

A Estrutura Tridimensional das Proteínas

Aminoácidos ligados formam uma cadeia protéica (polipeptídica). As unidades de repetição são planos de amida que contêm ligações peptídicas. Esses planos de amida podem girar em torno de seus átomos de carbono de modo a criar as conformações tridimensionais de proteínas. Há mais de 50 anos, Linus Pauling previu que os aminoácidos ligados poderiam formar uma α -hélice. Anos depois, sua previsão foi confirmada quando se descobriu que a mioglobina, uma proteína ligante de oxigênio, era formada pelas α -hélices de Pauling. Esse tipo de dobramento local da cadeia protéica é chamado de estrutura secundária, com a seqüência linear sendo a estrutura primária. A conformação de uma cadeia protéica completa é a sua estrutura terciária. A mioglobina, uma molécula que se liga fortemente ao oxigênio, tem uma única cadeia protéica. A hemoglobina, uma proteína com quatro subunidades tipo mioglobina combinadas, tem uma estrutura quaternária. Isso permite que ela mude da conformação oxi, em que se liga ao oxigênio nos pulmões, para a forma desoxi, quando libera o oxigênio para os tecidos em atividade. A descoberta das relações entre estrutura e função na hemoglobina levou à compreensão do modo como as enzimas complexas com múltiplas subunidades regulam as vias metabólicas.

4.1 Como a Estrutura das Proteínas Determina Sua Função?

Níveis de Estrutura das Proteínas

Proteínas biologicamente ativas são polímeros que consistem em aminoácidos unidos por ligações peptídicas covalentes. Várias conformações diferentes (estruturas tridimensionais) são possíveis para uma molécula tão grande quanto a proteína. Dessas diversas estruturas, poucas têm atividade biológica – estas são chamadas de **conformações nativas**. Muitas proteínas não têm estrutura repetitiva regular óbvia. Como consequência disso, elas são freqüentemente descritas como tendo grandes segmentos de “estrutura aleatória” (também chamada de espiral aleatória). O termo “aleatório”, na verdade, é inadequado, já que a mesma estrutura é encontrada na conformação nativa de todas as moléculas de uma determinada proteína e essa conformação é necessária para seu funcionamento correto. Devido a essa complexidade, as proteínas são definidas em quatro níveis de estrutura.

A **estrutura primária** é a ordem na qual os aminoácidos são ligados de forma covalente. O peptídeo Leu-Gly-Thr-Val-Arg-Asp-His (lembre que o aminoácido N-terminal é sempre representado como sendo o primeiro à esquerda) tem uma estrutura primária diferente da do peptídeo Val-His-Asp-Leu-Gly-Arg-Thr, embora ambos tenham o mesmo número e os mesmos tipos de aminoácidos. Observe que a ordem de aminoácidos pode ser escrita em uma linha. A estrutura primária é a primeira etapa unidimensional na especificação da estrutura tridimensional de uma proteína. Alguns bioquímicos definem a estrutura primária incluindo todas as interações covalentes, inclusive as ligações dissulfeto que podem ser formadas pela cisteína. No entanto, consideraremos as ligações dissulfeto como parte da estrutura terciária, que será descrita posteriormente.

Dois aspectos tridimensionais de uma única cadeia polipeptídica, chamadas estruturas secundária e terciária, podem ser considerados separadamente. A **estrutura secundária** é o arranjo espacial dos átomos do esqueleto peptídico. As disposições de α -hélice e de folha β pregueada são dois tipos diferentes de estrutura secundária. As estruturas secundárias têm interações repetitivas resultantes da ponte de hidrogênio entre a amida N-H e os grupos carbonila do esqueleto peptídico. As conformações das cadeias laterais de aminoácidos não fazem parte da estrutura secundária. Em muitas proteínas, o dobramento de partes da cadeia pode ocorrer independentemente do dobramento de outras partes. Tais porções de proteínas enoveladas independentemente são chamadas de **domínios** ou de **estrutura supersecundária**.

A **estrutura terciária** inclui o arranjo tridimensional de todos os átomos da proteína, inclusive nas cadeias laterais ou em qualquer **grupo prostético** (grupos de átomos que não são aminoácidos).

Uma proteína pode consistir em múltiplas cadeias polipeptídicas chamadas de subunidades. O arranjo de uma **subunidade** com relação às outras é a **estrutura quaternária**. A interação entre as subunidades é mediada por interações não-covalentes, como pontes de hidrogênio, atrações eletrostáticas e interações hidrofóbicas.

Discutiremos a estrutura secundária mais detalhadamente na Seção 4.3, a estrutura terciária na Seção 4.5 e a estrutura quaternária na Seção 4.7.

4.2 O que É a Estrutura Primária das Proteínas?

→ a função que a proteína vai desempenhar depende desta estrutura

A sequência de aminoácidos (a estrutura primária) de uma proteína determina sua estrutura tridimensional, que, por sua vez, determina suas propriedades. Em cada proteína, a estrutura tridimensional correta é necessária para o seu funcionamento perfeito.

Uma das demonstrações mais impressionantes da importância da estrutura primária é encontrada na hemoglobina associada à *anemia falciforme*. Nessa doença genética, as hemácias não conseguem ligar o oxigênio de forma eficiente e também assumem um formato característico de foice, o que dá à moléstia seu nome. As células falciformes tendem a se prender em pequenos vasos sanguíneos, cortando a circulação e, assim, danificando órgãos. Essas consequências drásticas derivam da troca de um resíduo de aminoácido na sequência da estrutura primária.

Diversas pesquisas estão sendo conduzidas para determinar os efeitos que as mudanças na estrutura primária exercem nas funções de proteínas. Utilizando técnicas de biologia molecular, como a mutagê-

Informações Essenciais

A estrutura primária de uma proteína é a sua sequência de aminoácidos. A determinação da sequência envolve a clivagem da proteína em peptídeos menores, estabelecendo-se a sequência dos peptídeos individuais, e combinando as sequências de peptídeos para obter a da proteína.

89

Conexões Bioquímicas

Proteínas Completas e Nutrição

Uma proteína completa é aquela que fornece todos os aminoácidos essenciais (Seção 23.5, Volume 3) em quantias adequadas para a sobrevivência humana. Esses aminoácidos não podem ser sintetizados pelos seres humanos, mas são necessários para a biossíntese de proteínas. A lisina e a metionina são dois aminoácidos essenciais pouco encontrados nas proteínas vegetais.

Como os grãos de arroz e de milho normalmente são pobres em lisina, e o feijão normalmente é pobre em metionina, os vegetarianos correm o risco de desnutrição, a não ser que consumam grãos e feijão juntos. Isso leva ao conceito de *proteínas complementares*, misturas que fornecem todos os aminoácidos essenciais – por exemplo, milho e feijão no *succotash*, ou um burrito de feijão feito com *tortilla* de milho. Veja a seguir as quantias alimentares específicas recomendadas para homens adultos. As mulheres adultas que não sejam gestantes ou lactantes precisam de 20% menos que as quantias indicadas para os homens adultos.

escolher apenas uma *única* fonte de proteína para a dieta, talvez a melhor escolha sejam os ovos, pois eles contêm proteínas de alta qualidade. Para uma mulher, a necessidade de 46 g de proteína completa pode ser suprida com 300 g de ovos, ou cerca de quatro ovos extragrandes inteiros. Para um homem, 385 g de ovos, ou pouco mais de cinco ovos, seriam suficientes. A mesma exigência pode ser atendida com um bife magro de boi, mas seriam necessários 345 g para uma mulher (ou 431 g para um homem), pois o bife tem REP menor. Se uma pessoa comesse apenas milho, seriam necessários 1.600 g/dia para as mulheres e 2.000 g/dia para os homens (1.600 g equivalem a praticamente 160 espigas por dia). No entanto, se você simplesmente combinar uma pequena quantia de feijão ou de ervilhas com o milho, irá complementar a baixa quantidade de lisina do milho, e a proteína fica completa. Isso pode ser feito facilmente com porções normais de alimentos.

RDA		RDA	
Arg*	Desconhecida	Met	0,70 g
His*	Desconhecida	Phe	1,12 g (inclui Tyr)
Ile	0,84 g	Thr	0,56 g
Leu	1,12 g	Trp	0,21 g
Lys	0,84 g	Val	0,96 g

Proteína	REP	% de Proteína
Ovo inteiro	100	15
Músculo bovino	84	16
Leite de vaca	66	4 (principalmente H ₂ O)
Amendoim	45	28
Milho	32	9
Trigo	26	12

* A inclusão de His e Arg é controversa. Elas parecem ser necessárias apenas em crianças em fase de crescimento e para a recuperação de tecidos danificados. A Arg é necessária para manter a fertilidade nos homens.

A *razão de eficiência protéica* (REP) descreve quão bem uma proteína fornece aminoácidos essenciais. Esse parâmetro é útil para decidir quanto de um alimento você precisa comer. A maioria das mulheres não-gestantes e em idade universitária necessita de 46 g de proteína completa, enquanto os homens necessitam de 58 g por dia. Se alguém

Na tentativa de aumentar o valor nutricional de algumas plantas cultivadas como alimento para o gado, os cientistas têm utilizado técnicas genéticas para desenvolver tipos de milho que contenham muito mais lisina que o milho selvagem. Isso se provou eficaz com maiores taxas de crescimento em porcos. Diversas culturas vegetais estão sendo produzidas usando-se a biotecnologia para aumentar sua vida útil, reduzir desperdícios e fornecer defesa contra insetos. Hoje, esses alimentos geneticamente modificados são tópicos de debates e controvérsias.

nese sítio-dirigida (Seção 14.7, Volume 2), é possível substituir qualquer resíduo de aminoácido em uma proteína por outro resíduo de aminoácido específico. A conformação da proteína alterada, assim como sua atividade biológica podem, então, ser determinadas. Os resultados de tais substituições de aminoácidos vão de efeitos irrisórios até a perda total de atividade, dependendo da proteína e da natureza do resíduo alterado.

A determinação da seqüência de aminoácidos em uma proteína é uma operação rotineira, mas não trivial, na bioquímica clássica. Ela é feita em diversas etapas, que devem ser executadas cuidadosamente para se obter resultados precisos (Seção 5.4).

O quadro Conexões Bioquímicas acima descreve um aspecto prático importante da composição de aminoácidos das proteínas. Essa propriedade pode variar bastante, dependendo da fonte da proteína (vegetal ou animal), com conseqüências importantes para a nutrição humana.

ligação peptídica = grupo amina + grupo carboxila - H₂O

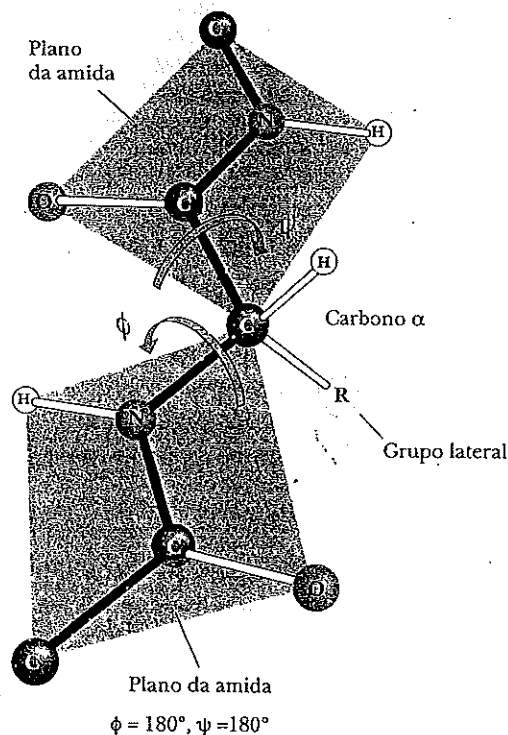
90

4.3 O que É a Estrutura Secundária das Proteínas?

A estrutura secundária das proteínas é o arranjo das pontes de hidrogênio do esqueleto protéico, a cadeia polipeptídica. A natureza das ligações no esqueleto protéico tem um papel importante aqui. Dentro de cada resíduo de aminoácido há duas ligações com rotação razoavelmente livre. Elas são (1) a ligação entre o carbono α e o nitrogênio do grupamento amina desse resíduo e (2) a ligação entre o carbono α e o carbono da carboxila do mesmo resíduo. A combinação do grupo peptídico planar com as duas ligações de rotação livre tem implicações importantes para as conformações tridimensionais de peptídeos e proteínas. O esqueleto da cadeia peptídica pode ser visualizado como uma série de cartas de baralho, cada uma representando um grupo peptídico planar. As cartas são ligadas em cantos opostos por dobradiças, representando as ligações em torno das quais há uma liberdade considerável de rotação (Figura 4.1). As cadeias laterais também possuem papel essencial na determinação do formato tridimensional de uma proteína, mas apenas o seu esqueleto é considerado na estrutura secundária. Os ângulos ϕ (fi) e ψ (psi), freqüentemente chamados de ângulos de Ramachandran (em homenagem a G. N. Ramachandran, que os descreveu), são utilizados para designar as rotações em torno das ligações C-N e C-C, respectivamente. A conformação de um esqueleto protéico pode ser descrita pela especificação dos valores de ϕ e ψ para cada resíduo (-180° a 180°). Dois tipos de estruturas secundárias que ocorrem freqüentemente nas proteínas são as estruturas de α -hélice e folha β pregueada (ou folha β) mantidas por pontes de hidrogênio.

Estruturas Periódicas dos Esqueletos Protéicos

A α -hélice e a folha β pregueada são estruturas periódicas – suas características se repetem a intervalos regulares. A α -hélice é parecida com uma vareta e envolve apenas uma cadeia polipeptídica. A estrutura da folha β pregueada pode dar uma formação bidimensional e envolver uma ou mais cadeias polipeptídicas.



Informações Essenciais

Dois dos motivos estruturais mais importantes das proteínas são a α -hélice e a folha β pregueada.

◀ FIGURA 4.1 Definição dos ângulos que determinam a configuração de uma cadeia polipeptídica. Os grupos peptídicos planares rígidos (chamados de "cartas de baralho" no texto) estão sombreados. O ângulo de rotação em torno da ligação $C^\alpha-N$ é chamado de ϕ (fi), e o ângulo de rotação em torno da ligação $C^\alpha-C$ é chamado de ψ (psi). Essas duas ligações são aquelas em torno das quais há liberdade de rotação. (Ilustração por Irving Geis. Direitos de propriedade do Howard Hughes Medical Institute. Não pode ser reproduzida sem autorização.)

