



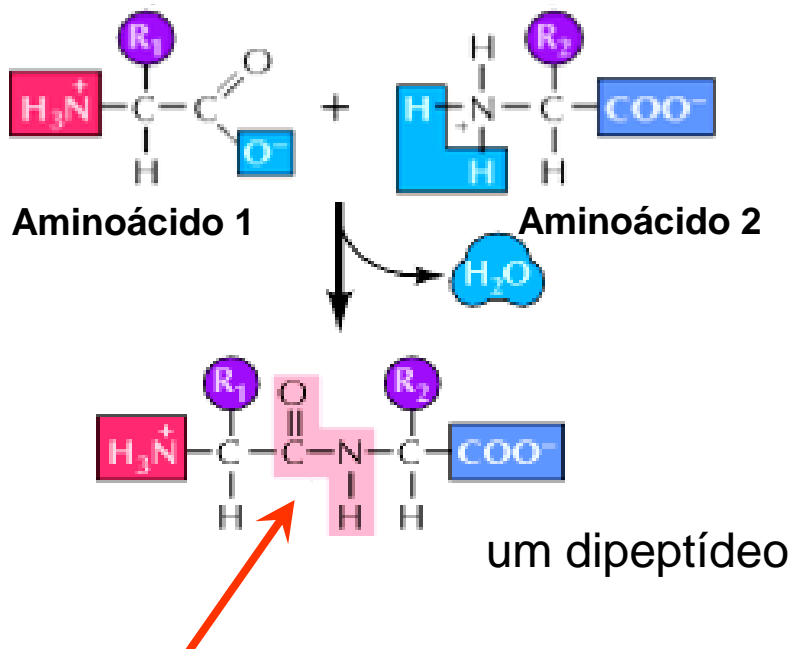
Química de Proteínas

Disciplina de Proteômica

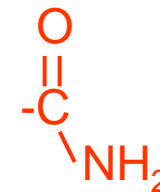
Caroline Rizzi

Doutoranda em Biotecnologia -UFPel

Ligação peptídica



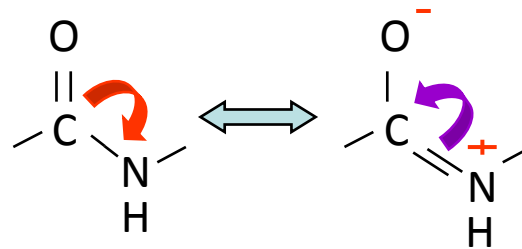
A ligação peptídica é uma amida.



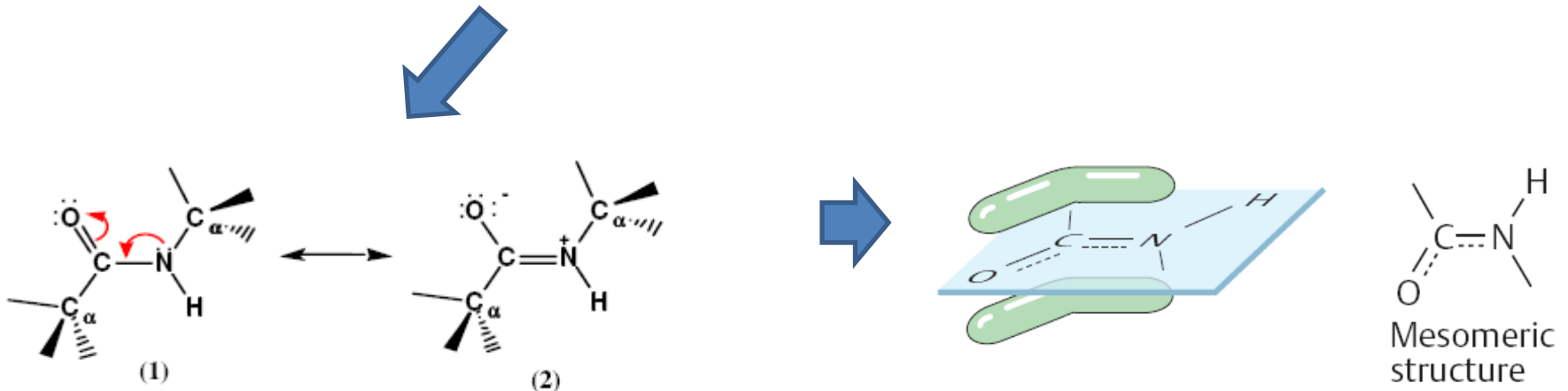
Não são reações espontâneas

A **ligação peptídica** ocorre entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino de outro aminoácido.

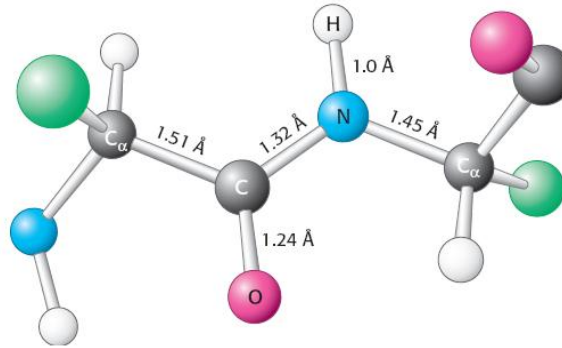
Ligação peptídica



Ressonância eletrônica: nuvem de elétrons oscilando entre o **C** e o **N**.



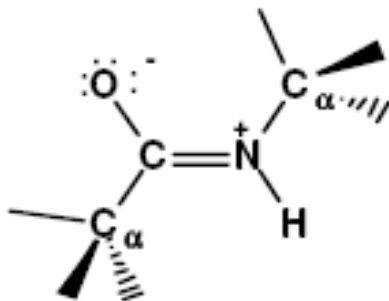
Híbrido de duas estruturas contribuintes:
✓ Elétrons distribuídos nos átomos da ligação
✓ Caráter de dupla ligação



