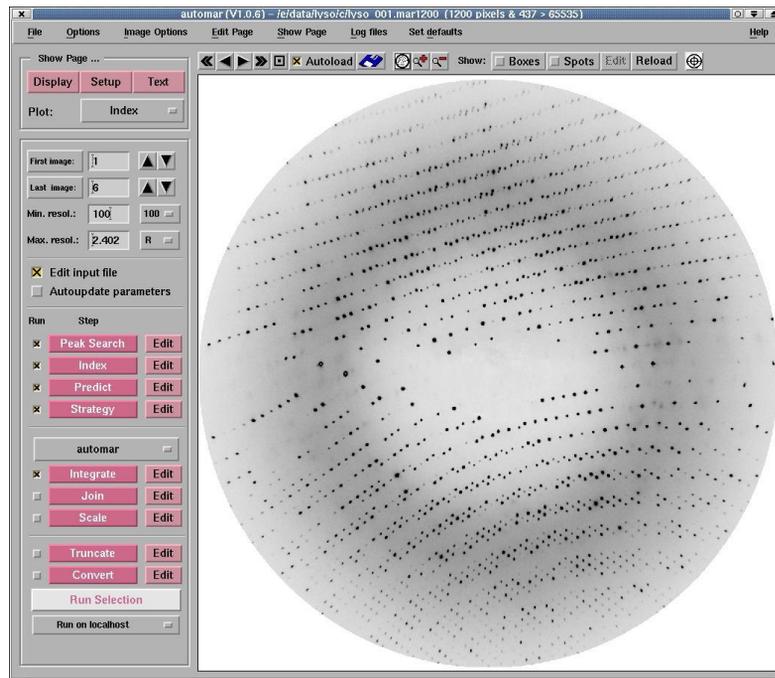
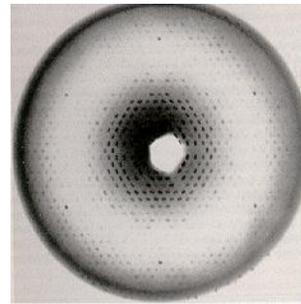
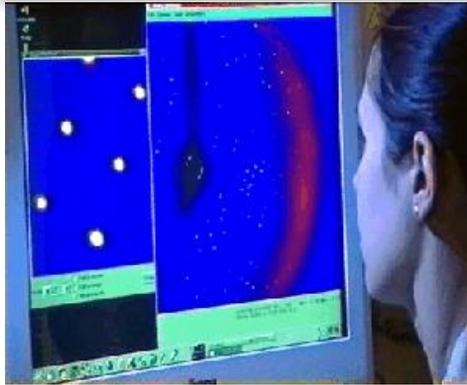
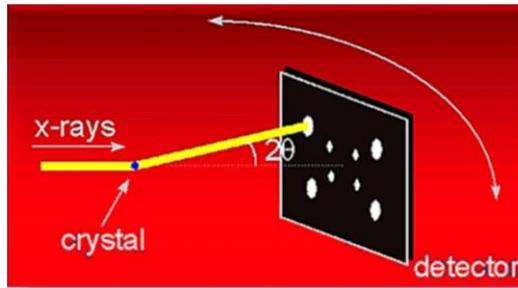
# Monocrystal



# Cristalografia



## Difração de Raio X



## Função densidade eletrônica

$$\rho(x,y,z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l |F_{(h,k,l)}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{(h,k,l)})]$$

*densidade eletrônica*

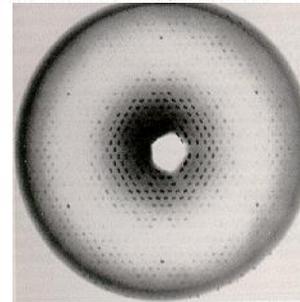
*amplitude medida*

*fases associadas*

6	0	0	295587.00	3564.27
8	0	0	476981.00	3687.43
10	0	0	77658.04	1728.93
12	0	0	76207.25	1882.20
14	0	0	54967.11	1862.80
16	0	0	661011.00	1368.47
18	0	0	28076.70	3147.65
20	0	0	129816.00	3182.27
22	0	0	87852.19	2770.71
24	0	0	165364.00	3898.54
26	0	0	42694.30	2164.06
28	0	0	6260.15	1092.76
30	0	0	2112.36	924.42
32	0	0	3942.09	1122.29
34	0	0	43610.59	2857.37
36	0	0	24431.47	3247.30
38	0	0	9730.58	1594.05