MPP
A α-Hélice

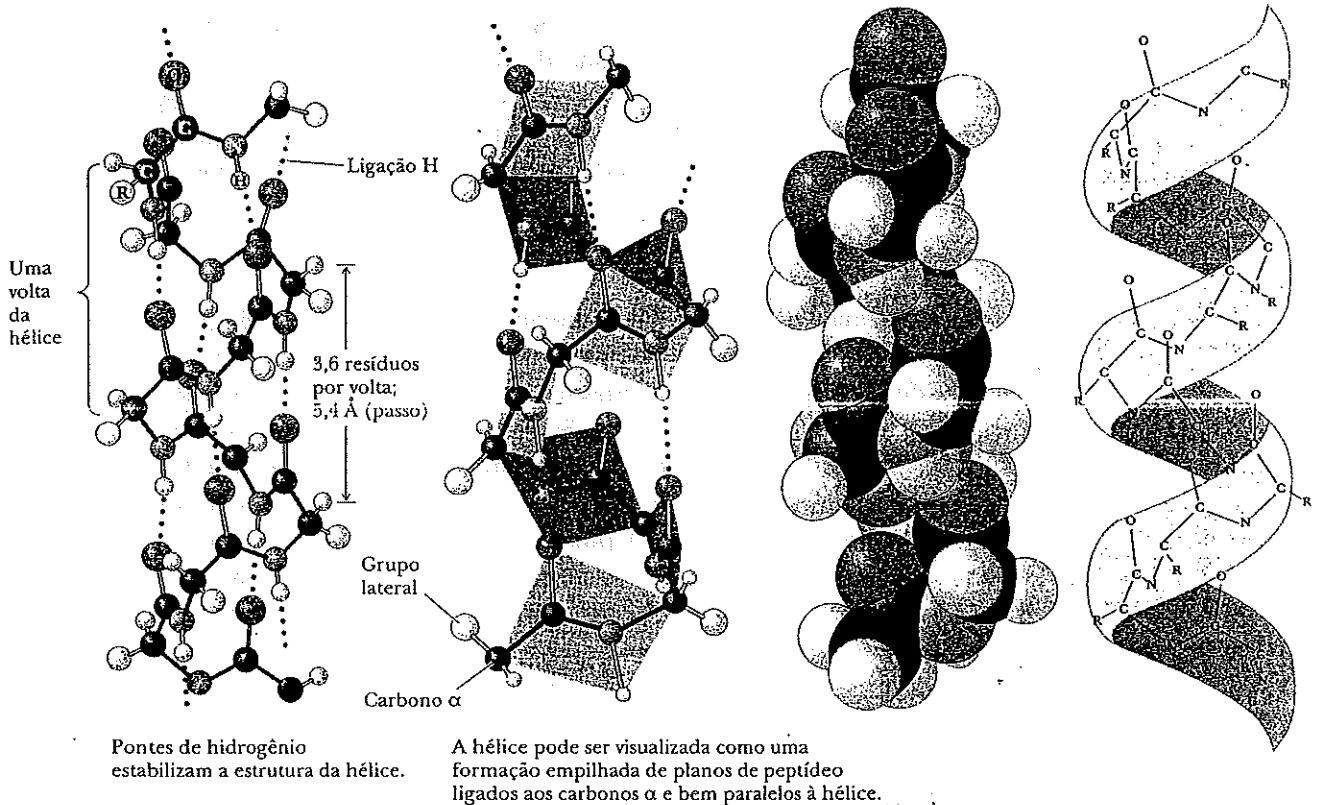
COO⁻

Helicoidal

com P₂

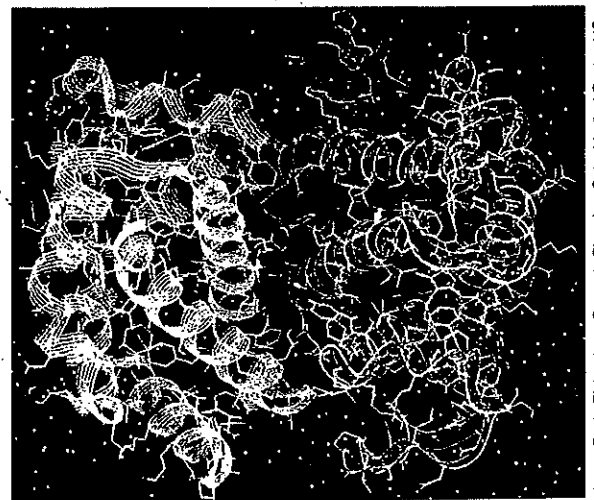
91

A α-hélice é estabilizada por pontes de hidrogênio paralelas ao eixo da hélice no interior do esqueleto de uma única cadeia polipeptídica. Contando a partir da extremidade N-terminal, o grupo C=O de cada resíduo de aminoácido está ligado por hidrogênio ao grupo N-H do aminoácido colocado a quatro resíduos de distância adiante na seqüência linear formada por ligações covalentes. A conformação helicoidal permite um arranjo linear dos átomos envolvidos nas pontes de hidrogênio, o que dá a elas o máximo de força e, assim, torna a conformação helicoidal bastante estável (Seção 2.2). Há 3,6 resíduos para cada volta da hélice, e o seu *passo* (distância linear entre pontos correspondentes em voltas sucessivas) é de 5,4 Å (Figura 4.2).



(a)

(b)



▲ FIGURA 4.2 A α-hélice. (a) Da esquerda para a direita, modelo esfera e vareta da α-hélice, mostrando a terminologia; modelo esfera e bastão com grupos de peptídeos planares sombreados; modelo de volume atômico da α-hélice gerado em computador; contorno da α-hélice. (b) Modelo da proteína hemoglobina, mostrando as regiões helicoidais. (Ilustração por Irving Geis. Direitos de propriedade do Howard Hughes Medical Institute. Não pode ser reproduzida sem autorização.)

92

A unidade angstrom, $1 \text{ \AA} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-10} \text{ m}$, é conveniente para distâncias interatômicas em moléculas, mas não é uma unidade do Sistema Internacional (SI). Os nanômetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) e os picômetros ($1 \text{ pm} = 10^{-12} \text{ m}$) são as unidades do SI utilizadas para distâncias interatômicas. Em unidades do SI, o passo de uma α -hélice é $0,54 \text{ nm}$, ou 540 pm . A Figura 4.3 mostra as estruturas de duas proteínas com alto grau de conteúdo de α -hélice.

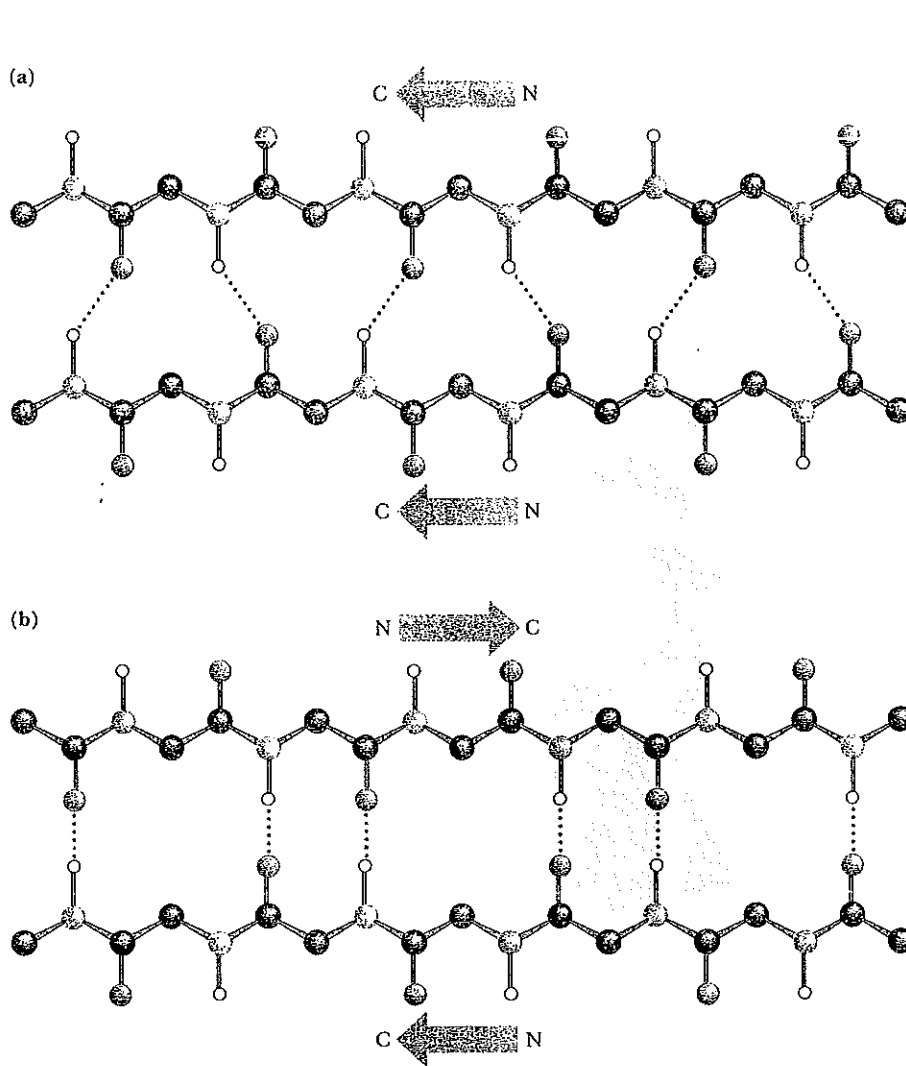
As proteínas têm quantidades variáveis de estruturas em α -hélice, indo de uma baixa porcentagem a quase 100%. Muitos fatores podem desestruturar a α -hélice. O aminoácido prolina cria uma curvatura no esqueleto por causa da sua estrutura *cíclica*. Ela não pode acomodar-se na α -hélice porque (1) a rotação em torno da ligação entre o nitrogênio e o carbono α é altamente restrita, e (2) o grupo α amina da prolina não pode participar da ponte de hidrogênio intracadeia. Outros fatores localizados envolvendo as cadeias laterais incluem a forte repulsão eletrostática causada pela proximidade de diversos grupos carregados com o mesmo sinal, como grupos de resíduos de lisina e arginina carregados positivamente ou grupos de resíduos de aspartato e glutamato carregados negativamente. Outra possibilidade é o efeito de densidade (repulsão estérica) causado pela proximidade de diversas cadeias laterais volumosas. Na conformação em α -hélice, todas as cadeias laterais ficam do lado externo da hélice, não há espaço suficiente para elas em seu interior. O carbono β fica no lado externo da hélice e pode haver maior densidade se ele estiver ligado a dois átomos que não sejam de hidrogênio, como é o caso da valina, da isoleucina e da treonina.

A Folha β

O arranjo de átomos na conformação da folha β pregueada é muito diferente daquele observado na α -hélice. O esqueleto peptídico na folha β é quase completamente estendido. As pontes de hidrogênio podem ser formadas entre diferentes partes de uma mesma cadeia dobrada sobre si própria (*ligações intracadeia*) ou entre diferentes cadeias (*ligações intercadeia*). Se as cadeias peptídicas se estendem na mesma direção (isto é, se estão todas alinhadas em termos de suas extremidades N-terminal e C-terminal), uma *folha pregueada paralela* é formada. Quando cadeias alternadas se estendem em direções opostas, uma *folha pregueada antiparalela* é formada (Figura 4.4). A ponte de hidrogênio entre as cadeias peptídicas na folha β pregueada origina uma estrutura repetida em ziguezague – por isso o nome “folha pregueada” (Figura 4.5). Observe que as pontes de hidrogênio são perpendiculares à direção da cadeia protéica, e não paralelas a ela como na α -hélice.



◀ FIGURA 4.3 Estrutura tridimensional de duas proteínas com quantias consideráveis de α -hélice em suas estruturas. As hélices são representadas pelas partes espiraladas regularmente do diagrama de fita. A mioemeritrina é uma proteína que carrega oxigênio nos invertebrados.



▲ FIGURA 4.4 Disposição das pontes de hidrogênio em folhas β pregueadas (a) paralela e (b) antiparalela.

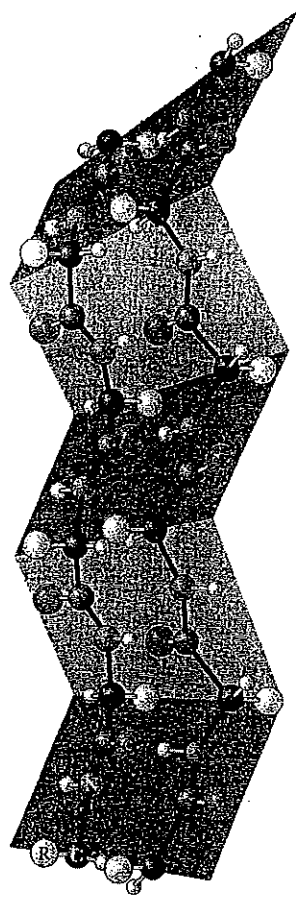
Irregularidades em Estruturas Regulares

Outras estruturas helicoidais são encontradas nas proteínas. Elas freqüentemente estão presentes em segmentos menores que com a α -hélice e, às vezes, quebram a natureza regular desta. A mais comum é a hélice 3_{10} , que tem três resíduos por volta e dez átomos no anel formado ao fazer a ponte de hidrogênio. Outras hélices comuns são chamadas 2_7 e 4_{16} , seguindo a mesma nomenclatura da hélice 3_{10} .

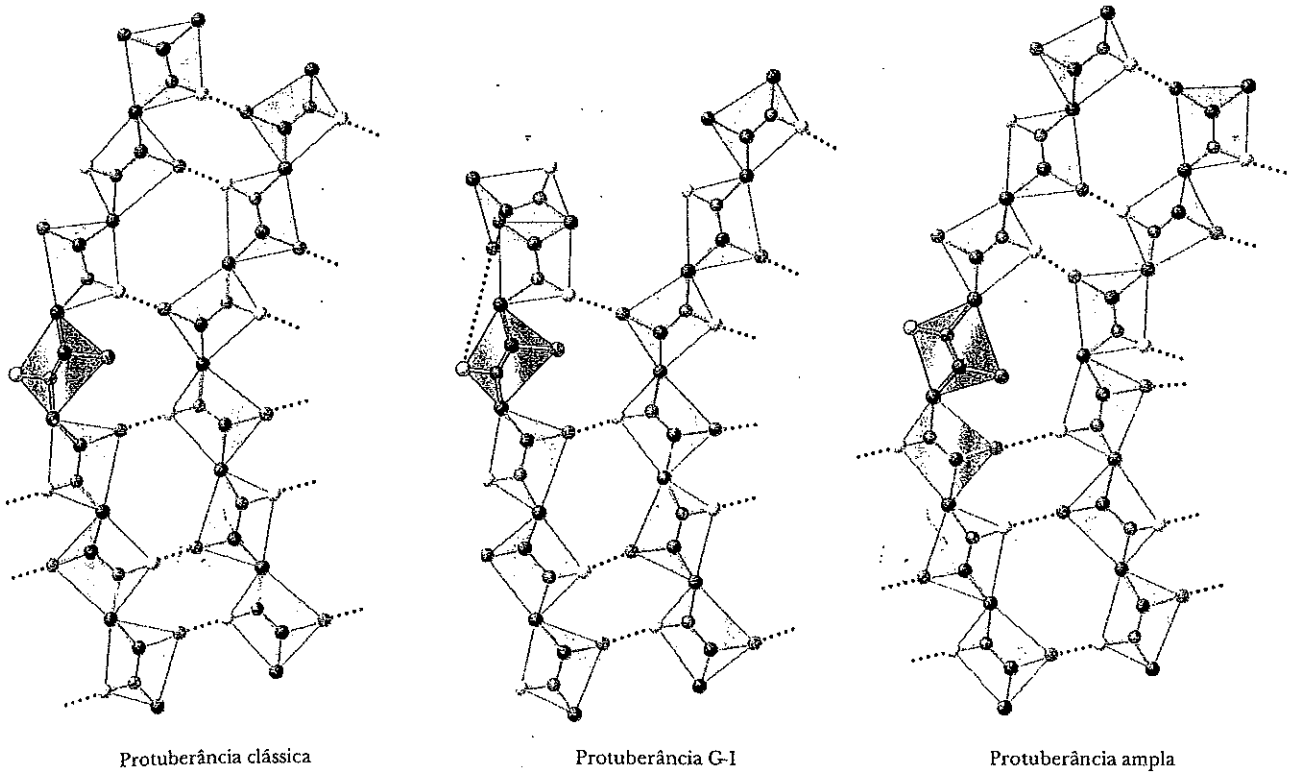
Uma **protuberância β** é uma irregularidade não-repetitiva comum encontrada em folhas β antiparalelas. Ela ocorre entre duas pontes de hidrogênio da estrutura β normal e envolve dois resíduos em uma fita e um na outra. A Figura 4.6 mostra protuberâncias β típicas.