Ressonância: Distância de 1,32 Å



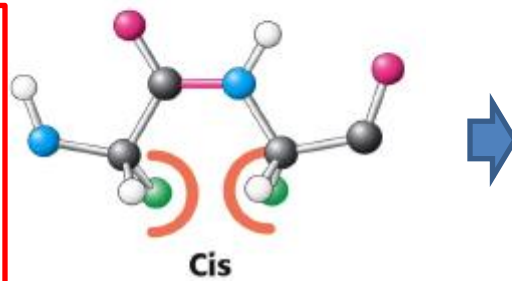
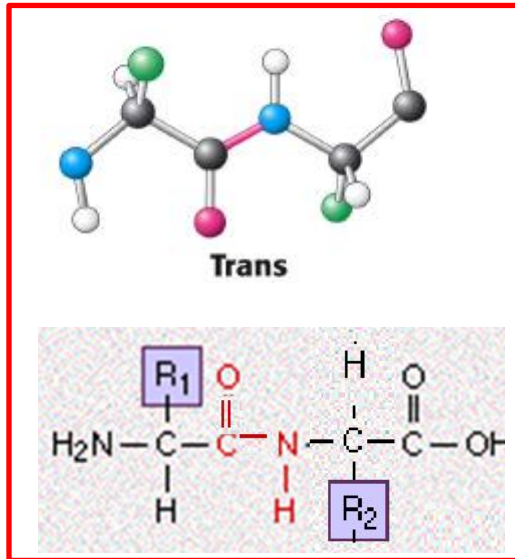
Os quatro átomos da ligação peptídica e os dois carbonos α ficam no plano com ângulos de 120° entre o C e N



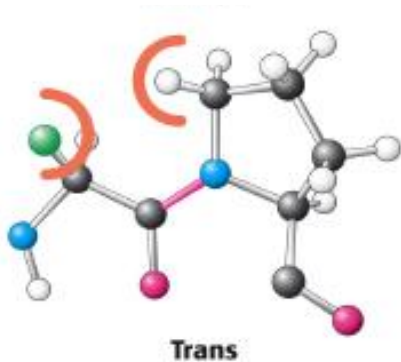
- ✓ Ligação estável
- ✓ pH ácido ou base
- ✓ Proteases
- ✓ Não há rotação
- ✓ Não tem carga elétrica
- ✓ Permite duas configurações espaciais: cis e trans

A ligação peptídica é plana e rígida!!!

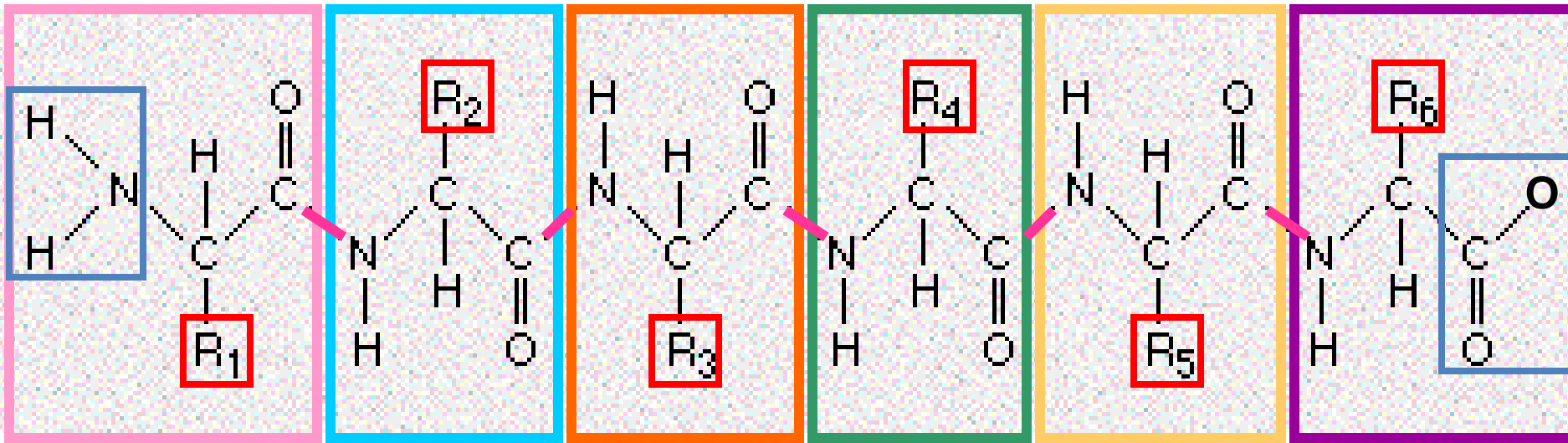
Ligação cis e trans



Trans: os grupamentos dos carbonos α estão em lados opostos da ligação peptídica



Prolina: configurações cis e trans → choques estéricos em ambas as formas



A **ponta amídica** é considerada sendo o **início** da cadeia peptídica

- **Espinha dorsal** - formada pela união dos aminoácidos
 - presença da ligação peptídica
 - formação de pontes de hidrogênio

- **Grupamento N-terminal** (NH_3^+ livre)
- **C-terminal** (COO^- livre)

Possui polaridade

- **Resíduos de aminoácidos**

- **Radicais dos aminoácidos** - ligados a espinha dorsal
 - radicais são responsáveis pelas propriedades dos peptídios

Peso molecular de 1 aa:
110 Da

A perda da carga dos NH e COOH, a interação com outros grupos R do peptídeo podem afetar os valores de pK.

Oligopeptídeos, peptídeos, proteínas

Oligopeptídeos: di, tri, tetra: até 30 aas
Polipeptídeos: 30 a 50 aas
Proteínas: 51 a 2000 aas

Classificação das proteínas

- de acordo com a conformação
 - globulares
 - fibrosas
- de acordo com os produtos de hidrólise
 - simples
 - conjugadas

Conformação

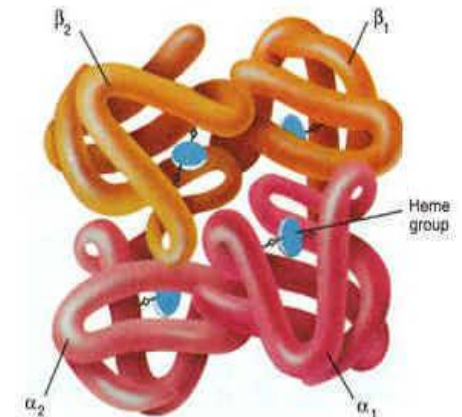
Fibrosas

- Formadas aas hidrofóbicos;
- Fibras resistentes e elásticas;
- Função estrutural e contração;
- Repetição de estruturas secundárias;
- Proteínas longas no formato de cordas;
- Elastina, queratina.



Globulares

- Regulação, catálise, proteção..
- Altamente hidrofílicas;
- Não formam agregados;
- Grande variedade de proteínas;
- Enzimas, hormônios, transportadores, receptores...