?

preparação de cristais modificados a fim de incluir átomos pesados



## Função densidade eletrônica

$$\rho(x,y,z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l |F_{(h,k,l)}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{(h,k,l)})]$$

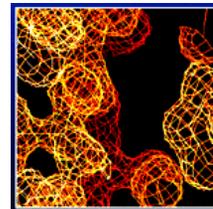
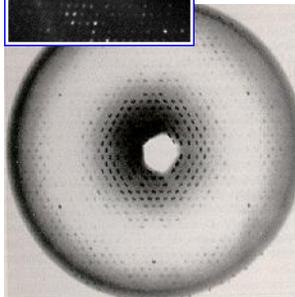
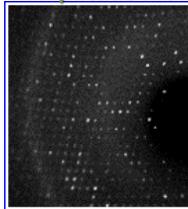
*densidade eletrônica*

*amplitude medida*

*fases associadas*

*amplitude medida*

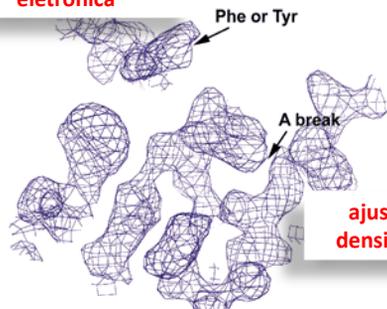
Transformada de Fourier



*densidade eletrônica*

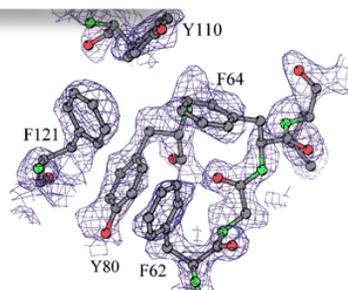
## Mapa de densidade eletrônica

mapa de densidade  
eletrônica



o que você vê +  
o que você pensa =  
o que você obtém

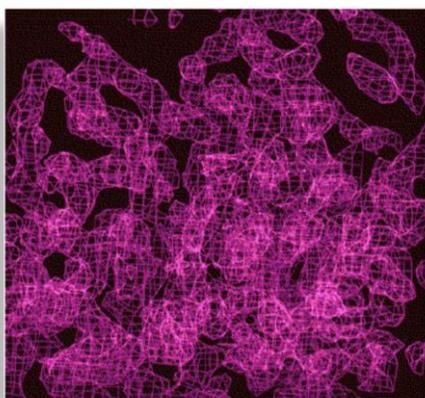
ajuste ao mapa de  
densidade eletrônica