O dobramento protéico requer que os esqueletos peptídicos e as estruturas secundárias possam mudar de direção. Freqüentemente uma volta reversa marca a transição entre uma estrutura secundária e a outra. Por motivos estéricos (espaciais), a glicina é freqüentemente encontrada em **voltas reversas**, nas quais a cadeia polipeptídica muda de direção. O único hidrogênio da cadeia lateral evita o grupamento (Figuras 4.7a e 4.7b). Como a estrutura cíclica da prolina tem a geometria correta para uma volta reversa, esse aminoácido também é freqüentemente encontrado em tais voltas (Figura 4.7c).

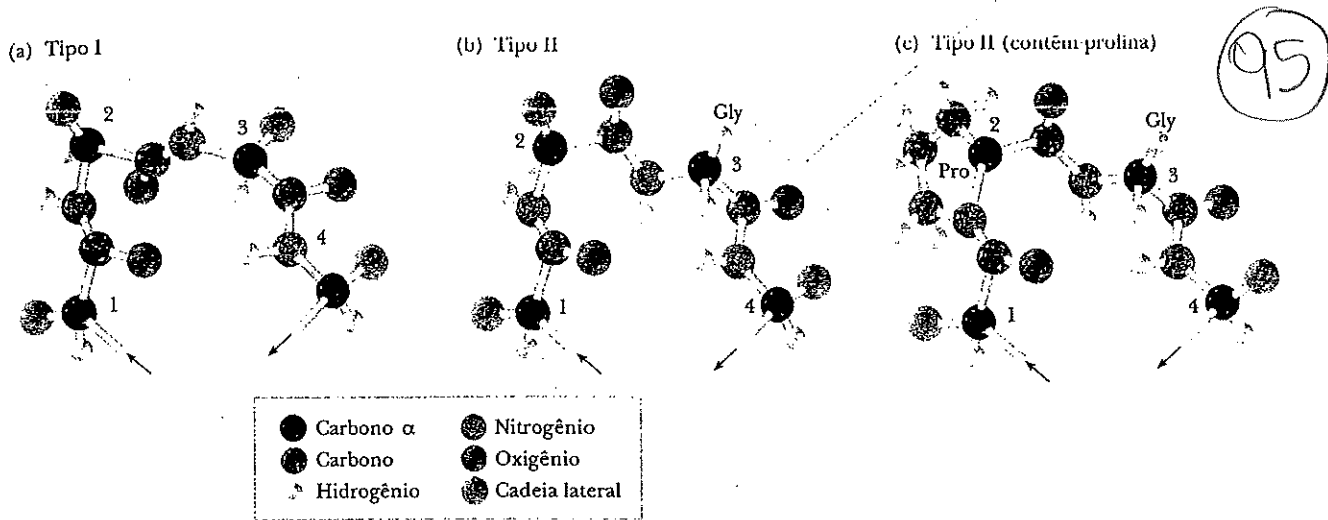
94



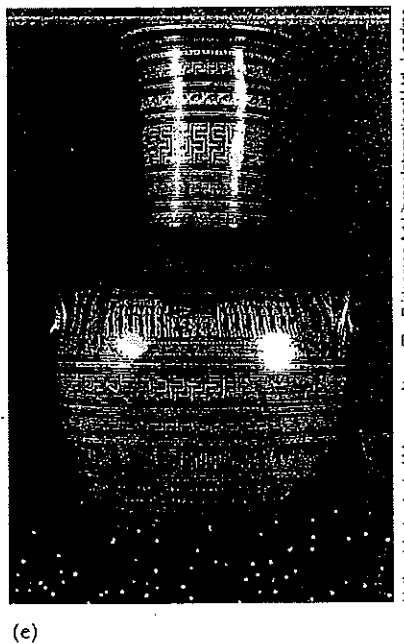
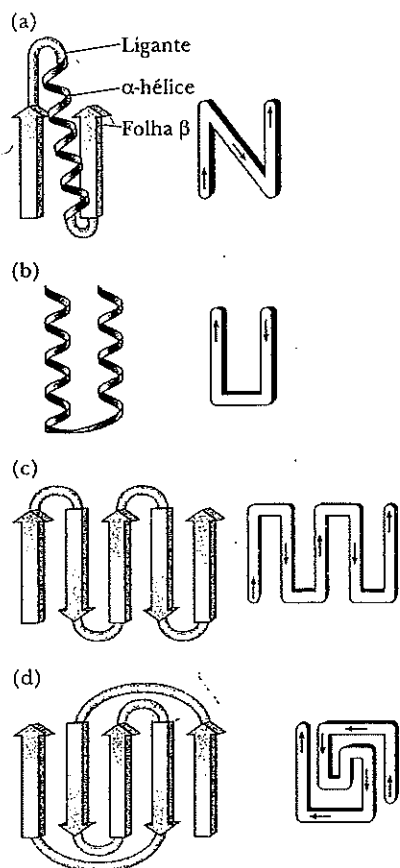
◀ FIGURA 4.5 Forma tridimensional da disposição de folha β pregueada antiparalela. As cadeias não se dobram umas sobre as outras, mas estão em uma conformação totalmente estendida. (Ilustração por Irving Geis. Direitos de propriedade do Howard Hughes Medical Institute. Não pode ser reproduzida sem autorização.)



▲ FIGURA 4.6 Três diferentes estruturas de protuberância β . As pontes de hidrogênio são mostradas como esferas vermelhas.



▲ FIGURA 4.7 Estruturas de voltas reversas. As setas indicam as direções das cadeias polipeptídicas. (a) Volta reversa de tipo I. No resíduo 3, a cadeia lateral (dourada) fica do lado externo da alça e qualquer aminoácido pode ocupar essa posição. (b) Uma volta reversa de tipo II. A cadeia lateral do resíduo 3 foi girada 180° em relação à sua posição na volta de tipo I e, agora, está no interior da alça. Apenas a cadeia lateral de hidrogênio da glicina pode caber no espaço disponível, então a glicina deve ser o terceiro resíduo em uma volta reversa do tipo II. (c) O anel de cinco membros da prolina tem a geometria correta para uma volta reversa. Normalmente esse resíduo ocorre como o segundo resíduo de uma volta reversa. A volta mostrada aqui é do tipo II, com a glicina como terceiro resíduo.



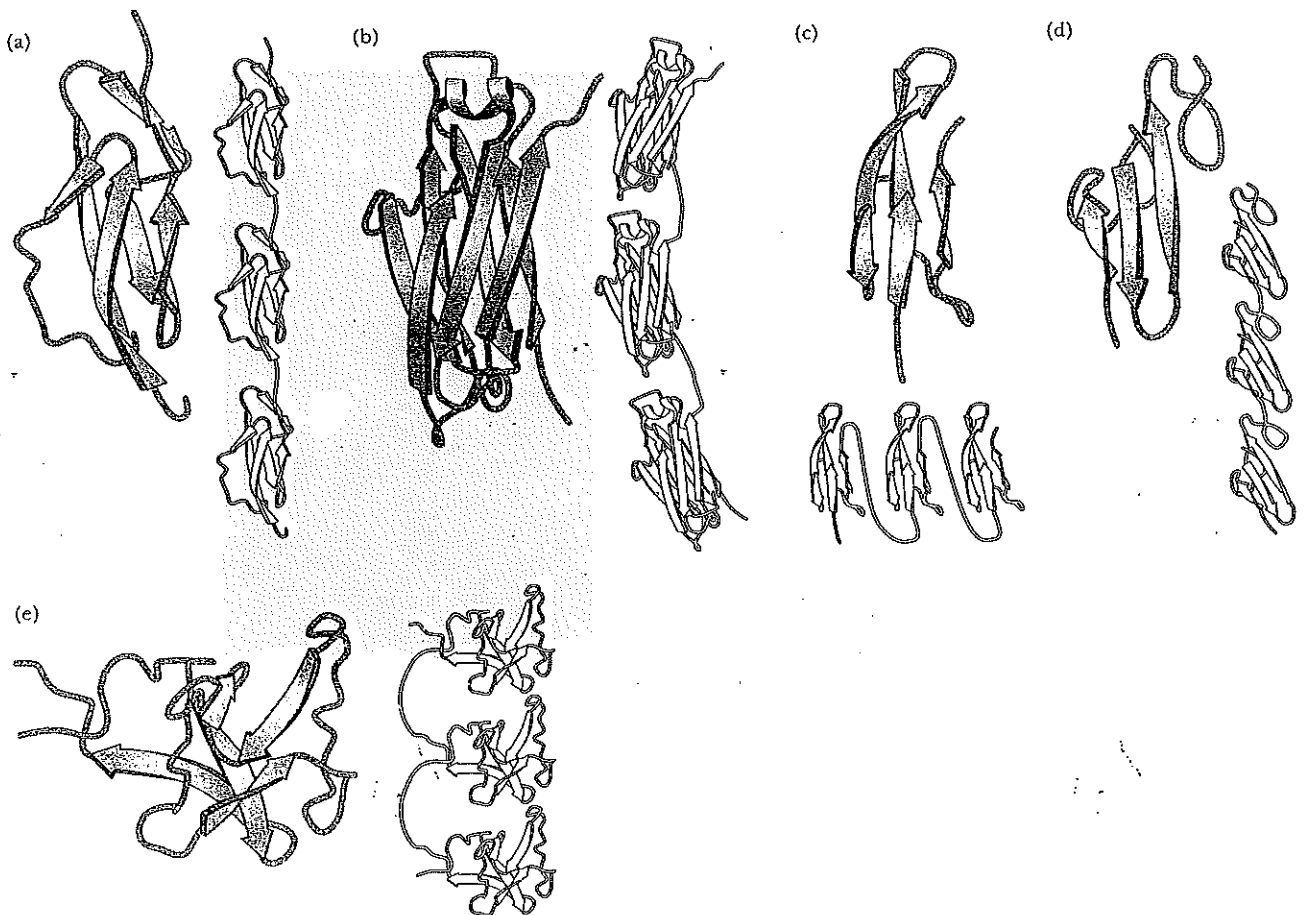
▲ FIGURA 4.8 Diagramas esquemáticos de estruturas supersecundárias. As setas indicam as direções das cadeias polipeptídicas. (a) Uma unidade $\beta\alpha$, (b) uma unidade $\alpha\alpha$, (c) um meandro β e (d) a chave grega. (e) O motivo de chave grega na estrutura protéica se assemelha aos padrões geométricos nesse vaso grego antigo, originando o nome.

$$\left(\frac{x}{3\%}\right)^2 = 1 \dots$$

96

Estruturas Supersecundárias e Domínios

A α -hélice, a folha β pregueada e outras estruturas secundárias são combinadas de diversas formas à medida que a cadeia polipeptídica de uma proteína dobra sobre si mesma. A combinação de fitas α e β produz diversos tipos de estruturas supersecundárias nas proteínas. A característica mais comum desse tipo é a *unidade* $\beta\alpha\beta$, na qual duas fitas paralelas de folha β estão conectadas por um segmento de α -hélice (Figura 4.8a). Uma *unidade* $\alpha\alpha$ (hélice-volta-hélice) consiste em duas α -hélices antiparalelas (Figura 4.8b). Em tal arranjo, há contatos energeticamente favoráveis entre as cadeias laterais nos dois segmentos da hélice. Em um *meandro* β , uma folha antiparalela é formada por uma série de voltas reversas muito próximas que conectam segmentos da cadeia polipeptídica (Figura 4.8c). Um outro tipo de folha antiparalela é formado quando a cadeia polipeptídica se dobra sobre si mesma em um padrão conhecido como *chave grega*, nomeado como um desenho decorativo encontrado em cerâmica do período clássico (Figura 4.8e). Um *motivo* é uma estrutura supersecundária de repetição. Alguns dos menores motivos são mostrados na Figura 4.9. Esses pequenos motivos freqüentemente podem ser repetidos e organizados em motivos maiores. As seqüências protéicas que permitem um meandro β ou uma chave grega podem ser freqüentemente encontradas organizadas em barril β na estrutura terciária da proteína (Figura 4.10). Os motivos são importantes e nos dizem muito sobre o dobramento protéico. No entanto, não nos permitem prever nada sobre a função biológica das proteínas, pois são encontrados em proteínas e enzimas com funções bastante diferentes.



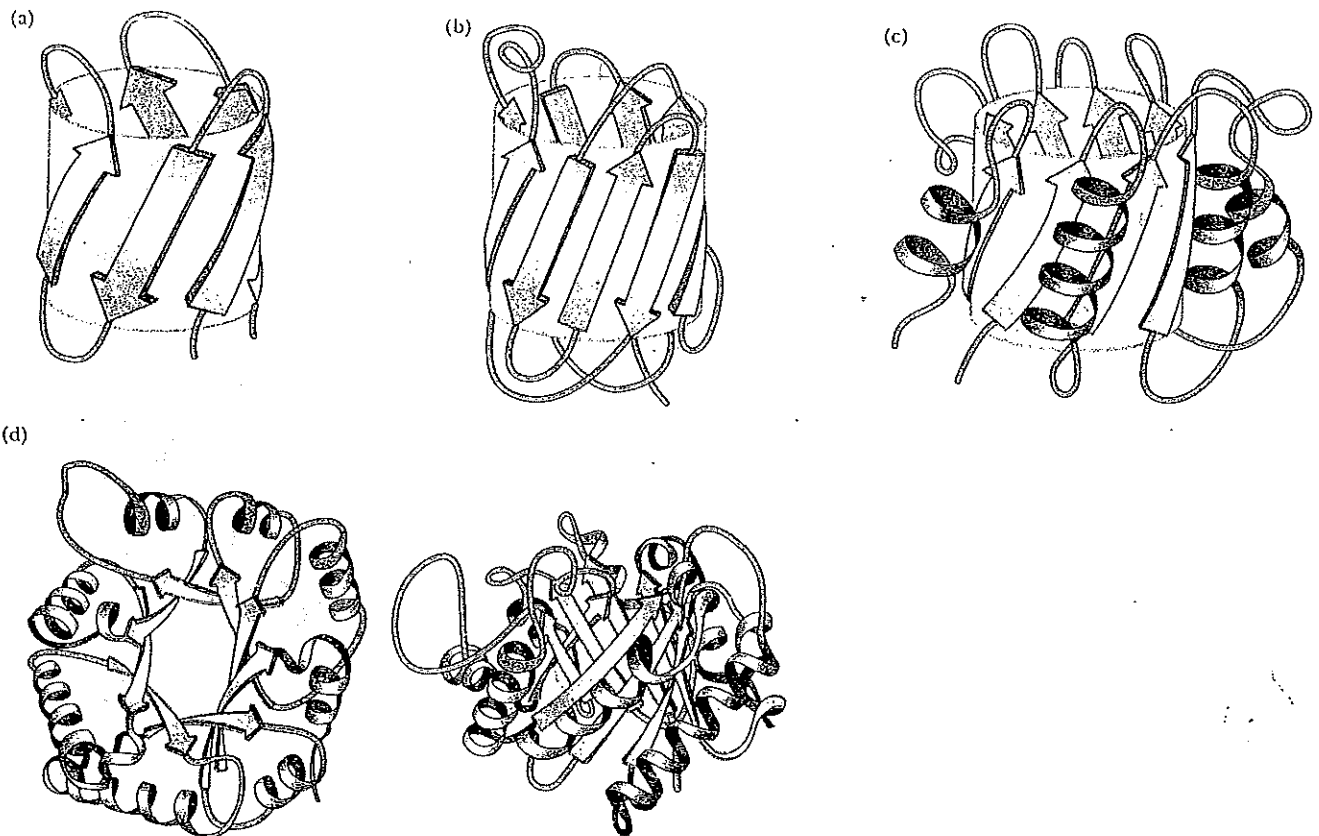
▲ FIGURA 4.9 Os motivos são estruturas supersecundárias repetidas, às vezes chamadas de módulos. (a) Módulo da proteína de controle do complemento. (b) Módulo da imunoglobulina. (c) Módulo da fibronectina do tipo I. (d) Módulo do fator de crescimento. (e) Módulo de kringle. Todos eles têm uma estrutura secundária particular que é repetida na proteína. (Reimpresso de "Protein Modules", Trends in Biochemical Sciences, v. 16, p. 13-17, © 1991, com autorização de Elsevier.)