Produtos de Hidrólise

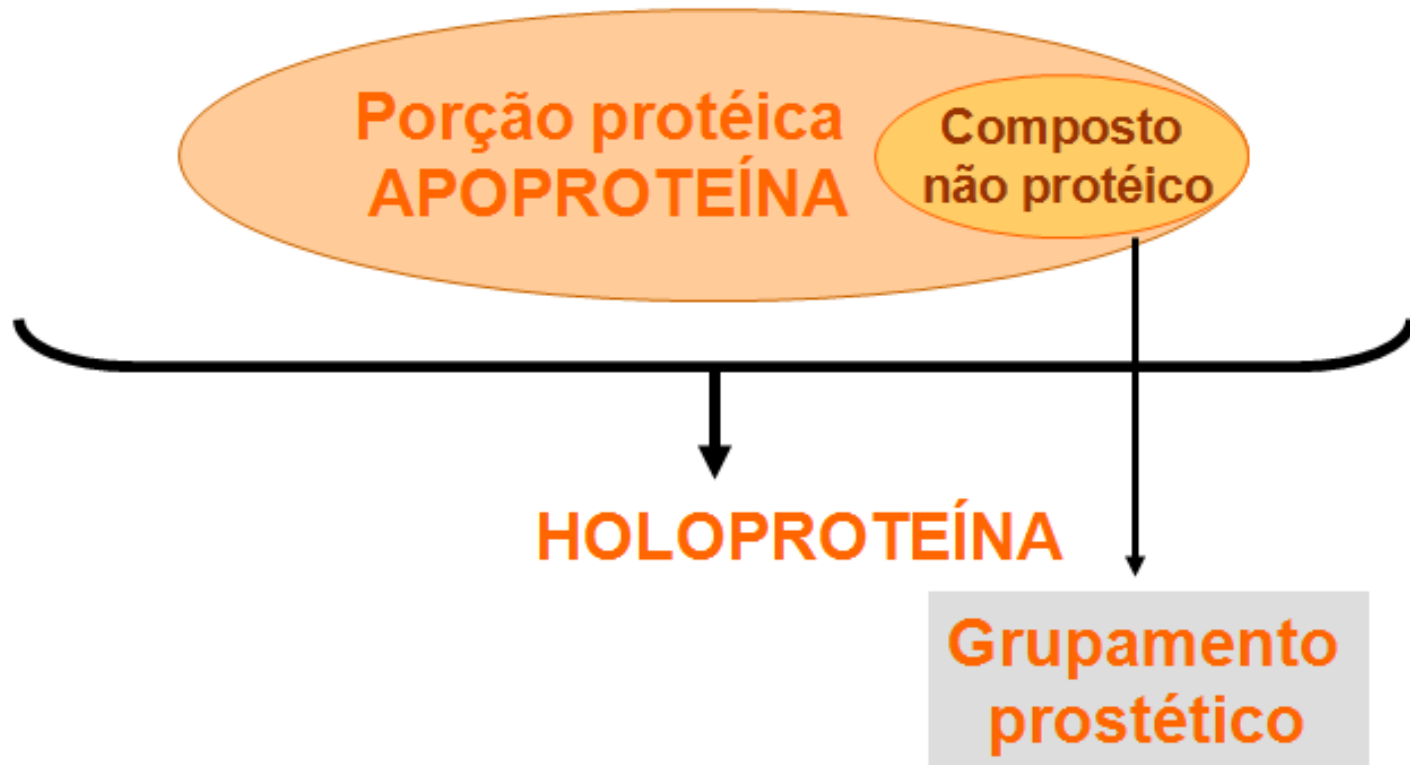
Simple

- Formadas apenas por aas

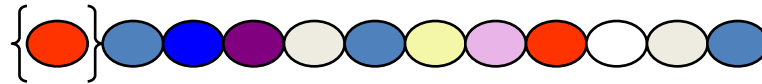
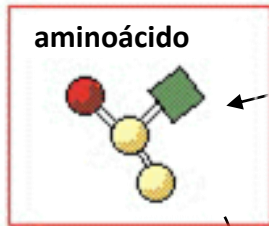
Conjugadas

- Possuem em sua estrutura aminoácidos e compostos de origem não protéica
 - Glicoproteínas
 - Fosfoproteínas
 - Lipoproteínas
 - Metaloproteínas
 - Cromoproteínas
 - Nucleoproteínas

Proteínas Conjugadas

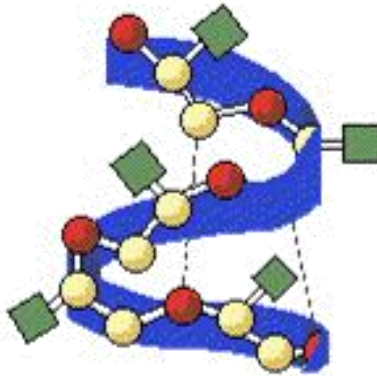


Níveis organizacionais das estruturas das proteínas



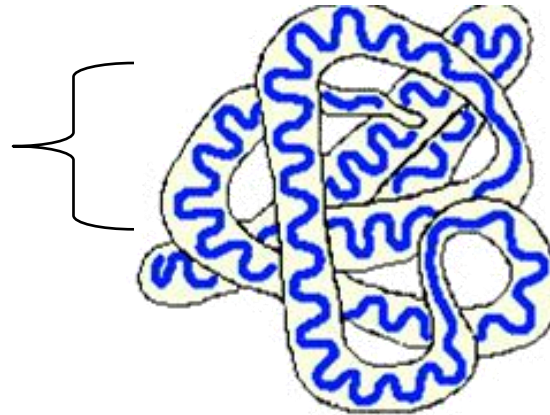
Estrutura primária: é a sequência dos aminoácidos na cadeia polipeptídica; mantida por ligações peptídicas

É o esqueleto covalente (fio do colar), formado pela seqüência dos átomos (-N-C-Ca-)n na proteína.