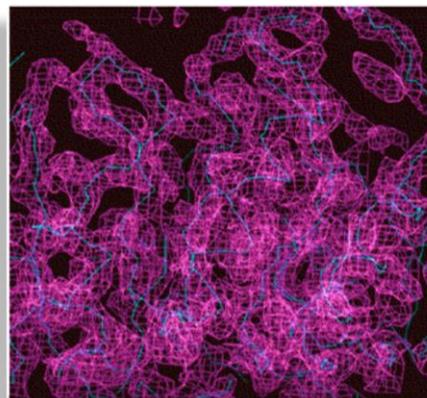
Resultado experimental

= o que você vê

## Resolvendo a estrutura



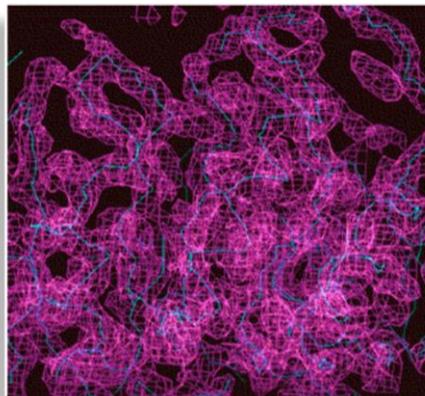
dados obtidos



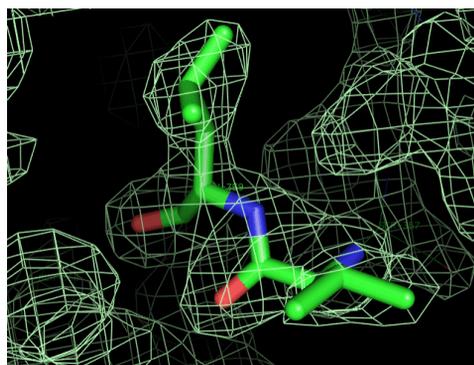
ajuste



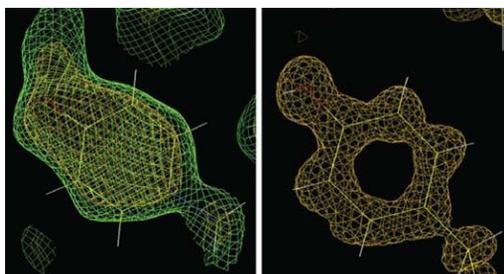
## Resolvendo a estrutura

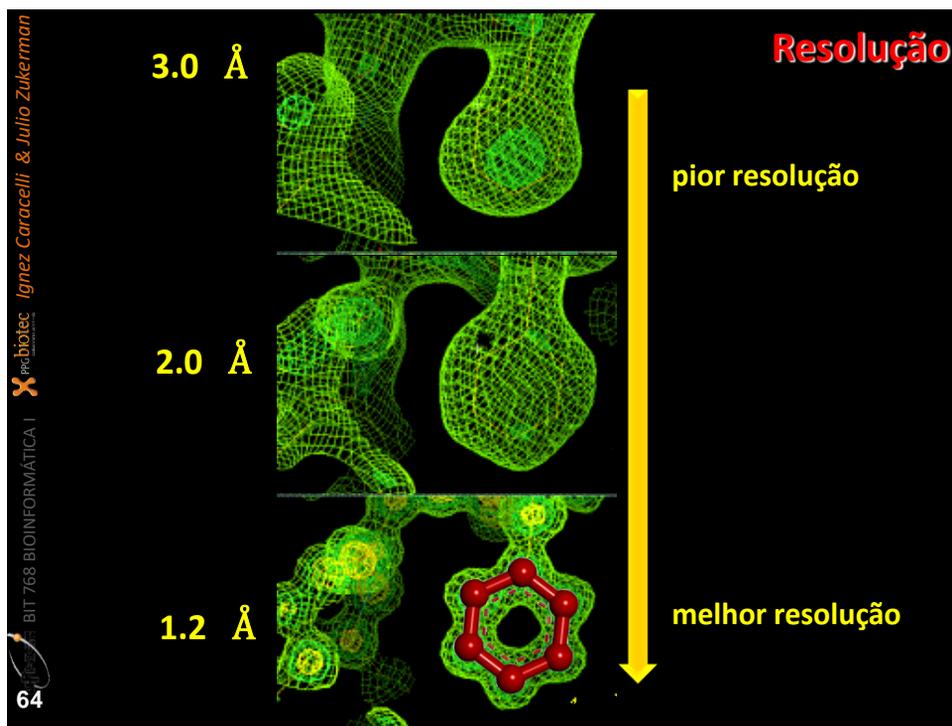
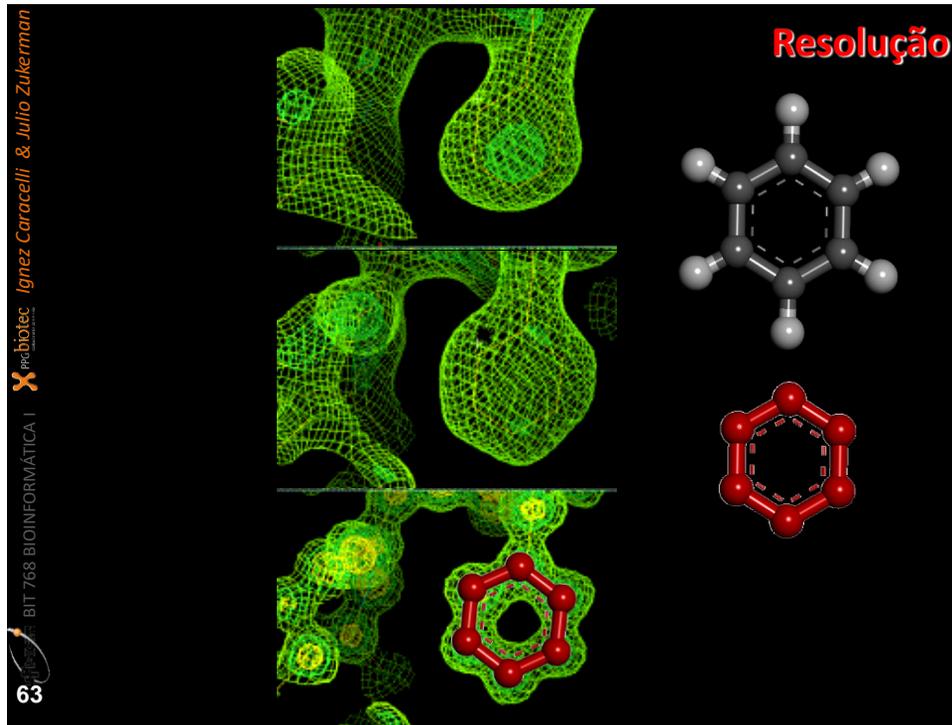