Muitas proteínas com o mesmo tipo de função têm seqüências protéicas semelhantes. Conseqüentemente, os domínios com conformações similares são associados à função em particular. Muitos tipos de domínios foram identificados, incluindo três tipos diferentes pelos quais as proteínas se ligam ao DNA. Além disso, as seqüências curtas de polipeptídeos dentro de uma proteína orientam a modificação pós-tradução e a localização subcelular. Por exemplo, muitas seqüências têm um papel na formação de glicoproteínas (aquelas que contêm açúcares além da cadeia polipeptídica). Outras seqüências específicas indicam que uma proteína deve ser ligada a uma membrana ou secretada da célula, ou marcam uma proteína para fosforilação por uma enzima específica.

A Tripla Hélice do Colágeno

O colágeno, um componente dos ossos e do tecido conjuntivo, é a proteína mais abundante nos vertebrados. Ela é organizada em fibras insolúveis em água que têm grande resistência. Uma fibra de colágeno consiste em três cadeias polipeptídicas envoltas umas nas outras em uma torção parecida com a de uma corda, ou seja, a tripla hélice. Cada uma das três cadeias tem, dentro de certos limites, uma seqüência repetitiva de três resíduos de aminoácidos, X-Pro-Gly ou X-Hyp-Gly, em que qualquer aminoácido pode ocupar a primeira posição, designada por X.

A prolina e a hidroxiprolina podem constituir até 30% dos resíduos no colágeno. A hidroxiprolina é formada a partir da prolina por uma enzima hidroxilante específica depois que os aminoácidos são

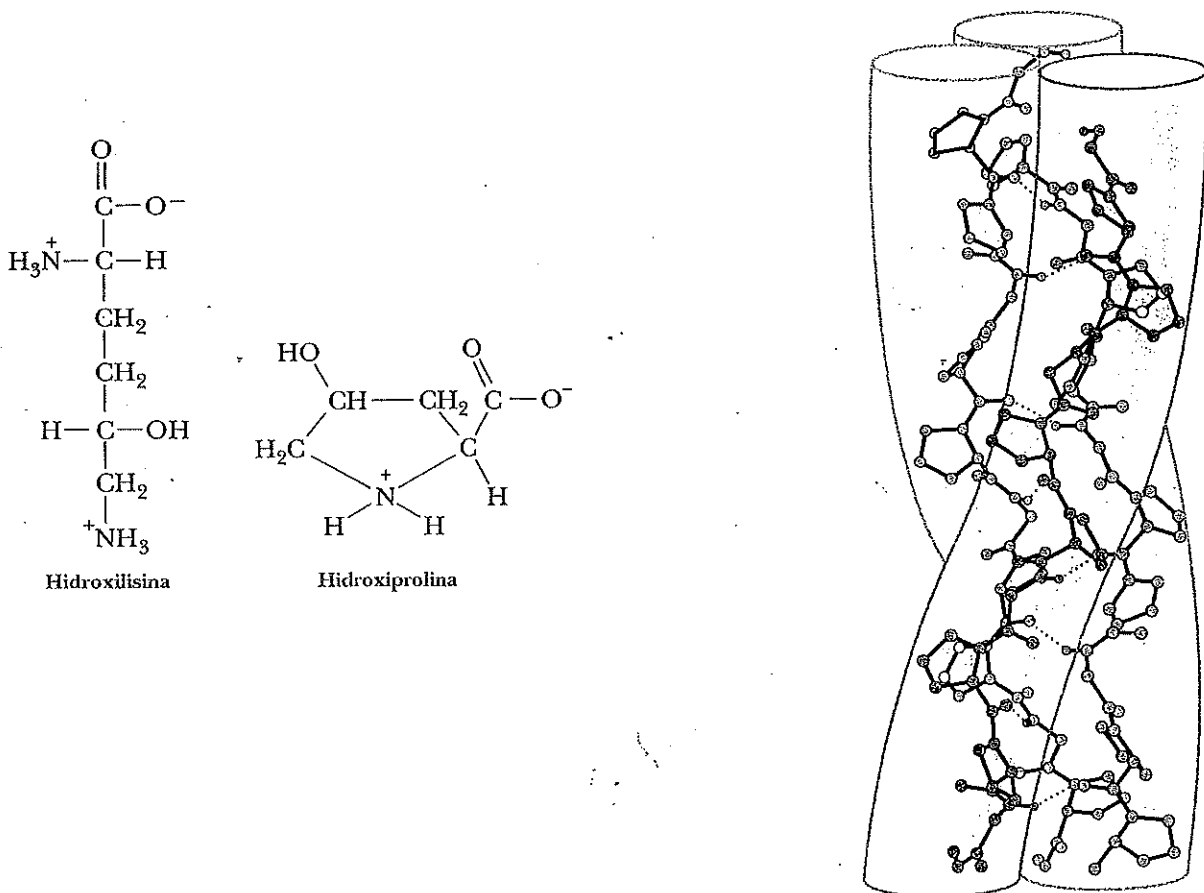


▲ FIGURA 4.10 Algumas organizações em barril β . (a) Uma série de meandros β ligados. Essa disposição ocorre na proteína rubredoxina do *Clostridium pasteurianum*. (b) O padrão de chave grega ocorre na pré-albumina humana. (c) Um barril β envolvendo unidades $\beta\alpha\beta$ alternadas. Esse arranjo ocorre na triosefosfato isomerase do músculo de galinha. (d) Vistas superior e lateral do arranjo do esqueleto polipeptídico da triosefosfato isomerase. Observe que as porções de α -hélice ficam do lado externo do barril β .

unidos. A hidroxilisina também ocorre no colágeno. Na seqüência de aminoácidos do colágeno, cada terceira posição deve ser ocupada pela glicina. A tripla hélice é organizada para que cada terceiro resíduo de cada cadeia esteja no interior da hélice. Apenas a glicina é pequena o suficiente para acomodar-se no espaço disponível (Figura 4.11).

As três cadeias individuais do colágeno são hélices diferentes da própria α -hélice. Elas se torcem uma em volta das outras em um arranjo super-helicoidal para formar uma vareta rígida. Essa molécula em tripla hélice é chamada de *tropocolágeno*, tem 300 nm (3.000 Å) de comprimento e 1,5 nm (15 Å) de diâmetro. As três fitas são unidas por pontes de hidrogênio envolvendo os resíduos de hidroxiprolina e hidroxilisina. O peso molecular da formação em três fitas é de cerca de 300.000; cada fita contém cerca de 800 resíduos de aminoácidos. No colágeno também ocorrem ligações covalentes, tanto intra como intermoleculares, formadas pelas reações de resíduos de lisina e histidina. A quantidade de ligações cruzadas em um tecido aumenta com a idade. É por isso que a carne de animais mais velhos é mais dura que a de animais mais jovens.

O colágeno no qual a prolina não é hidroxilada em níveis adequados a hidroxiprolina é menos estável que o colágeno normal. Os sintomas do escorbuto, como sangramento nas gengivas e descoloração da pele, resultam de colágeno frágil. A enzima que hidroxila a prolina e, assim, mantém o estado normal do colágeno, requer ácido ascórbico (vitamina C) para continuar ativa. Essencialmente, o escorbuto é causado por uma deficiência alimentar em vitamina C. Consulte o quadro Conexões Bioquímicas no Capítulo 16 (Volume 3).



▲ FIGURA 4.11 Poli (Gly-Pro-Pro), uma tripla hélice torcida para a direita semelhante ao colágeno composta por três cadeias em hélice torcida para a esquerda. (Adaptado de Miller, M. H.; Scheraga, H. A. Calculation of the structures of collagen models. Role of interchain interactions in determining the triple-helical coiled-coil conformations. I. Poly (glycyl-prolyl-prolyl). Journal of Polymer Science Symposium, n. 54, p. 171-200. © 1976 John Wiley & Sons, Inc. Reimpresso com autorização.)

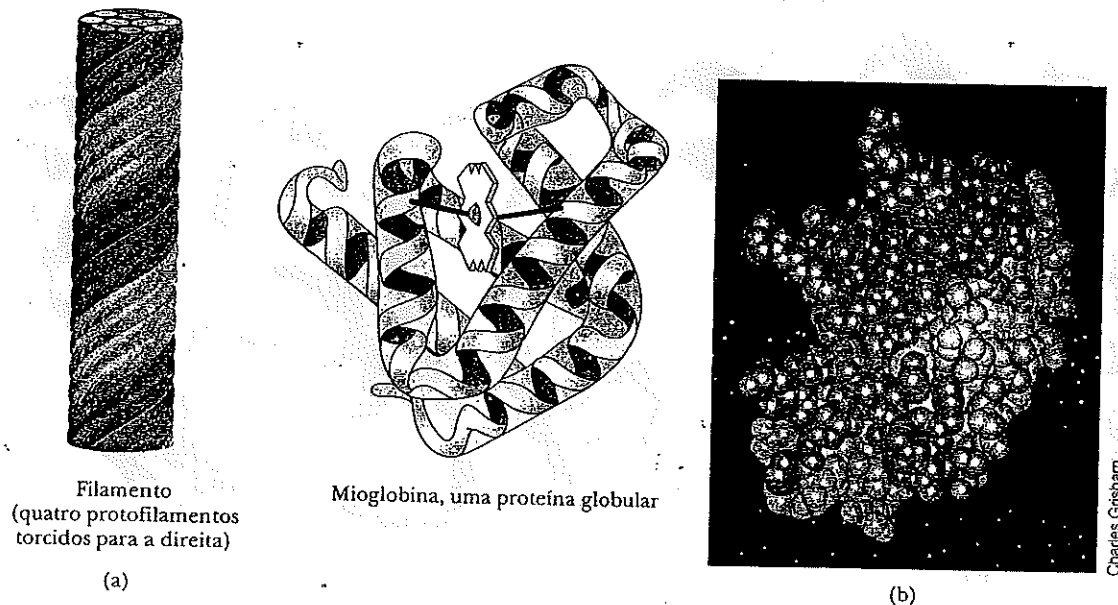
Os Dois Tipos de Conformações de Proteínas: Fibrosas e Globulares

É difícil traçar uma separação clara entre as estruturas secundária e terciária. A natureza das cadeias laterais (parte da estrutura terciária) em uma proteína pode influenciar o dobramento do esqueleto (a estrutura secundária). A comparação do colágeno com as fibras de seda e da lã pode ser esclarecedora. As fibras de seda consistem, em sua maior parte, em proteína fibroína, que, como o colágeno, tem estrutura fibrosa, mas, ao contrário dele, é constituída principalmente de folhas β . As fibras de lã são feitas, em grande parte, de proteína queratina, que é basicamente do tipo α -hélice. Os aminoácidos dos quais o colágeno, a fibroína e a queratina são compostos determinam a conformação que as proteínas adotarão, mas todos são **proteínas fibrosas** (Figura 4.12a).

Em outras proteínas, o esqueleto dobra-se sobre si mesmo para produzir uma forma mais ou menos esférica. Elas são chamadas de **proteínas globulares** (Figura 4.12b), das quais podemos ver muitos exemplos. As seções em hélice e de folha pregueada podem ser organizadas de forma a unir as extremidades da seqüência próximas uma das outras em três dimensões. As proteínas globulares, diferentemente das fibrosas, são solúveis em água e têm estruturas compactas; suas estruturas terciária e quaternária podem ser bastante complexas.

4.4 O que Podemos Dizer sobre a Termodinâmica do Dobramento Protéico?

A estrutura primária de uma proteína – a ordem dos aminoácidos na cadeia polipeptídica – depende da formação de ligações peptídicas, que são covalentes. Níveis de estrutura de ordem mais elevada, como a conformação do esqueleto (estrutura secundária) e as posições de todos os átomos da proteína (estrutura terciária), dependem de interações não-covalentes. Se a proteína é composta por diversas subunidades, a interação das subunidades (estrutura quaternária) também dependerá de interações não-covalentes.



▲ FIGURA 4.12 Comparação entre os formatos de proteínas fibrosas e globulares. (a) Diagramas esquemáticos de uma porção de uma proteína fibrosa e de uma proteína globular. (b) Modelo gerado por computador de uma proteína globular. A codificação de cores nesse modelo é diferente daquela dos modelos de moléculas menores. Os carbonos estão representados por esferas azul-claras, e as esferas amarelas representam o enxofre.

100

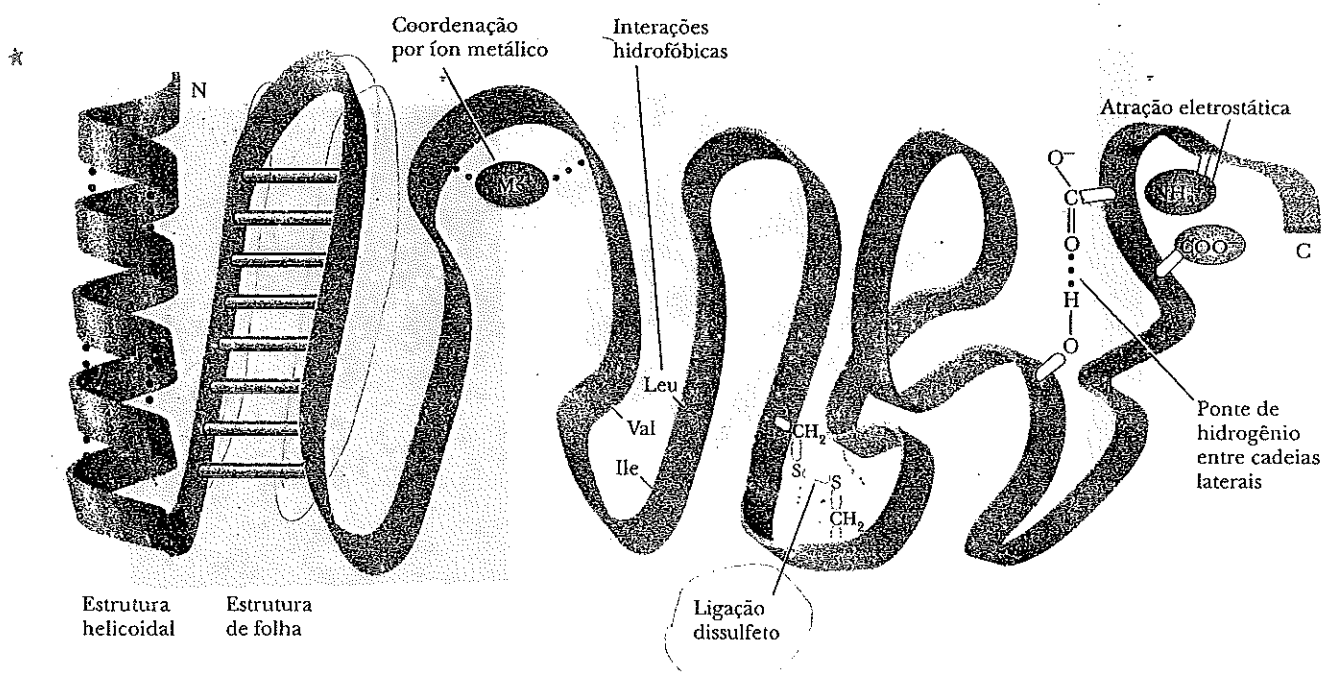
As forças de estabilização não-covalentes contribuem para que uma determinada proteína adote a estrutura mais estável, aquela com energia mais baixa.

Há diversos tipos de ponte de hidrogênio em proteínas. A ponte de hidrogênio no *esqueleto* é um grande determinante da estrutura secundária; as pontes de hidrogênio entre as cadeias laterais de aminoácidos também são possíveis nas proteínas. Os resíduos apolares tendem a se agrupar no interior das moléculas de proteína como resultado de interações hidrofóbicas. A atração eletrostática entre grupos de cargas opostas, que freqüentemente ocorre na superfície da molécula, resulta na proximidade entre tais grupos. Diversas cadeias laterais podem ser *complexadas* em um único íon metálico (também há íons metálicos em alguns grupos prostéticos).