Estrutura secundária:

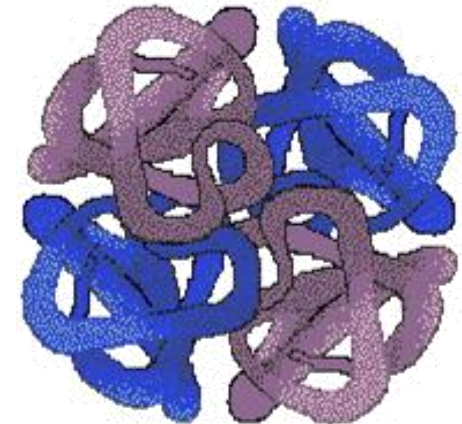

- Enovelamento de partes da cadeia
- Formada somente pelas interações dos átomos da ligação peptídica



Estrutura terciária:

- Enovelamento de uma cadeia como um todo.
- Ligações entre os átomos dos radicais R de todos os aminoácidos da molécula

x 4



Estrutura quaternária:

- Associação de mais de uma cadeia polipeptídica

Conformação protéica

- Arranjo espacial dos átomos: conformação
- Mudanças na conformação: sem quebra de ligações covalentes peptídicas
- Dobramento até a conformação mais estável
- Proteínas que estão em uma conformação as quais apresentam-se funcionais: **Proteínas Nativas**

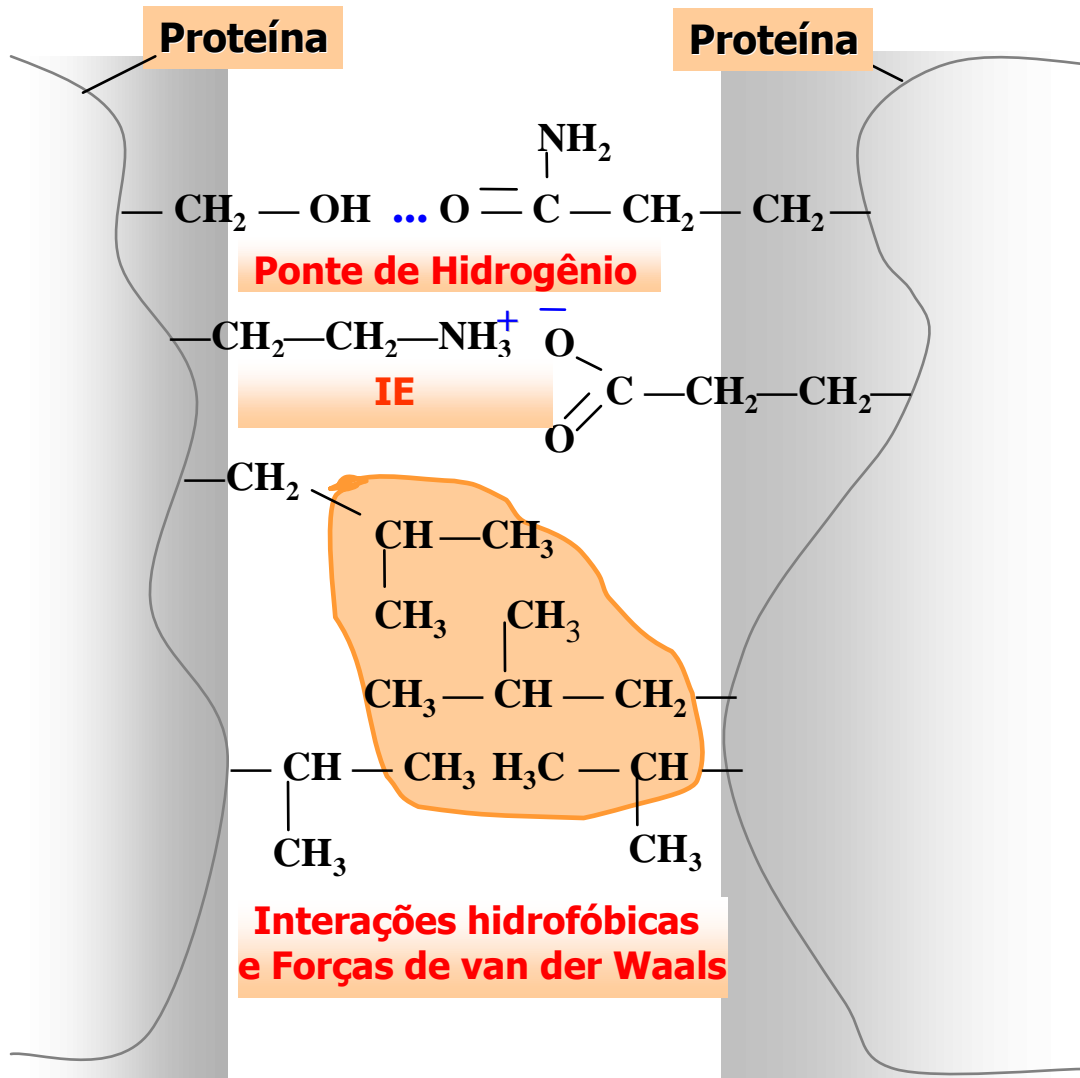


Dever de casa.....