ajuste

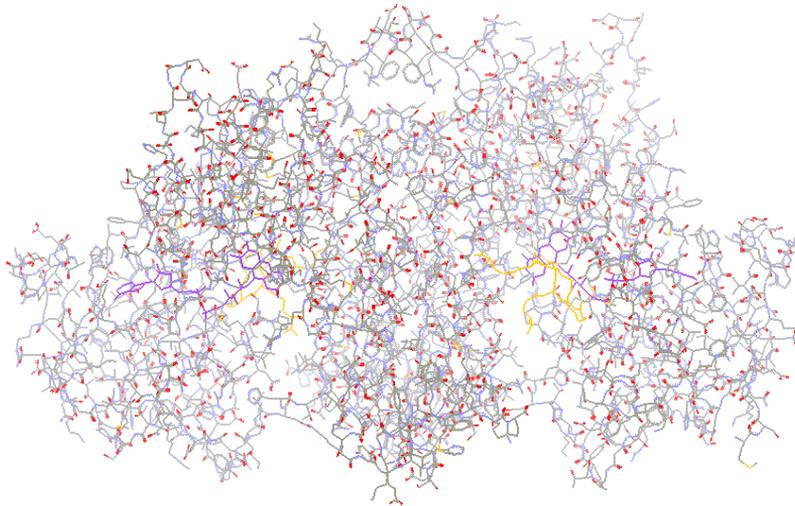
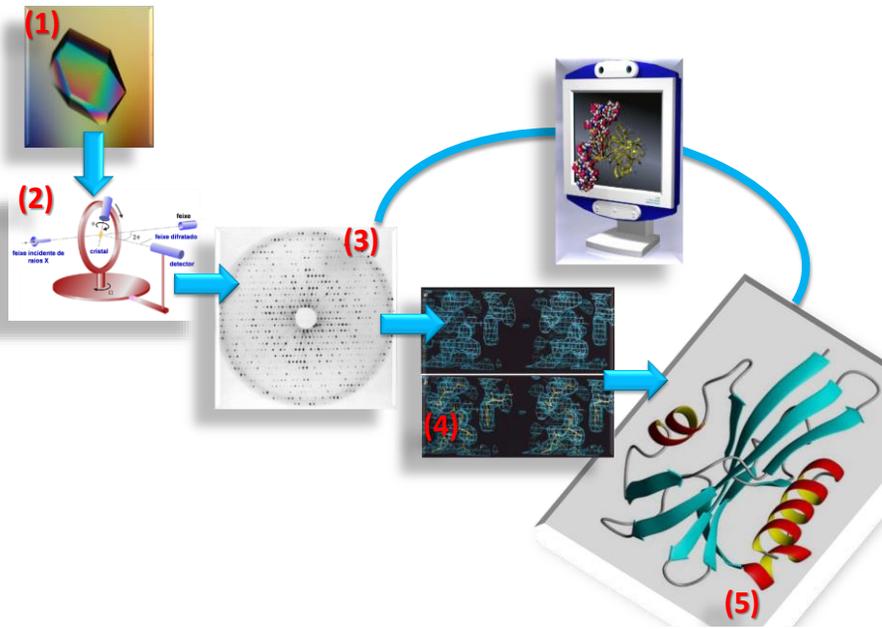