Além dessas interações não-covalentes, as ligações dissulfeto formam elos covalentes entre as cadeias laterais de cisteínas. Quando essas ligações são formadas, elas restringem os padrões de dobramento disponíveis para as cadeias polipeptídicas. Existem métodos de laboratório especializados para determinar o número e as posições de ligações dissulfeto em uma determinada proteína. Informações sobre os locais de ligações dissulfeto podem, então, ser combinadas ao conhecimento da estrutura primária para fornecer a estrutura covalente completa da proteína. Observe a diferença sutil aqui: a estrutura primária é a ordem dos aminoácidos, enquanto a estrutura covalente completa também especifica as posições das ligações dissulfeto (Figura 4.13).

Lembre que, como resultado desse conjunto de forças estabilizadoras, os resíduos que estão distantes na seqüência primária podem ficar próximos na estrutura tridimensional produzida pelo dobramento da proteína. Quando uma cadeia polipeptídica se dobra sobre si mesma, ela pode assumir um formato globular compacto. Uma cadeia polipeptídica diferente (ou a mesma cadeia sob diferentes condições) pode assumir uma forma fibrosa parecida com uma vareta.

A forma mais estável da proteína é aquela com energia mais baixa, representando uma interação complexa entre todas as forças envolvidas. Muitas dessas forças envolvem a formação de ligações, freqüentemente a formação de um grande número de ligações fracas e não-covalentes. Destas, as interações hidrofóbicas são um caso especial, pois o conceito de entropia tem um papel importante em sua descrição. Agora é o momento ideal para ver com detalhes as interações hidrofóbicas.



▲ FIGURA 4.13 Forças que estabilizam a estrutura terciária das proteínas. Observe que a estrutura helicoidal e a de folha são dois tipos de esqueleto mantidos por ponte de hidrogênio. Embora esses esqueletos façam parte da estrutura secundária, sua conformação restringe os possíveis arranjos das cadeias laterais.

Interações Hidrofóbicas: Estudo de Caso em Termodinâmica

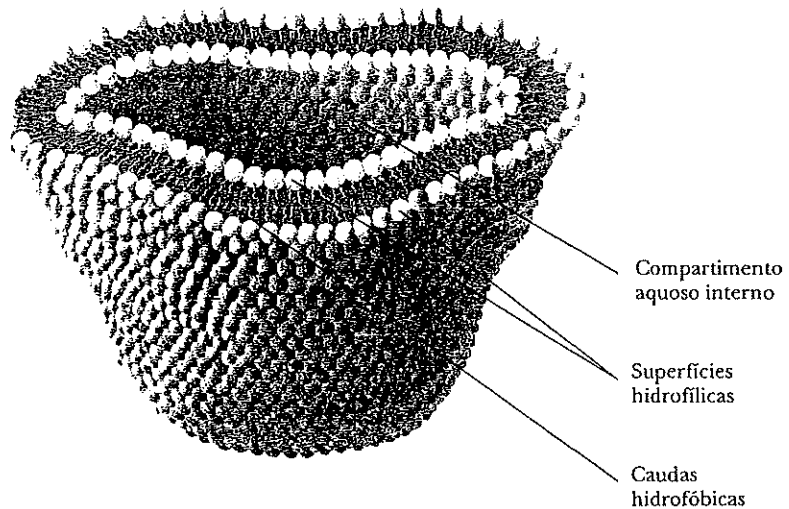
As interações hidrofóbicas têm conseqüências importantes na bioquímica. Uma grande variedade de moléculas pode assumir estruturas definidas como resultado de interações hidrofóbicas. Já vimos a forma como as bicamadas de fosfolípídeos podem formar tal disposição. Lembra (Capítulo 2, Seção 2.1) que os fosfolípídeos são moléculas que têm cabeças contendo grupos polares e caudas longas apolares de cadeias de hidrocarbonetos. Essas bicamadas são menos complexas que uma proteína dobrada, mas as interações que levam à sua formação também desempenham um papel essencial no dobramento protéico. Sob condições adequadas, um arranjo em camada dupla é formado para que os grupos polares de diversas moléculas entrem em contato com o ambiente aquoso, ao passo que as caudas apolares ficam em contato entre si e são protegidas do ambiente aquoso. As bicamadas formam estruturas tridimensionais chamadas de **lipossomos** (Figura 4.14). Tais estruturas são modelos para membranas biológicas, que consistem em diversas bicamadas com proteínas inseridas nelas. As interações entre a bicamada e as proteínas inseridas também são exemplos de interações hidrofóbicas. A própria existência das membranas depende das interações hidrofóbicas, que também possuem um papel essencial no dobramento protéico.

As interações hidrofóbicas são um fator importante no dobramento de proteínas em estruturas tridimensionais específicas necessárias para seu funcionamento como enzimas, transportadoras de oxigênio ou elementos estruturais. A ordem dos aminoácidos (isto é, a natureza das cadeias laterais) determina automaticamente a estrutura tridimensional da proteína. Sabe-se experimentalmente que as proteínas tendem a se dobrar para que cadeias laterais apolares hidrofóbicas fiquem protegidas da água no interior da proteína, enquanto as cadeias laterais polares hidrofílicas ficam no exterior da molécula e são acessíveis ao ambiente aquoso (Figura 4.15). O que torna as interações hidrofóbicas favoráveis?

As interações hidrofóbicas são processos espontâneos. A entropia do universo aumenta quando elas acontecem.

$$\Delta S_{\text{universo}} > 0$$

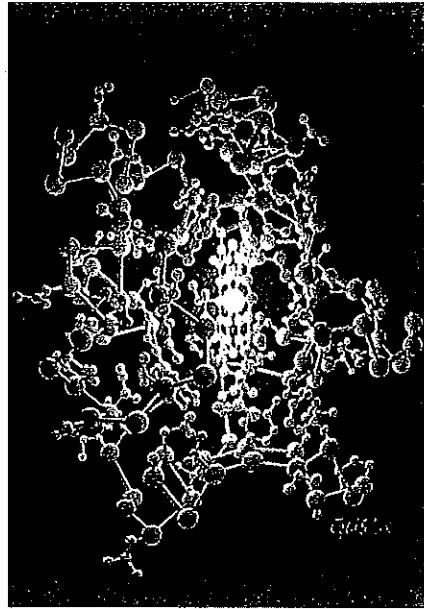
Como exemplo, vamos supor que tentamos misturar o hidrocarboneto líquido hexano (C_6H_{14}) com água e conseguimos não uma solução, mas um sistema de duas fases, uma de hexano e uma de água. A formação de uma solução mista não é espontânea, ao passo que a formação de duas fases é. Uma entropia desfavorável aparece se a formação da solução requerer a criação ordenada de solvente, nesse caso, a água (Figura 4.16). As moléculas de água que cercam as moléculas apolares podem fazer pontes de hidrogênio entre si, mas, desse modo, têm menos orientações possíveis do que se fossem cercadas por



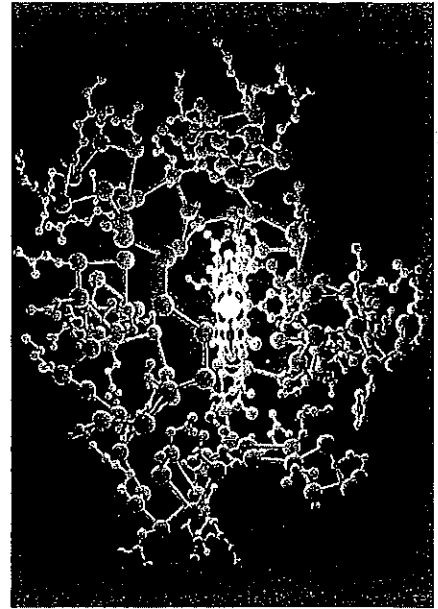
► **FIGURA 4.14** Diagrama esquemático de um lipossomo. Essa estrutura tridimensional está organizada de forma que as cabeças hidrofílicas dos lipídeos entrem em contato com o ambiente aquoso. As caudas hidrofóbicas estão em contato entre si e são mantidas protegidas do ambiente aquoso.

102

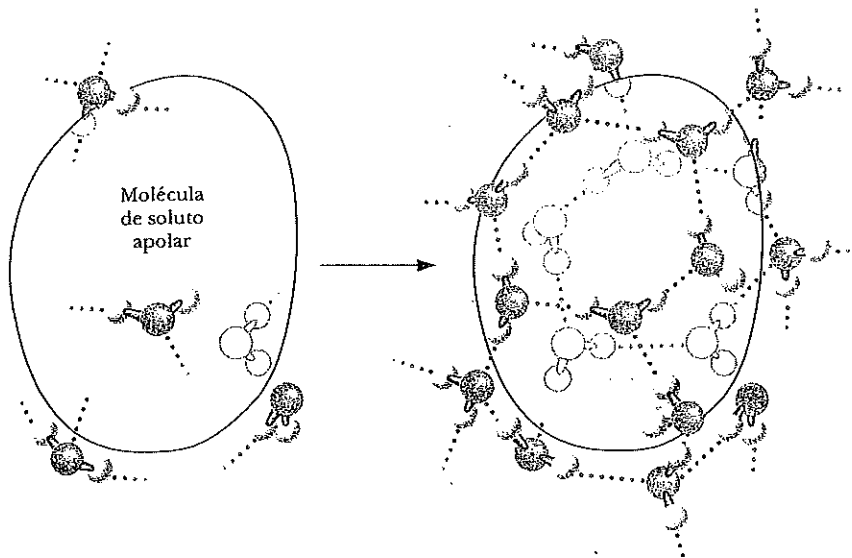
► **FIGURA 4.15** Estrutura tridimensional da proteína citocromo c.
 (a) As cadeias laterais hidrofóbicas (mostradas em vermelho) são encontradas no interior da molécula.
 (b) As cadeias laterais hidrofílicas (mostradas em verde) são encontradas na superfície da molécula. (Ilustração por Irving Geis. Direitos de propriedade do Howard Hughes Medical Institute. Não pode ser reproduzida sem autorização.)



(a)



(b)



◄ **FIGURA 4.16** Uma "gaiola" de moléculas de água se forma ao redor de um soluto apolar.

outras moléculas de água por todos os lados. Isso introduz uma ordem de nível mais alto, evitando a dispersão de energia, mais parecida com a treliça de gelo do que com a água líquida, e, assim, com uma entropia menor. A redução de entropia necessária é muito grande para que o processo ocorra. Portanto, substâncias apolares não se dissolvem na água. Ao contrário, as moléculas apolares se associam entre si por interações hidrofóbicas e são excluídas da água.

4.5 O que É a Estrutura Terciária das Proteínas?

A estrutura terciária de uma proteína é o arranjo tridimensional de todos os átomos na molécula. As conformações das cadeias laterais e as posições de qualquer grupo prostético fazem parte da estrutura terciária, assim como a disposição de seções helicoidais e de folha pregueada umas em relação às outras. Em

uma proteína fibrosa, que tem a forma geral de uma longa vareta, a estrutura secundária também fornece muitas informações sobre a estrutura terciária. O esqueleto helicoidal da proteína não se dobra sobre si mesmo e o único aspecto importante da estrutura terciária, que não é especificado pela estrutura secundária, é a disposição dos átomos das cadeias laterais.

Para uma proteína globular, é necessário um número de informações consideravelmente maior. É preciso determinar a forma como as seções helicoidais e de folha pregueada se dobram sobre si mesmas, além das posições dos átomos da cadeia lateral e de qualquer grupo prostético. As interações entre as cadeias laterais desempenham um papel importante no dobramento protéico. O padrão de dobramento muitas vezes aproxima, na estrutura terciária da proteína nativa, resíduos que estão separados na seqüência de aminoácidos.

Uma proteína não exhibe necessariamente todas as características estruturais possíveis dos tipos que descrevemos na Seção 4.4. Por exemplo, não há ligações dissulfeto na mioglobina e na hemoglobina, que são as proteínas de armazenamento e transporte de oxigênio e exemplos clássicos de estrutura protéica. No entanto, ambas contêm íons Fe(II) como parte de um grupo prostético. Em contraste, as enzimas tripsina e quimotripsina não contêm íons metálicos complexados, mas têm ligações dissulfeto. Pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas ocorrem na maioria das proteínas.

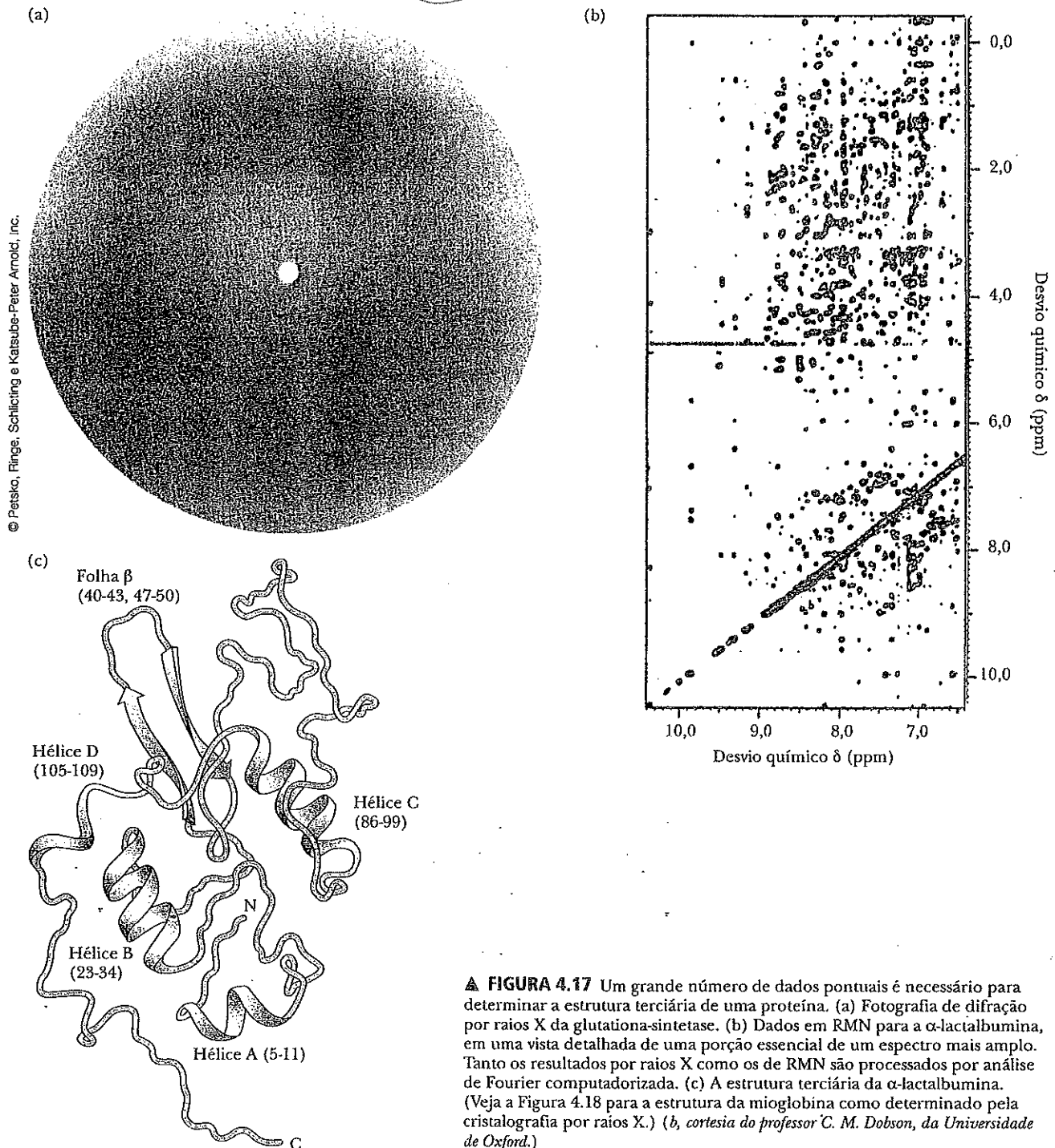
A conformação tridimensional de uma proteína é o resultado da interação entre todas as forças estabilizadoras. Sabe-se, por exemplo, que não é possível a prolina acomodar-se no interior de α -hélice e que sua presença pode levar uma cadeia polipeptídica a dobrar-se, terminando um segmento de α -hélice. No entanto, a presença de prolina não é uma exigência para uma dobra em uma cadeia polipeptídica. Outros resíduos são também encontrados em regiões de curvatura em cadeias polipeptídicas. Os segmentos de proteínas nessas regiões da cadeia polipeptídica e em outras regiões da proteína que não estão envolvidas em estruturas helicoidais ou de folha pregueada são freqüentemente chamados de "aleatórios" ou "dobramento aleatório". Na verdade, as forças que estabilizam cada proteína são responsáveis por sua conformação.