**COMO SÃO FORMADAS E QUAIS SÃO
OS TIPOS DE ESTRUTURAS
SECUNDÁRIAS???**



Forças que mantêm a 3D



Forças não covalentes

Pontes de H

-Aminoácidos polares

Interações eletrostáticas

- Aminoácidos carregados

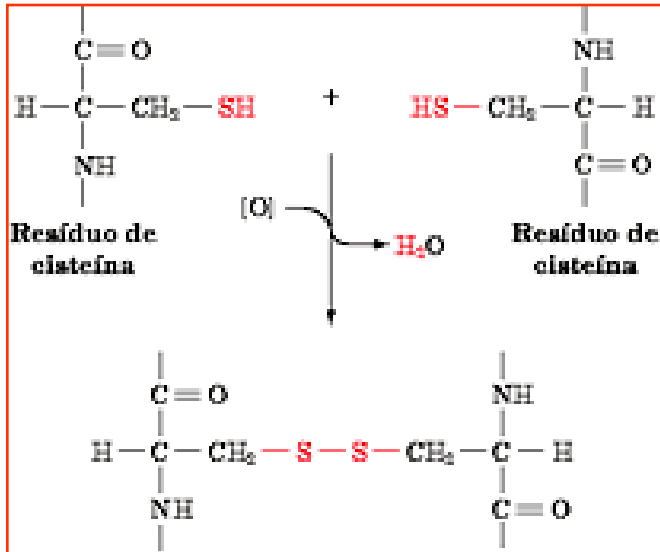
Interações hidrofóbicas

-Aminoácidos apolares

Forças de Van der Waals

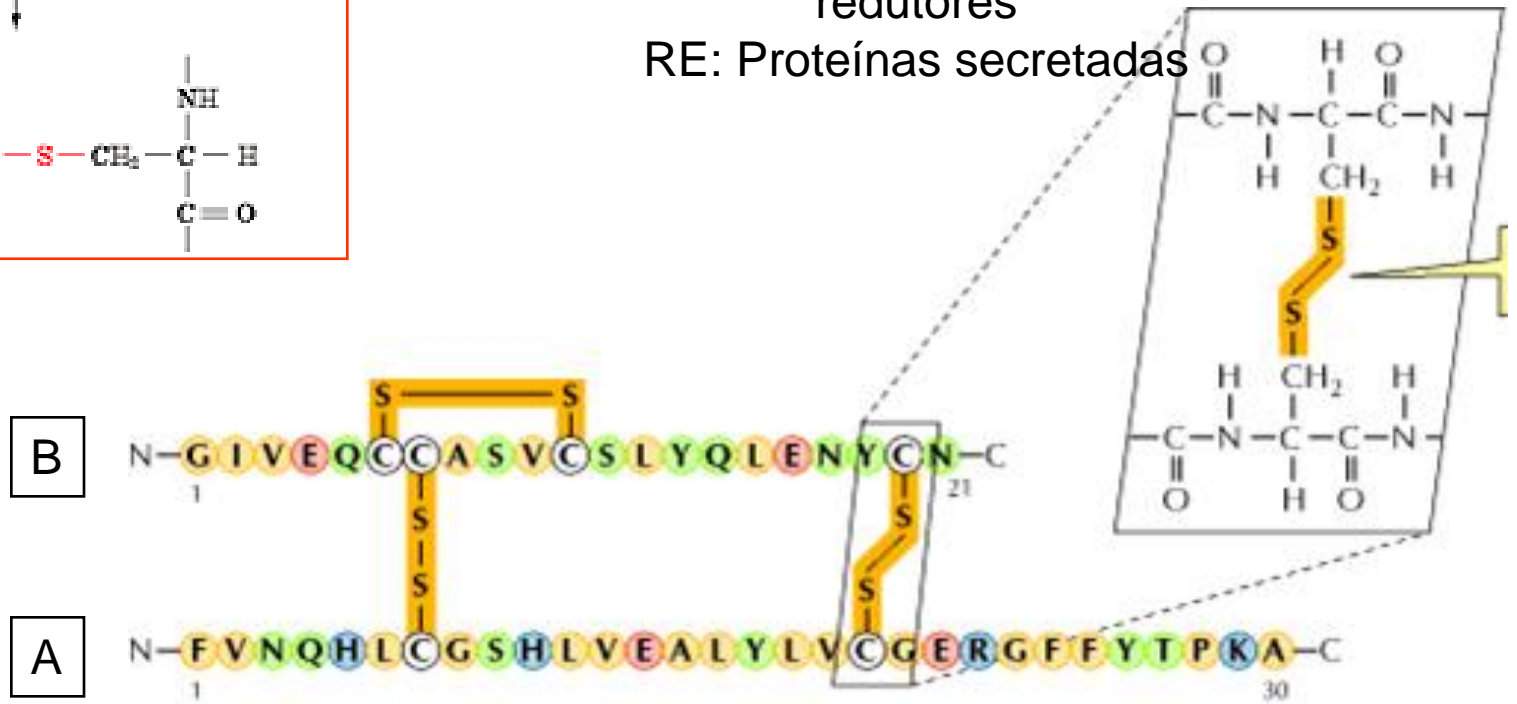
-Qualquer aminoácido

Forças que mantêm a 3D

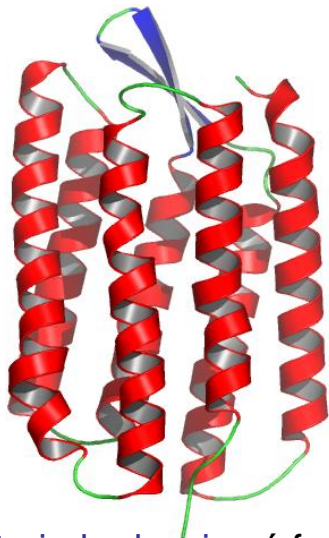


Citosol: tireodoxina e o glutaredoxina
 Pontes dissulfeto: covalentes e só
 podem ser rompidas por agentes
 redutores

RE: Proteínas secretadas



Insulina



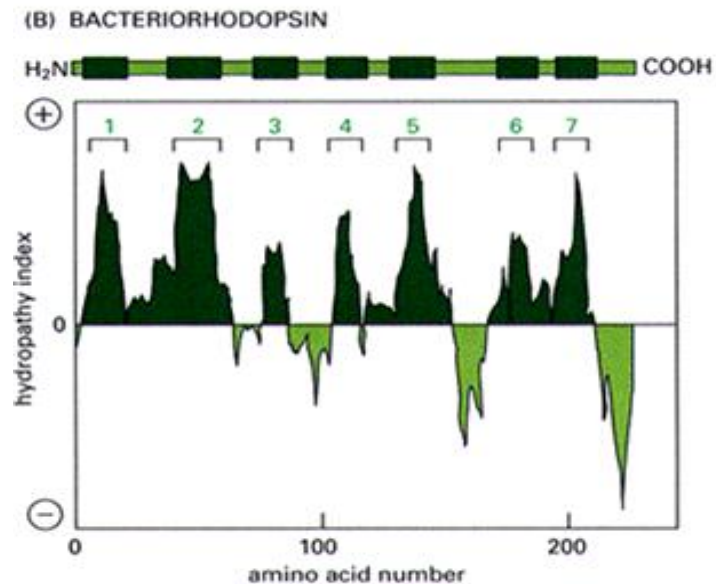
A bacteriorhodopsina é formada por 7 segmentos de α -hélices apolares, que delimitam um canal interno de natureza polar.

O perfil hidropático da bacteriorhodopsina prevê 7 regiões hidrofóbicas e 3 regiões hidrofílicas.



Perfil hidropático

- ✓ Soma dos índices hidropáticos a cada 9 resíduos de aminoácidos
- ✓ Permite prever regiões da proteína que interagem com a membrana plasmática ou com os meios interno/externo.



Folding e expressão de proteínas recombinantes



Proteínas Nativas: maior solubilidade
que as maldobradas
Atividade Biológica: estrutura nativa

Folding e expressão de proteínas recombinantes

Formação de corpos de inclusão

- Alta densidade;
- Podem conter partículas da membrana externa;
- Altos níveis de expressão, mesmo de proteínas endógenas;
- Não relacionada com hidrofobicidade, peso molecular;
- Só relacionada com ausência de formação de pontes S-S.