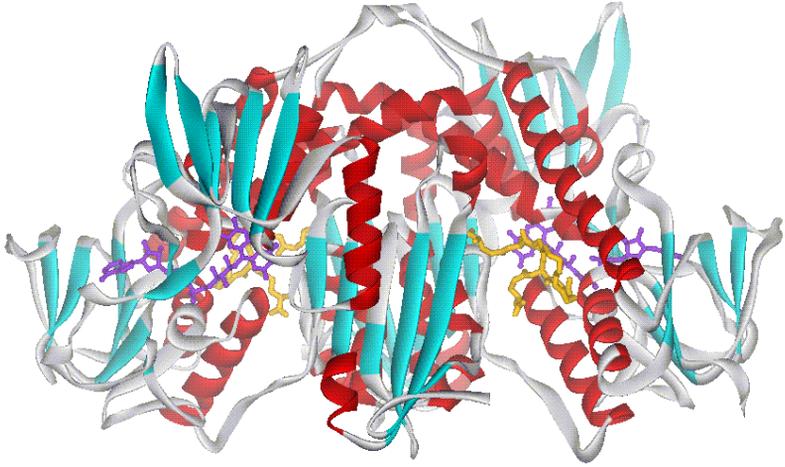
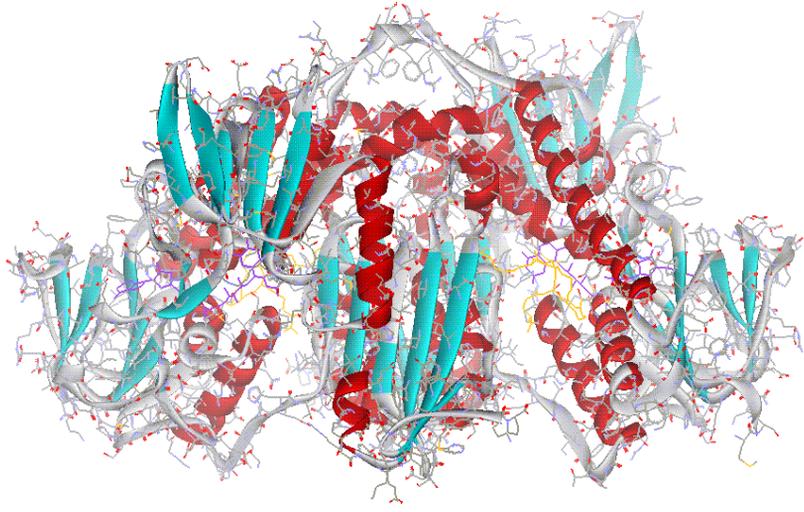
## Resolução