A técnica experimental utilizada para determinar a estrutura terciária de uma proteína é a **cristalografia por raios X**. Cristais perfeitos de algumas proteínas podem ser obtidos sob condições cuidadosamente controladas. Nesses cristais, todas as moléculas individuais da proteína têm a mesma conformação tridimensional e a mesma orientação. Cristais dessa qualidade podem ser formados somente a partir de proteínas com um grau de pureza muito alto, e não é sempre possível obter uma estrutura se a proteína não pode ser cristalizada.

Quando um cristal adequadamente puro é exposto a um feixe de raios X, um *padrão de difração* é produzido em uma chapa fotográfica (Figura 4.17a) ou em um contador de radiação. O padrão é produzido quando os elétrons em cada átomo da molécula dispersam os raios X. O número de elétrons no átomo determina a intensidade de sua dispersão de raios X: átomos mais pesados dispersam mais eficientemente que átomos mais leves. Os raios X dispersados a partir de átomos individuais podem reforçar-se ou cancelar-se uns aos outros (estabelecer interferência construtiva ou destrutiva), originando o padrão característico para cada tipo de molécula. Uma série de padrões de difração obtidos de diversos ângulos contém as informações necessárias para determinar a estrutura terciária. As informações são extraídas dos padrões de difração mediante uma análise matemática conhecida como *séries de Fourier*. Milhares de cálculos são necessários para determinar a estrutura de uma proteína, e embora eles sejam feitos por computador, o processo é um tanto longo. Melhorar os procedimentos de cálculos é objeto de intensas pesquisas. Os artigos de Hauptmann e de Karle listados na bibliografia ao final deste capítulo descrevem algumas conquistas nesse campo.

Outra técnica que suplementa os resultados da difração por raios X começou a ser amplamente utilizada nos últimos anos: uma forma de **espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)**. Nessa aplicação de RMN em especial, chamada de *RMN 2-D* (bidimensional), grandes grupos de dados pontuais são sujeitos à análise por computador (Figura 4.17b). Como na difração por raios X, esse método utiliza as séries de Fourier para analisar os resultados, e se assemelha à difração por raios X em outro aspecto: é um processo longo e exige uma potência considerável dos computadores e apenas miligramas de

104



▲ FIGURA 4.17 Um grande número de dados pontuais é necessário para determinar a estrutura terciária de uma proteína. (a) Fotografia de difração por raios X da glutatona-sintetase. (b) Dados em RMN para a α -lactalbumina, em uma vista detalhada de uma porção essencial de um espectro mais amplo. Tanto os resultados por raios X como os de RMN são processados por análise de Fourier computadorizada. (c) A estrutura terciária da α -lactalbumina. (Veja a Figura 4.18 para a estrutura da mioglobina como determinado pela cristalografia por raios X.) (b, cortesia do professor C. M. Dobson, da Universidade de Oxford.)

proteínas. Uma maneira em que a RMN 2-D é diferente da difração por raios X é aquela que utiliza amostras de proteína em solução aquosa em vez de cristais. Esse ambiente é mais parecido com o das proteínas nas células, o que é uma das principais vantagens desse método. O método de RMN mais amplamente usado na determinação da estrutura protéica depende essencialmente das distâncias entre os átomos de hidrogênio, fornecendo resultados independentes daqueles obtidos pela cristalografia por raios X. O método de RMN passa por aprimoramentos constantes e vai sendo aplicado a proteínas maiores à medida que esses aprimoramentos progredem.

Informações Essenciais

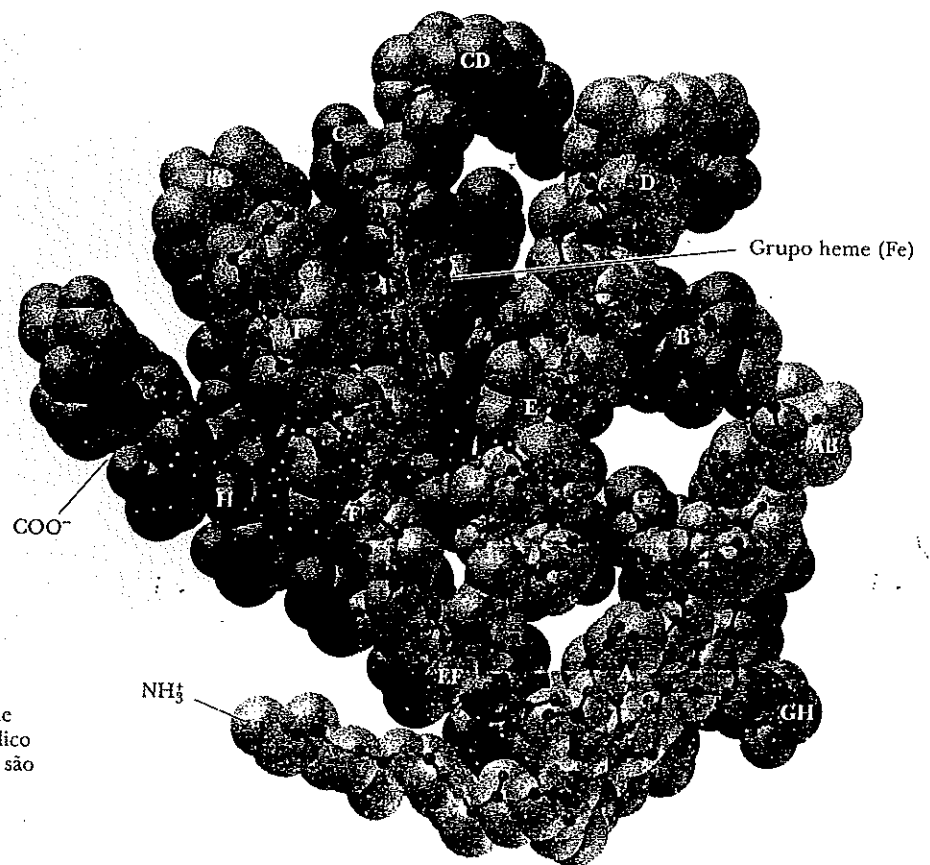
A estrutura terciária de uma proteína é o arranjo tridimensional de todos os átomos em uma cadeia protéica. As estruturas secundária e terciária de uma proteína podem ser determinadas simultaneamente.

105

Mioglobina: Um Exemplo de Estrutura Protéica

De diversas formas, a mioglobina é o exemplo clássico de uma proteína globular. Nós a utilizaremos aqui como um exemplo de estudo sobre a estrutura terciária (veremos a estrutura terciária de muitas outras proteínas em outros contextos quando discutirmos suas funções na bioquímica). A mioglobina foi a primeira proteína cuja estrutura terciária completa (Figura 4.18) foi determinada pela cristalografia por raios X. A molécula completa de mioglobina consiste em uma única cadeia polipeptídica de 153 resíduos de aminoácidos e inclui um grupo prostético, o grupo heme, que também ocorre na hemoglobina. A molécula de mioglobina (incluindo o grupo heme) tem uma estrutura compacta, com os átomos internos muito próximos entre si. Essa estrutura fornece exemplos de várias forças responsáveis pela forma tridimensional das proteínas.

Na mioglobina, há oito regiões α -hélice e nenhuma região de folha β pregueada. Aproximadamente 75% dos resíduos na mioglobina são encontrados nessas regiões helicoidais, designadas pelas letras de A até H. A ponte de hidrogênio no esqueleto polipeptídico estabiliza as regiões de α -hélice, e as cadeias laterais de aminoácidos também estão envolvidas nas pontes de hidrogênio. Os resíduos polares estão no lado externo da molécula. O interior da proteína contém quase exclusivamente resíduos de aminoácidos apolares. Dois resíduos polares de histidina são encontrados no interior da molécula; eles estão envolvidos nas interações com o grupo heme e com a ligação de oxigênio e, assim, têm um papel importante na



► FIGURA 4.18 Estrutura da molécula de mioglobina, mostrando o esqueleto peptídico e o grupo heme. Os segmentos helicoidais são designados pelas letras A até H. Os termos NH_3^+ e COO^- indicam as extremidades N-terminal e C-terminal, respectivamente.

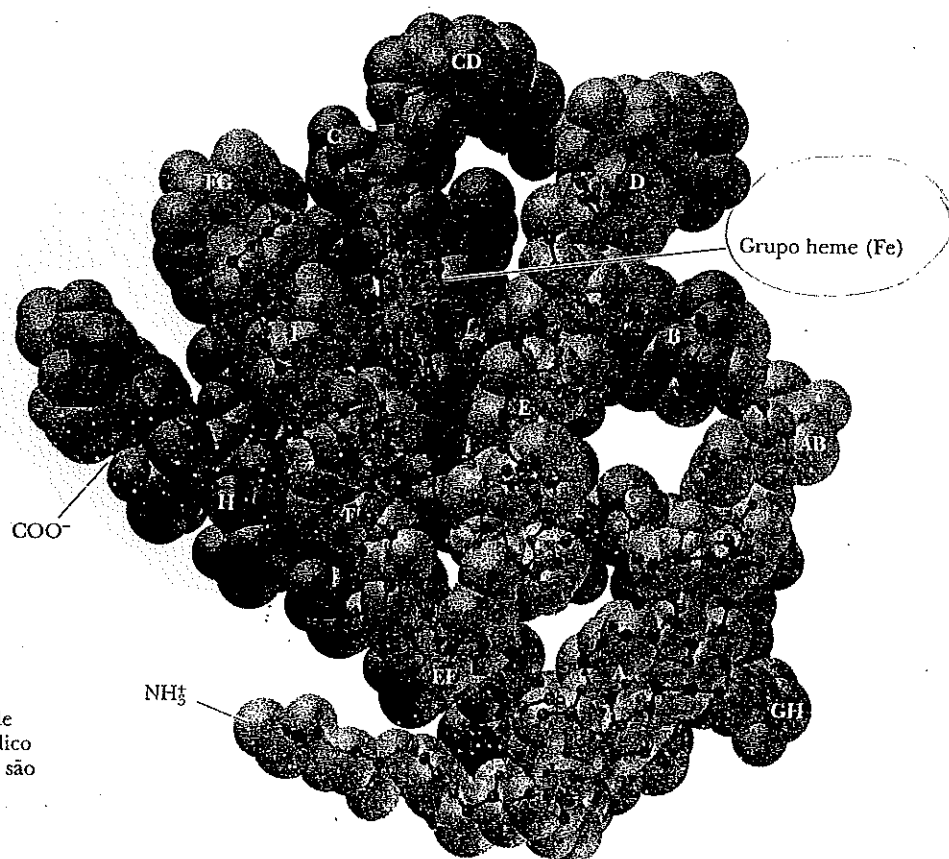
Informações Essenciais

A estrutura terciária de uma proteína é o arranjo tridimensional de todos os átomos em uma cadeia protéica. As estruturas secundária e terciária de uma proteína podem ser determinadas simultaneamente.

Mioglobina: Um Exemplo de Estrutura Protéica

De diversas formas, a mioglobina é o exemplo clássico de uma proteína globular. Nós a utilizaremos aqui como um exemplo de estudo sobre a estrutura terciária (veremos a estrutura terciária de muitas outras proteínas em outros contextos quando discutirmos suas funções na bioquímica). A mioglobina foi a primeira proteína cuja estrutura terciária completa (Figura 4.18) foi determinada pela cristalografia por raios X. A molécula completa de mioglobina consiste em uma única cadeia polipeptídica de 153 resíduos de aminoácidos e inclui um grupo prostético, o grupo heme, que também ocorre na hemoglobina. A molécula de mioglobina (incluindo o grupo heme) tem uma estrutura compacta, com os átomos internos muito próximos entre si. Essa estrutura fornece exemplos de várias forças responsáveis pela forma tridimensional das proteínas.

Na mioglobina, há oito regiões α -hélice e nenhuma região de folha β pregueada. Aproximadamente 75% dos resíduos na mioglobina são encontrados nessas regiões helicoidais, designadas pelas letras de A até H. A ponte de hidrogênio no esqueleto polipeptídico estabiliza as regiões de α -hélice, e as cadeias laterais de aminoácidos também estão envolvidas nas pontes de hidrogênio. Os resíduos polares estão no lado externo da molécula. O interior da proteína contém quase exclusivamente resíduos de aminoácidos apolares. Dois resíduos polares de histidina são encontrados no interior da molécula; eles estão envolvidos nas interações com o grupo heme e com a ligação de oxigênio e, assim, têm um papel importante na

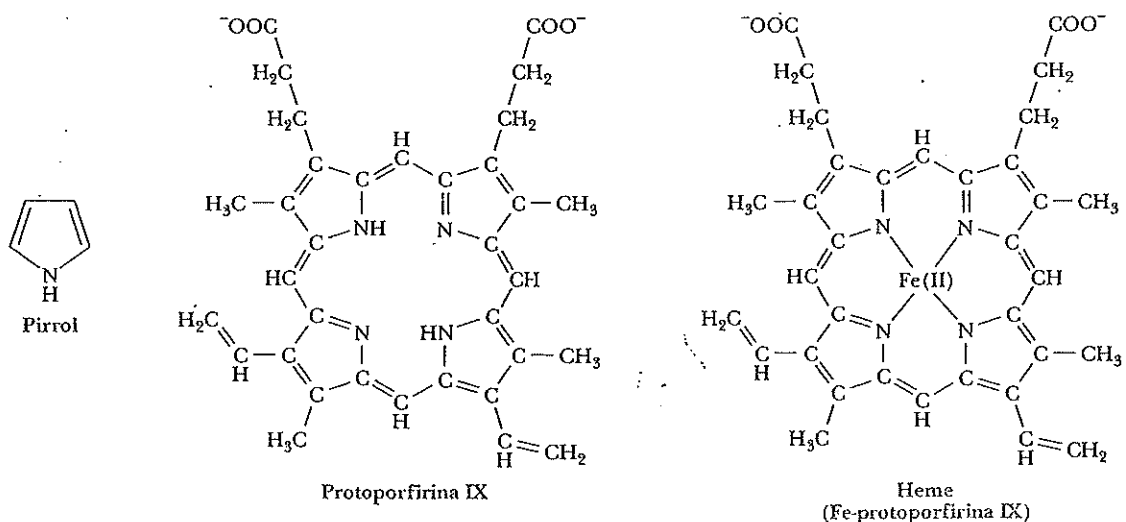


► FIGURA 4.18 Estrutura da molécula de mioglobina, mostrando o esqueleto peptídico e o grupo heme. Os segmentos helicoidais são designados pelas letras A até H. Os termos NH₃⁺ e COO⁻ indicam as extremidades N-terminal e C-terminal, respectivamente.

função da molécula. O grupo heme planar cabe em um bolsão hidrofóbico na porção protéica da molécula e é mantido na posição por atrações hidrofóbicas entre o anel porfirínico do grupo heme e as cadeias laterais apolares da proteína. A presença do grupo heme afeta drasticamente a conformação do polipeptídeo: a apoproteína (a cadeia polipeptídica sozinha, sem o grupo prostético heme) não se dobra tão fortemente quanto a molécula completa.