Limitar a velocidade da formação de proteínas recombinantes





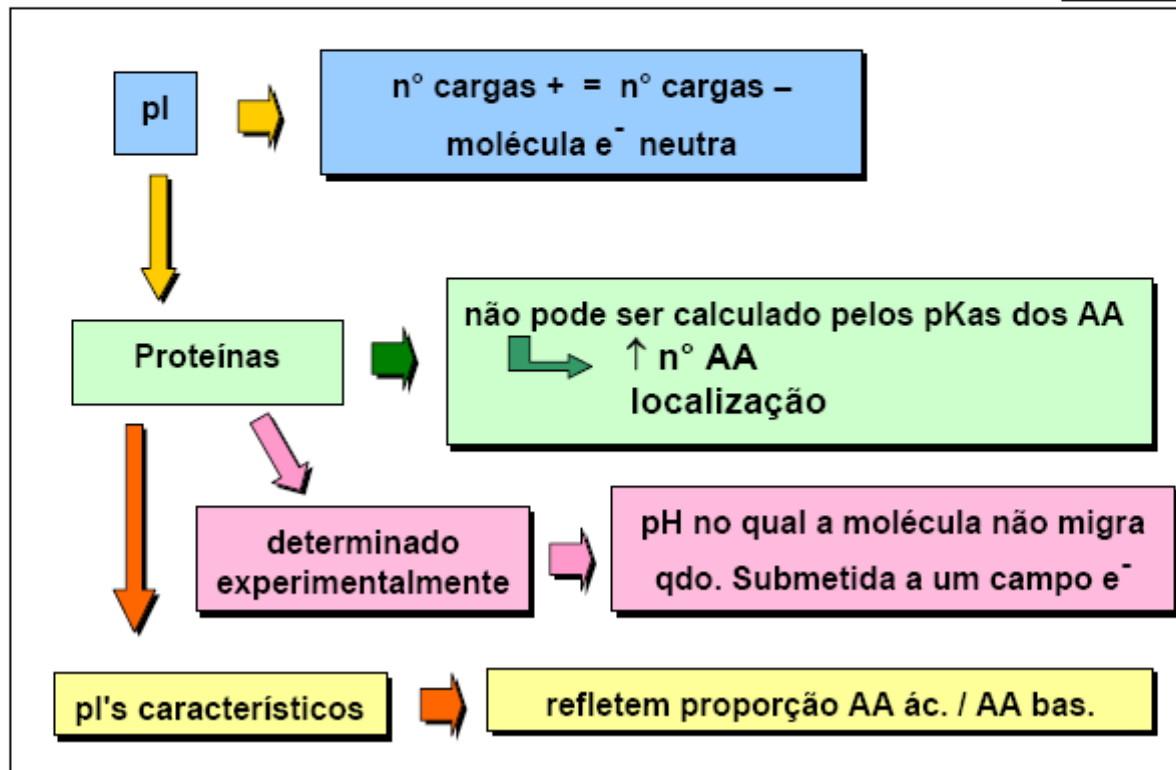
PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS

Ponto isoelétrico

Carga elétrica total

\sum cargas dos R dos AA

PKa
PH do meio



Ponto isoelétrico

É no ponto isoelétrico que a proteína apresenta-se com menor solubilidade!!!!



pI das proteínas
 n° R ács. desprotonados $\text{COO}^- = n^{\circ}$ R bás. protonados NH_3^+

1 Proteínas pI 14
ácidas ← ————— → básicas

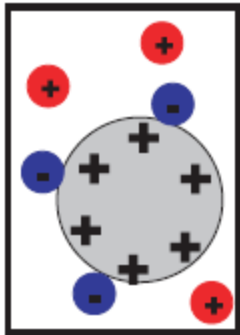
$\text{pH} < \text{pI} \longrightarrow$ carga líquida + (COOH e NH_3^+)

$\text{pH} > \text{pI} \longrightarrow$ carga líquida - (COO^- e NH_2)



Importância do cálculo do pI

1. Vector NTI
2. Expasy
 - ✓ Focalização isoeétrica
 - ✓ Solubilidade
 - ✓ Purificação:
 - ✓ Proteínas ácidas:
 - ✓ $\text{pH} > \text{pI}$: troca iônica
 - ✓ Proteínas básicas:
 - ✓ $\text{pH} < \text{pI}$: troca catiônica



ion exchange

Analysis	
Analysis	Entire Protein
Length	326 aa
Molecular Weight	34688.97
1 microgram =	28.828 pMoles
Molar Extinction coefficient	80870
1 A[280] corr. to	0.43 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	2.33 AU
Isoelectric Point	5.63
Charge at pH 7	-2.99

1	MTDVSRKIRA	WGRRLMIGTA	AAVWLPGLVG	LAGGAATAGA	FSRPGLPVEY
51	LQVPSPMGR	DIKVQFQSGG	MNSPAVYLLD	GLRAQDDYNG	WDINTPAFEW
101	YYQSGLSIVM	PVGGQSSFYS	DWYSPACGKA	GCQTYKWETF	LTSELPQWLS
151	ANRAVKPTGS	AAIGLSMAGS	SAMILAAYHP	QQFIYAGSLS	ALLDPSQGMG
201	PSLIGLAMGD	AGGYKAADHW	GPSSDPAWER	NDPTQQIPKL	VANNTRLWVY
251	CGNGTPNELG	GANIPAEFLE	NFVRSSNLKF	QDAYNAAGGH	NAVFNFPNG
301	THSWEYWGAQ	LNAMKGDLOS	SLGAG*		

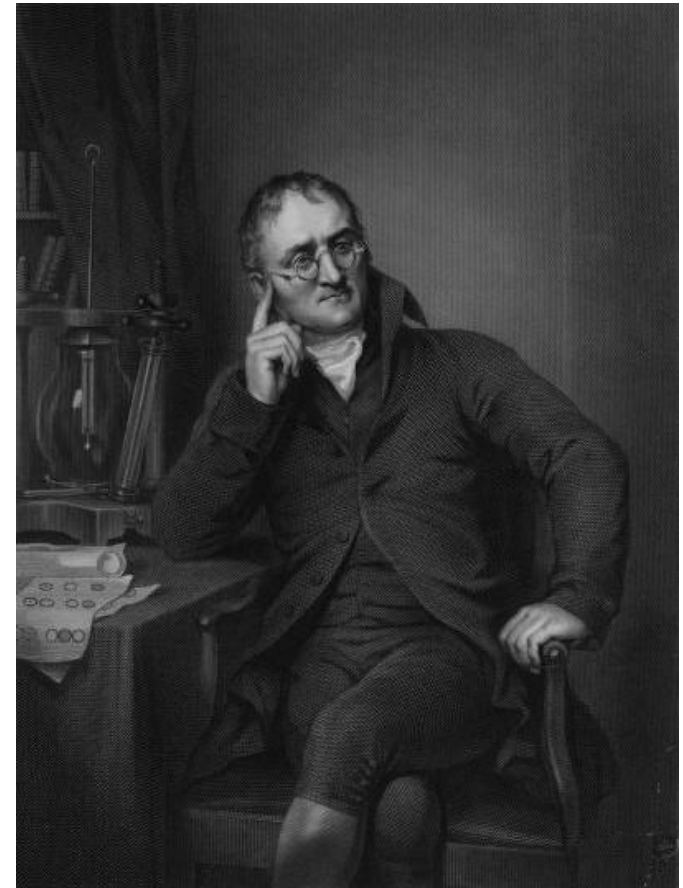
Calculado através de todos os NH e COOH livres