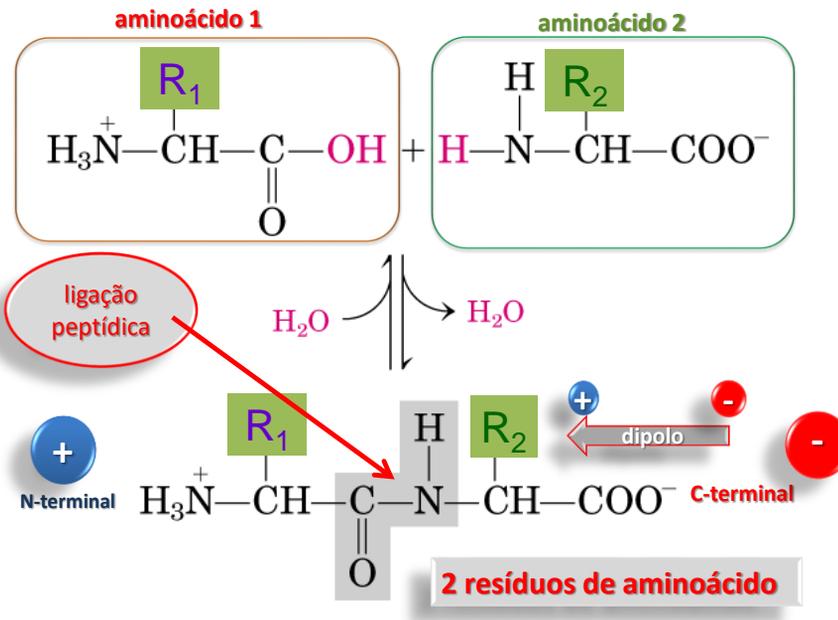


## A obtenção da estrutura tridimensional



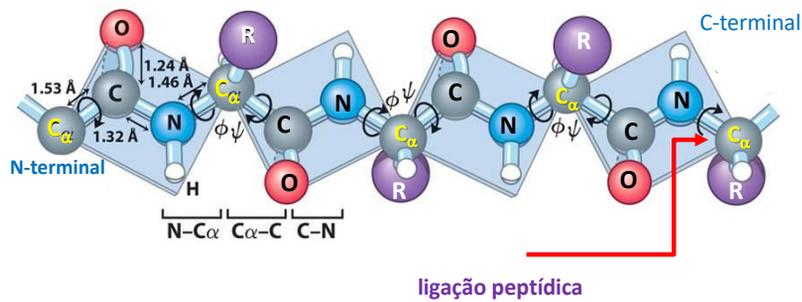


## A ligação peptídica



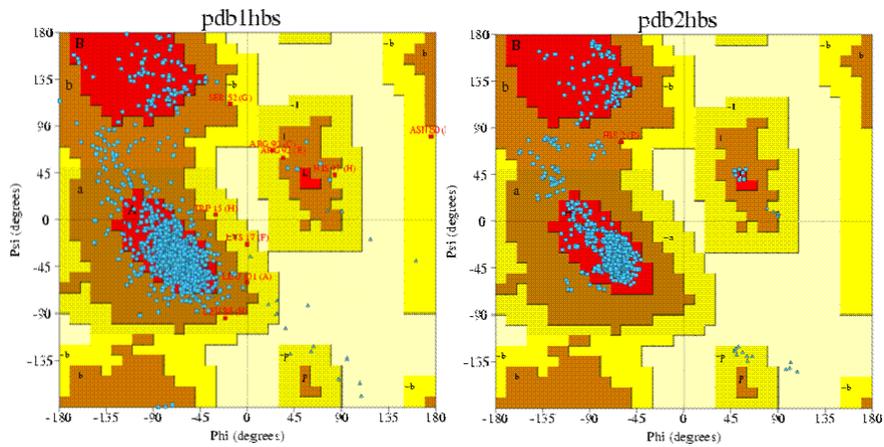
## A ligação peptídica

estrutura primária → sequência de aminoácidos



## Verificação da qualidade: Gráfico de Ramachandran

mesma proteína



1hbs – 3,00 Å  
baixa resolução

2hbs - 2,05Å  
alta resolução

## Estrutura 3D

Estrutura tridimensional =

conhecer as coordenadas de todos os átomos