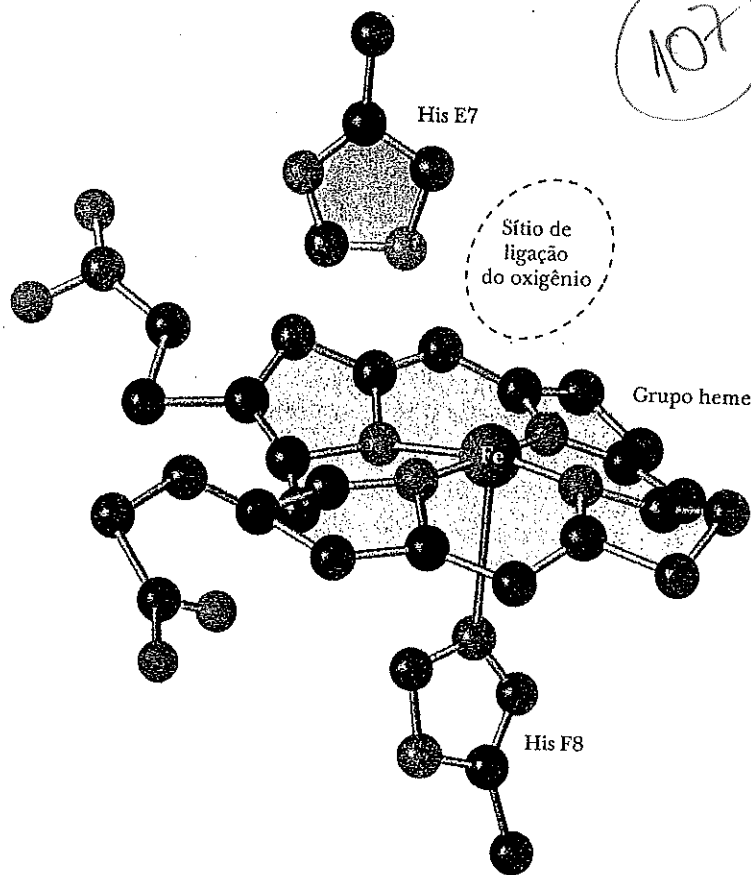
O grupo heme consiste em um íon metálico, o Fe(II), e uma porção orgânica, a protoporfirina IX (Figura 4.19). (A notação Fe(II) é preferível à Fe²⁺ quando os íons metálicos ocorrem em complexos.) A porção de porfirina é composta por quatro anéis de cinco átomos com base na estrutura do pirrol. Esses quatro anéis estão ligados por pontes de grupos metino (-CH=) para formar uma estrutura planar quadrada. O íon Fe(II) tem seis sítios de coordenação e forma seis ligações metal-íon complexantes. Quatro dos seis sítios são ocupados pelos átomos de nitrogênio dos quatro anéis de tipo pirrólico da porfirina para fornecer o grupo heme completo. A presença do grupo heme é necessária para que a mioglobina se ligue ao oxigênio.

O quinto sítio de coordenação do íon Fe(II) é ocupado por um dos átomos de nitrogênio da cadeia lateral imidazólica do resíduo de histidina F8 (o oitavo resíduo no segmento helicoidal F). Esse resíduo é um dos dois situados no interior da molécula. O oxigênio é ligado ao sexto sítio de coordenação do ferro. O quinto e o sexto sítios de coordenação estão em posições perpendiculares e em lados opostos ao plano do anel porfirínico. O outro resíduo de histidina no interior da molécula, o resíduo E7 (o sétimo resíduo no segmento helicoidal E), está no mesmo lado do grupo heme em que se liga o oxigênio (Figura 4.20). Essa segunda histidina não é ligada ao ferro ou a qualquer parte do grupo heme, mas age como um portão que abre e fecha quando o oxigênio entra no bolsão hidrofóbico para se ligar ao heme. A histidina E7 inibe de forma estérica o oxigênio de se ligar perpendicularmente ao plano do heme, com ramificações biologicamente importantes. A afinidade do heme livre com o monóxido de carbono (CO) é 25.000 vezes maior que com o oxigênio. Quando o monóxido de carbono é forçado a se ligar em um ângulo na mioglobina por cauda do bloco sérico da His E7, sua vantagem sobre o oxigênio cai em duas ordens de magnitude (Figura 4.21). Isso protege contra a possibilidade de que traços de CO produzidos durante o metabolismo ocupem todos os sítios de ligação ao oxigênio nos hemes. Mesmo assim, o CO é um veneno poderoso em grandes quantidades por causa do seu efeito na ligação do oxigênio à hemoglobina e na etapa final da cadeia transportadora de elétrons (Seção 20.5, Volume 3).



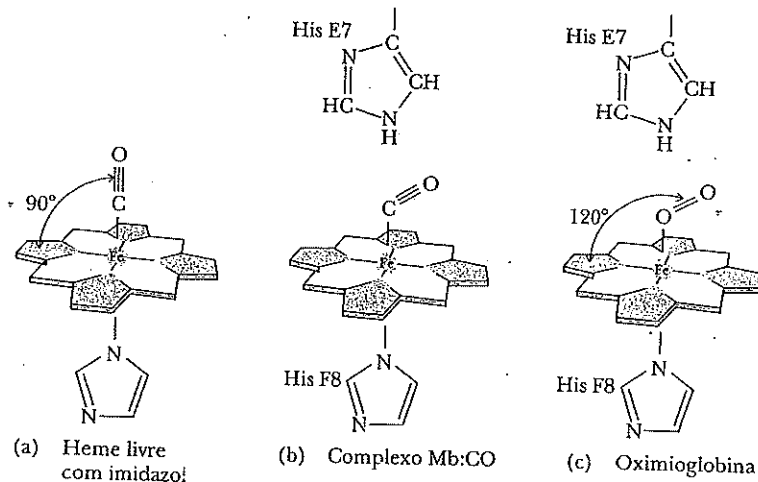
▲ FIGURA 4.19 A estrutura do grupo heme. Quatro anéis pirrólicos são unidos por grupos de ligação para formar um anel porfirínico planar. Diversos anéis porfirínicos isoméricos são possíveis dependendo da natureza e do arranjo das cadeias laterais. O isômero da porfirina encontrado no heme é a protoporfirina IX. A adição de ferro à protoporfirina IX produz o grupo heme.

107



► FIGURA 4.20 O sítio de ligação do oxigênio na mioglobina. O anel porfirínico ocupa quatro dos seis sítios de coordenação do Fe(II). A histidina F8 (His F8) ocupa o quinto sítio de coordenação do ferro (veja o texto). O oxigênio está ligado no sexto sítio de coordenação do ferro, e a histidina E7 fica próxima ao oxigênio. (Leonard Lessin/ Waldo Feng/ Mt. Sinai CORE.)

► FIGURA 4.21 O oxigênio e o monóxido de carbono em ligação com o grupo heme da mioglobina. A presença da histidina E7 força um ângulo de 120° com relação ao oxigênio ou ao CO.



Na ausência da proteína, o ferro do grupo heme pode ser oxidado a Fe(III); o heme oxidado não se ligará ao oxigênio. Assim, a combinação do heme com a proteína é necessária para ligar o O₂ para armazenar oxigênio.

ruptura das ligações, assim desfigura o arranjo das estruturas
Desnaturação e Renaturação (2ª, 3ª e 4ª volta)

As interações não-covalentes que mantêm a estrutura tridimensional de uma proteína são fracas, e por isso não surpreende o fato de que elas possam ser rompidas facilmente. O desdobramento de uma proteína é chamado **desnaturação**. A redução de ligações dissulfeto (Seção 3.5) leva à desorganização ainda maior da estrutura terciária. A desnaturação e a redução das ligações dissulfeto são freqüentemente

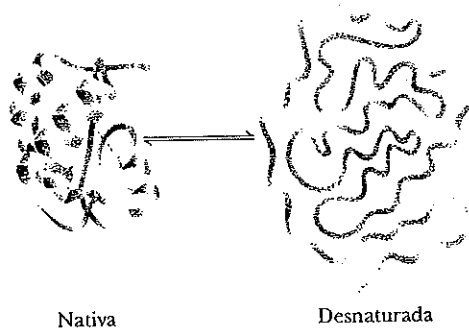
↳ por agentes químicos ou calor

108

combinadas quando se deseja o rompimento completo da estrutura terciária das proteínas. Sob condições experimentais adequadas, a estrutura desfeita pode, então, ser completamente recuperada. Esse processo de desnaturação e renaturação é uma demonstração drástica da relação entre a estrutura primária da proteína e as forças que determinam a estrutura terciária. Para diversas proteínas, vários outros fatores são necessários para a renaturação completa, mas o ponto importante é que a estrutura primária determina a estrutura terciária.

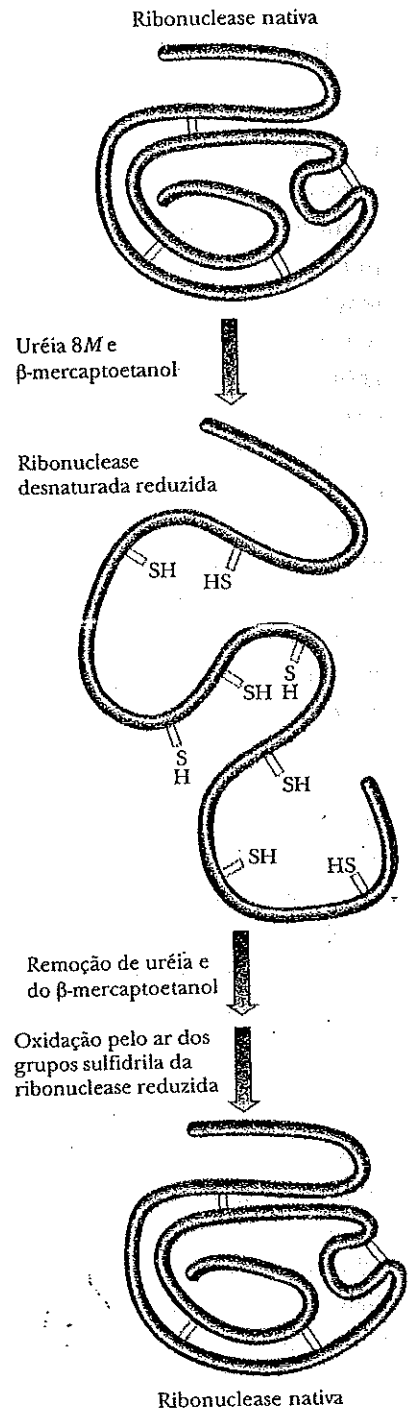
Temperatura
 As proteínas podem ser desnaturadas de diversas formas. Uma delas é o calor. Um aumento na temperatura favorece as vibrações no interior da molécula e a energia dessas vibrações pode tornar-se grande o suficiente para desfazer a estrutura terciária. Em extremos de pH tanto altos como baixos, pelo menos algumas cargas da proteína estão faltando, e, assim, as interações eletrostáticas que normalmente estabilizariam a forma funcional nativa da proteína são drasticamente reduzidas. Isso leva à desnaturação. A ligação de detergentes, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), também desnatura as proteínas. Os detergentes tendem a desfazer as interações hidrofóbicas. Se um detergente possui carga, ele poderá também desfazer as interações eletrostáticas no interior da proteína. Outros reagentes, como a uréia e o hidroclorato de guanidina, formam pontes de hidrogênio com a proteína que são mais fortes que aquelas dentro dela. Esses dois reagentes também podem desfazer interações hidrofóbicas praticamente da mesma forma que os detergentes (Figura 4.22). *▲ = desnaturar*

O β -mercaptoetanol ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$) é frequentemente utilizado para reduzir ligações dissulfeto para dois grupos sulfidril. A uréia normalmente é adicionada à mistura da reação para facilitar o desdobramento protéico e aumentar a acessibilidade de dissulfeto ao agente redutor. Se as condições experimentais forem selecionadas de modo adequado, a conformação nativa da proteína poderá ser recuperada quando o mercaptoetanol e a uréia forem removidos (Figura 4.23). Experi-



▲ FIGURA 4.22 A desnaturação de uma proteína. A conformação nativa pode ser recuperada quando as condições para desnaturação são removidas.

Informações essenciais
 A estrutura primária de uma proteína contém todas as informações necessárias para especificar a estrutura terciária.



▲ FIGURA 4.23 Desnaturação e renaturação na ribonuclease. A proteína ribonuclease pode ser completamente desnaturada pela ação conjunta da uréia e do mercaptoetanol. Quando as condições de desnaturação são retiradas, a atividade protéica é recuperada.

mentos desse tipo fornecem uma das mais fortes evidências de que a seqüência de aminoácidos da proteína contém todas as informações necessárias para produzir a sua estrutura tridimensional completa. Os pesquisadores de proteína buscam com um certo interesse as condições nas quais uma proteína pode ser desnaturada – incluindo a redução de dissulfeto – e sua conformação nativa pode ser recuperada posteriormente.

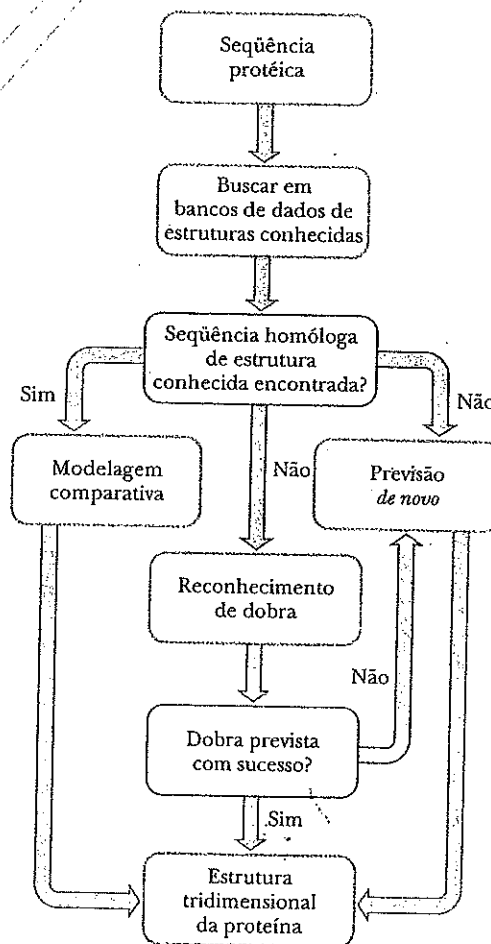
109

4.6 Podemos Prever o Dobramento Protéico a Partir da Seqüência?

Uma vez que a seqüência de aminoácidos determina a estrutura tridimensional de uma proteína, surge naturalmente uma questão: “Podemos prever a estrutura terciária de uma proteína se conhecemos a sua seqüência de aminoácidos?”. A resposta é que podemos, mas com limites. As técnicas modernas de computação facilitam bastante a operação, que exige o processamento de grandes quantidades de informação. O encontro entre a bioquímica e a computação originou o campo promissor da **bioinformática**. A previsão da estrutura protéica é uma das principais aplicações da bioinformática. Outra importante aplicação é a comparação de seqüências de base nos ácidos nucléicos, um tópico que discutiremos no Capítulo 14 (Volume 2), com outros métodos para trabalhar com ácidos nucléicos.