Massa Molecular

Unidades de massa atômica “**Atomic Mass Unit**” (**amu** ou **u** ou **Da**): utilizada para expressar a massa molecular ou peso atômico

$$1 \text{ Da: } 1/12 \text{ da massa do } ^{12}\text{C}$$
$$1 \text{ u} = 1.660\,538\,782(83) \times 10^{-24} \text{ g}$$

1 átomo de Hidrogênio possui cerca de 1 Da



Massa Molecular

Cálculo através de programas: Vector e ExPASy

Estimativa: Calculado através da soma da massa média dos isótopos

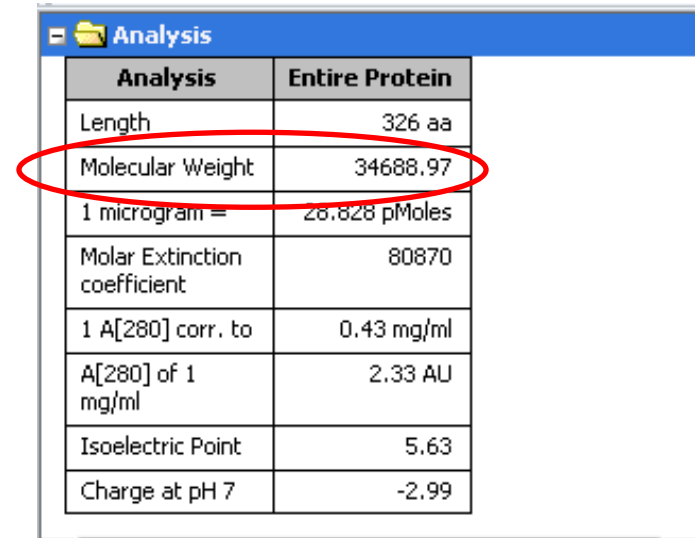
Importância:

Gel 2D

Concentração de proteínas por filtração
Gel filtração

Determinação:

Espectrometria de massas
Gel filtração



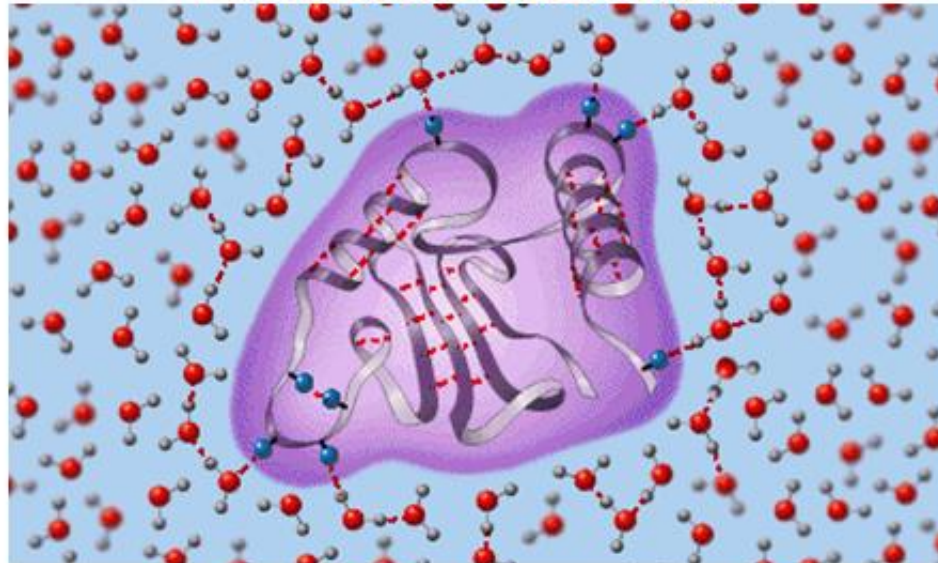
Analysis	Entire Protein
Length	326 aa
Molecular Weight	34688.97
1 microgram =	28.828 pMoles
Molar Extinction coefficient	80870
1 A[280] corr. to	0.43 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	2.33 AU
Isoelectric Point	5.63
Charge at pH 7	-2.99

Solubilidade de Proteínas

Fatores intrínsecos

Depende da quantidade de pontes de H que os seus grupos polares podem formar com a água

+ hidrofílica ↑ solubilidade
+ hidrofóbica ↓ solubilidade



Solubilidade de Proteínas

Fatores extrínsecos: perturbação das interações solvente-proteína

Concentração de eletrólitos no meio

↓ [sal] → interação íons salinos e cargas das proteínas



↑solubilidade
(*SALTING IN*)

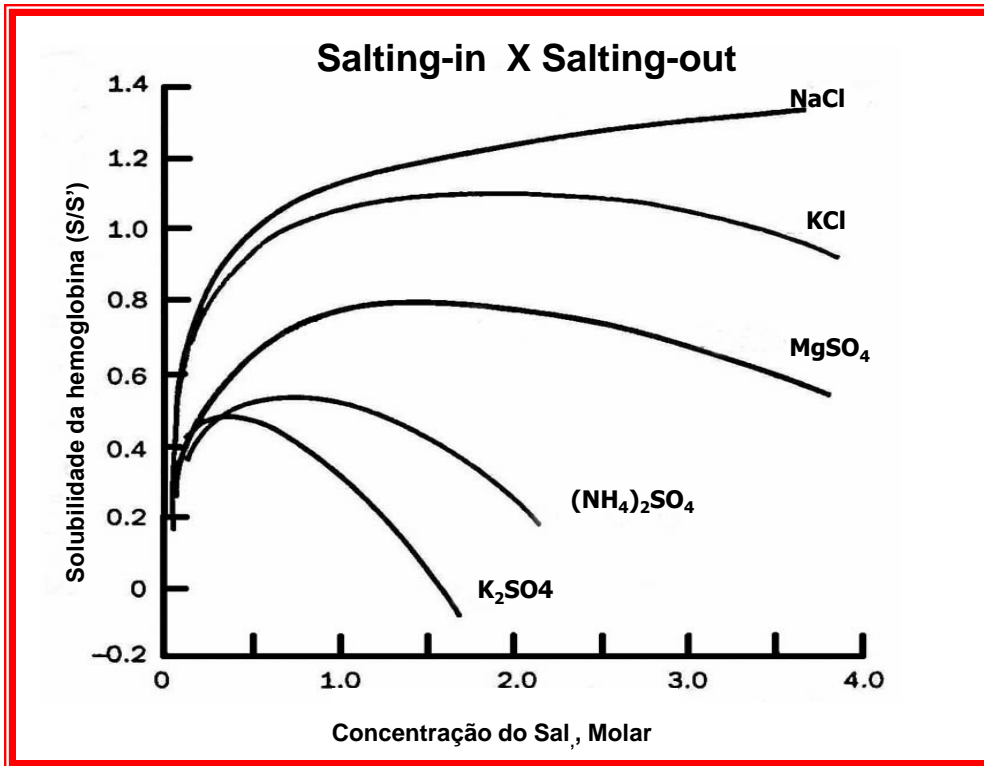
↑ [sal] → competição entre íons salinos e cargas das proteínas pela água



↓solubilidade (ppt)
(*SALTING OUT*)

Precipitação por sais

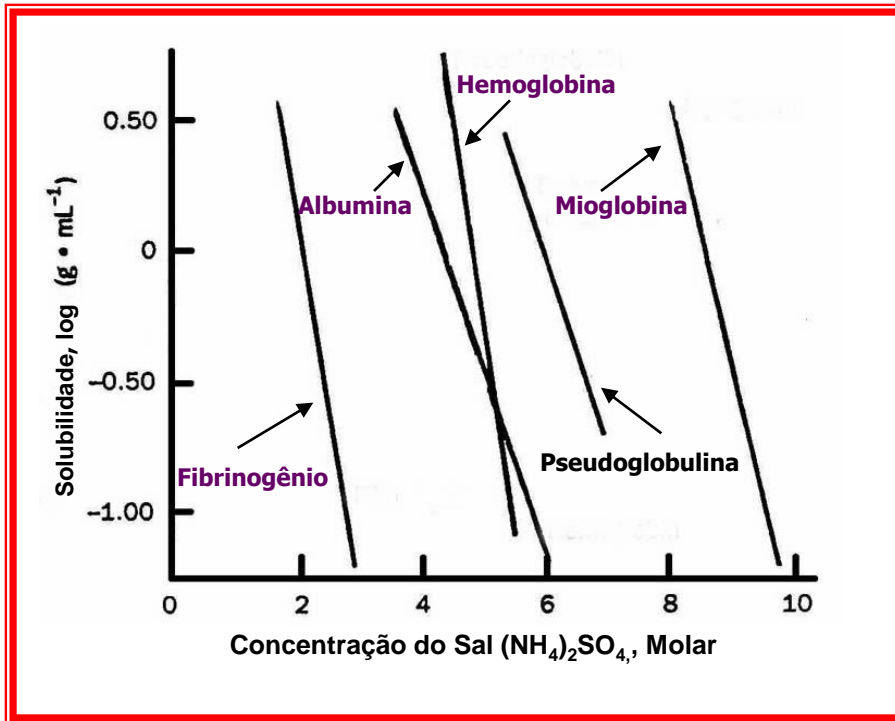
Efeito de diferentes sais sobre a solubilidade da hemoglobina.



Baixa concentração: solubilidade \uparrow
(íons do sal ajudam a reforçar a camada de solvatação)

Alta concentração: solubilidade \downarrow
(competição pelas moléculas de água disponíveis)

Sais com ânions divalentes são mais eficientes do que os monovalentes na precipitação de proteínas.



Proteínas apresentam diferentes sensibilidades para a precipitação salina.

- precipitam primeiro:
 - proteínas maiores
 - proteínas mais hidrofóbicas

Solubilidade de Proteínas

Fatores extrínsecos

pH do meio

+ próximo do pI



↓solubilidade (ppt)



Diminuem as forças repulsivas entre as moléculas das proteínas
Agregados= precipitação

Solventes orgânicos

Anfipáticos: acetona, etanol...



Infiltram-se no interior e superfície das proteínas

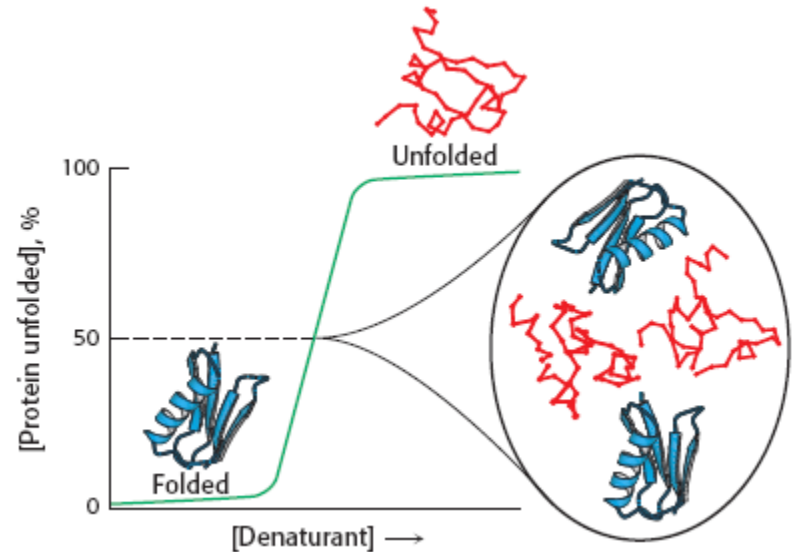


Competição pela água, alteração do do interior hidrofóbico, diminuição da [água]
Precipitação

Desnaturação e solubilização de proteínas

Agentes desnaturantes:

- ✓ Agentes redutores
- ✓ Altas temperaturas
- ✓ pH
- ✓ Detergentes



Agentes solubilizantes:

- ✓ Uréia, guanidina
- ✓ Detergentes