O primeiro passo para prever a arquitetura protéica é a busca em bancos de dados de estruturas conhecidas pela *homologia seqüencial* entre a proteína cuja estrutura será determinada e as proteínas de arquitetura conhecida, em que o termo **homologia** se refere à semelhança entre duas ou mais seqüências. Se a seqüência da proteína conhecida for semelhante o suficiente à da proteína sendo estudada, torna-se o ponto de partida para a *modelagem comparativa*. O uso de algoritmos de modelagem que comparam a proteína em estudo com as estruturas conhecidas leva à previsão de uma estrutura. Esse método é mais útil quando a homologia seqüencial é maior que 25 a 30%. Se a homologia seqüencial for menor que 25 a 30%, outras abordagens são mais úteis. Os algoritmos de *reconhecimento de dobra* permitem a comparação com os motivos conhecidos de dobramento comuns à maioria das estruturas secundárias. Vimos vários desses motivos na Seção 4.3. Aqui há uma aplicação dessas informações. Outro método é a *previsão de novo*, com base nos primeiros princípios da química, da biologia e da física. Esse método também pode originar as estruturas subsequentemente confirmadas pela cristalografia por raios X. O fluxograma na Figura 4.24 mostra como as técnicas de previsão utilizam as informações existentes nos bancos de dados. A Figura 4.25 mostra uma comparação entre as estruturas previstas de duas proteínas (lado direito) para a proteína de reparo do DNA MutS e a proteína bacteriana HI0817. As estruturas do cristal das duas proteínas são mostradas à esquerda.

Uma considerável quantidade de informações sobre seqüências e arquitetura de proteínas está disponível na internet. Um dos recursos mais importantes é o Protein Data Bank, operado sob patrocínio do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Seu URL é



▲ FIGURA 4.24 Fluxograma mostrando o uso de informações existentes em bancos de dados para prever a conformação protéica. (Cortesia de Rob Russell, EMBL.)

Chaperones (moleculas) direcionam a proteina p certo local da célula
 e nos diversos locais → são proteínas cuja função é se ambientar as
 cadeias polipeptídicas para formar os complexos

http://www.rcsb.org/pdb. Esse site, que contém diversos sites espelhados ao redor do mundo, é o único banco de informações estruturais sobre moléculas grandes. Ele inclui materiais sobre ácidos nucleicos, assim como sobre proteínas. Sua página inicial tem um botão com links direcionados especificamente a aplicações educativas.

Conexões Bioquímicas

Prions

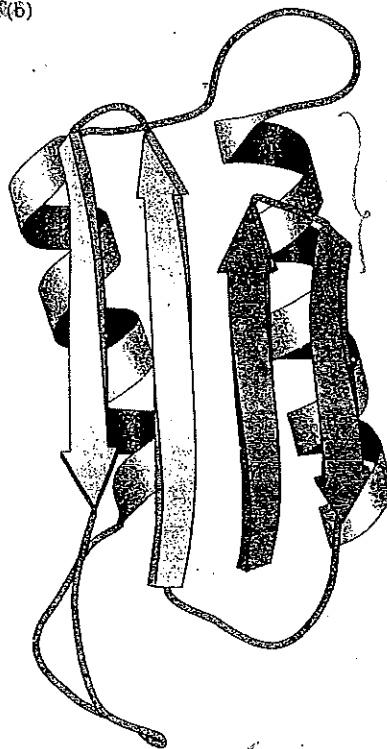
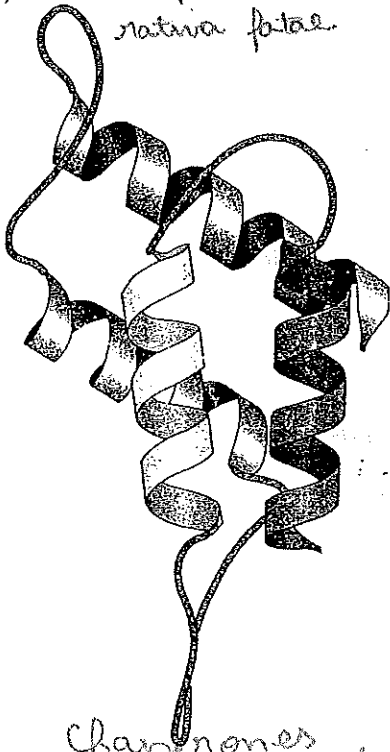
* a importância do dobramento proteico (p/ ter funções!)

Estabeleceu-se que o agente causador da doença da vaca louca, assim como das doenças relacionadas *scrapie* em ovelhas e a encefalopatia espongiforme (kuru e doença de Creutzfeldt-Jakob) nos humanos, é uma pequena (28 kD) proteína chamada **prion**. Prions são glicoproteínas encontradas nas membranas celulares de tecidos nervosos. As doenças aparecem quando a forma normal da proteína prion, PrP (Figura a), dobra-se em uma forma incorreta chamada de PrP^{sc} (Figura b). A forma anormal da proteína prion pode converter outras formas normais em anormais. Como descoberto recentemente, essa mudança pode ser propagada no tecido nervoso. A *scrapie* é conhecida há anos, mas não se sabia que ela cruzava fronteiras entre espécies. Então, foi mostrado que o surto da doença da vaca louca apareceu depois da inclusão de restos de ovelhas na alimentação do gado. Sabe-se atualmente que comer carne contaminada de animais com a doença da vaca louca pode causar a encefalopatia espongiforme, agora conhecida como uma nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob, nos humanos. Prions normais têm alta porcentagem de α -hélices, mas as formas anormais têm maior porcentagem de folhas β pregueadas. Note que, nesse caso, a mesma proteína (uma única sequência bem definida) pode existir sob

formas alternativas. Essas folhas β pregueadas nas proteínas anormais interagem entre as moléculas de proteína e formam placas insolúveis, fato também observado no mal de Alzheimer. Prions anormais ingeridos utilizam macrófagos do sistema imunológico para viajar pelo corpo até entrarem em contato com o tecido nervoso. Então, propagam-se para os nervos até atingirem o cérebro.

Esse mecanismo foi tópicos de uma controvérsia considerável quando foi proposto pela primeira vez. Vários cientistas esperavam a descoberta de que um vírus de ação lenta fosse a causa principal dessas doenças neurológicas. A suscetibilidade a tais doenças pode ser herdada, portanto um certo envolvimento do DNA (ou RNA) era esperado. Alguns chegaram a ponto de falar em "heresia" quando Stanley Prusiner recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1997 por sua descoberta dos prions. Agora, parece que os genes para tal suscetibilidade à forma incorreta existem em todos os vertebrados, originando o padrão de transmissão da doença observado, mas muitos indivíduos com essa suscetibilidade genética nunca desenvolvem a doença se não entram em contato com prions anormais de outra fonte. Veja os artigos de Ferguson e de Peretz na bibliografia deste capítulo.

(a) *Scrapie* = doença degenerativa fatal.



maior % de lipocis beta (B) ANORMAL

◀ (a) Estrutura normal do prion (PrP). (b) Estrutura anormal do prion (PrP^{sc}).

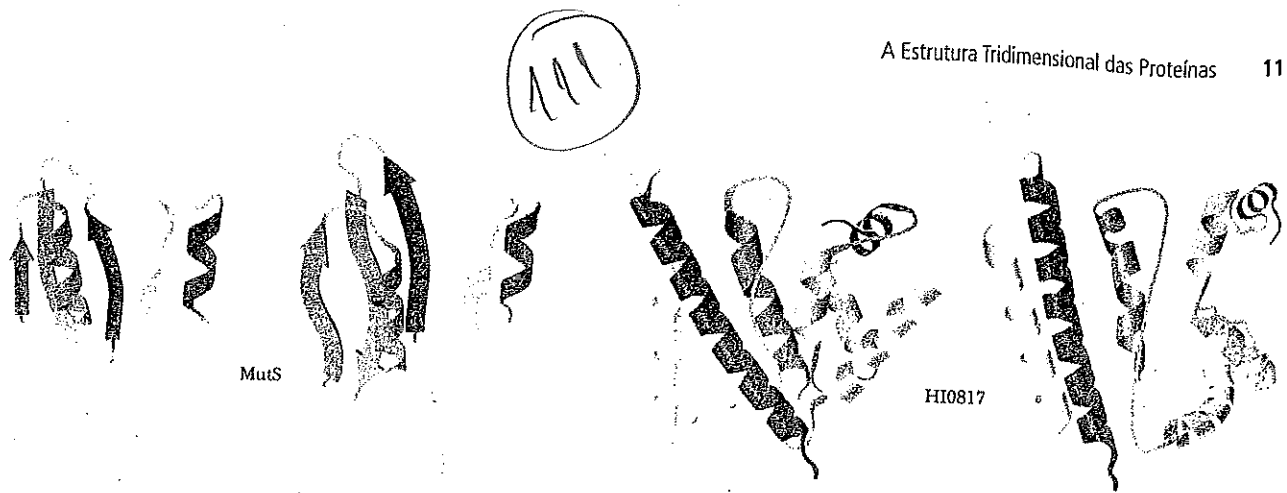
MPP
Cain
P2

Cain
P2

Chaperones

- transportam as proteínas (na forma estendida) p/ local certo
- minimizam as agregações errada
- desfazem as " " defeituosas.
- promovem, por hidrólise, a eliminação das defeituosas

serumina



▲ FIGURA 4.25 Comparação entre as estruturas previstas de duas proteínas (lado direito) para a proteína de reparo do DNA MutS e a proteína bacteriana HI0817. As estruturas do cristal das duas proteínas são mostradas à esquerda. (Cortesia da Universidade de Washington, em Seattle.)

Os resultados da previsão estrutural utilizando os métodos discutidos nesta seção também estão disponíveis na internet. Um dos URLs mais úteis é <http://predictioncenter.llnl.gov/casp5>. Outras excelentes fontes de informação estão disponíveis por meio do National Institutes of Health (<http://pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?iid=1005> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e do servidor do ExPASy (Expert Protein Analysis System), em <http://us.expasy.org>.

* Chaperonas de Dobramento Protéico

A estrutura primária transporta todas as informações necessárias para produzir a estrutura terciária correta, mas o processo de dobramento *in vivo* pode ser um pouco mais complicado. Nesse ambiente denso em proteínas da célula, as proteínas podem começar a se dobrar incorretamente enquanto são produzidas, ou podem começar a se associar a outras proteínas antes de iniciarem seu processo de dobramento. Nos eucariotos, as proteínas podem precisar ficar desdobradas por tempo suficiente para serem transportadas através da membrana de uma organela subcelular. Proteínas especiais chamadas de **chaperonas** ajudam no dobramento correto e preciso de muitas outras (veja o quadro Conexões Bioquímicas no Capítulo 12, Volume 2). A primeira dessas proteínas que foi descoberta é de uma família chamada *hsp70* [para proteína do choque térmico (*Heat-Shock Protein*)] a 70.000 MW, que são proteínas produzidas em *E. coli* cultivada acima das temperaturas ideais. As chaperonas existem em organismos de procaríotos até humanos e seus mecanismos de ação estão sendo estudados atualmente (consulte o artigo de Helfand na bibliografia deste capítulo). Nos últimos anos, tornou-se evidente que a dinâmica do dobramento protéico é crucial para o funcionamento da proteína *in vivo*. O quadro Conexões Bioquímicas da página anterior descreve um exemplo particularmente impressionante da importância do dobramento protéico.

4.7 O que É a Estrutura Quaternária das Proteínas?

A estrutura quaternária é uma propriedade das proteínas que contêm mais de uma cadeia polipeptídica. Cada cadeia é chamada de subunidade. O número de cadeias pode variar de duas a mais de 12, e as cadeias podem ser idênticas ou diferentes. Alguns exemplos que ocorrem normalmente são **dímeros**, **trímeros** e **tetrâmeros**, consistindo em duas, três e quatro cadeias polipeptídicas, respectivamente (o termo genérico para tal molécula, composta por um pequeno número de subunidades, é **oligômero**). As cadeias interagem entre si de forma não-covalente via atrações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

112

Como resultado dessas interações não-covalentes, mudanças sutis na estrutura de um sítio em uma molécula protéica podem causar alterações drásticas nas propriedades em um sítio distante. As proteínas que exibem essa propriedade são chamadas **alostéricas**. Nem todas as proteínas com diversas subunidades têm efeitos alostéricos, embora muitas o apresentem.

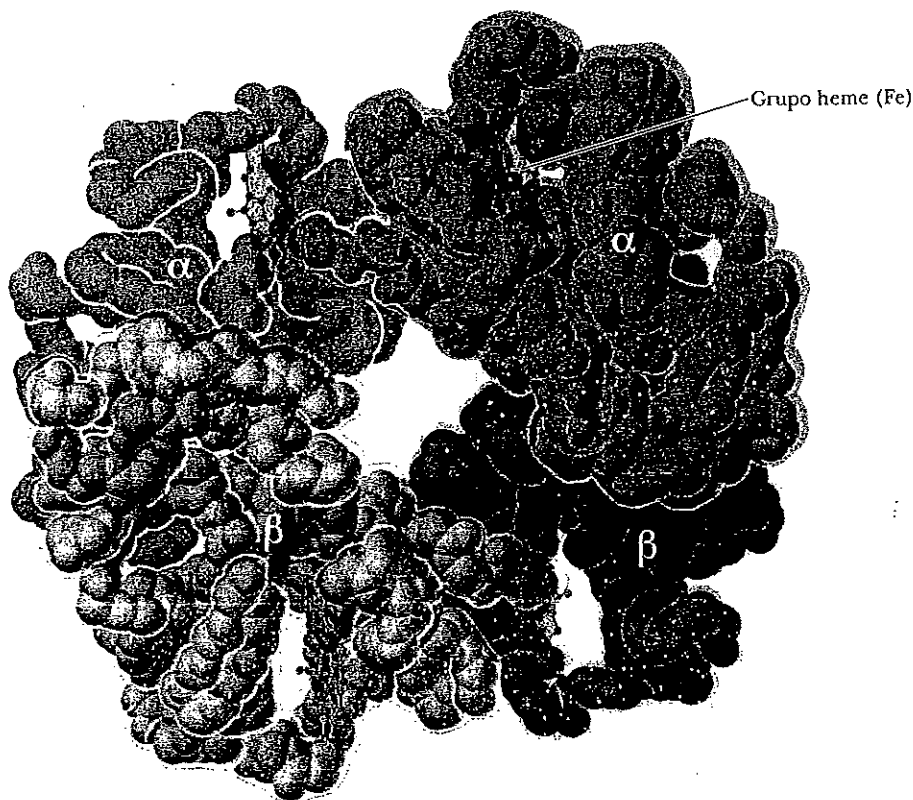
Uma ilustração clássica da estrutura quaternária das proteínas e de seu efeito nas propriedades moleculares é uma comparação entre a hemoglobina, uma proteína alostérica, e a mioglobina, que é composta por uma única cadeia polipeptídica.

Hemoglobina

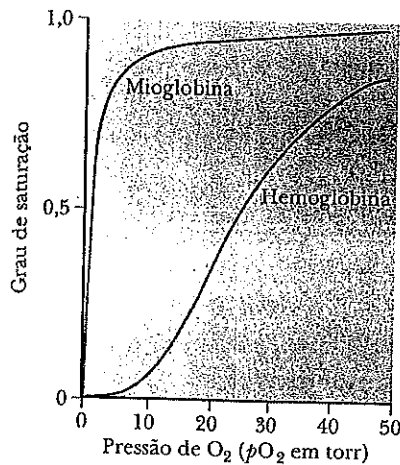
A hemoglobina é um tetrâmero, que consiste em quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α e duas cadeias β , (Figura 4.26). (Nas proteínas oligoméricas, os tipos de cadeias polipeptídicas são designados por letras gregas.) As duas cadeias α da hemoglobina são idênticas, assim como as duas cadeias β . A estrutura geral da hemoglobina é $\alpha_2\beta_2$ na notação de letras gregas. Tanto as cadeias α como as β da hemoglobina são muito semelhantes à cadeia da mioglobina. A cadeia α tem 141 resíduos de comprimento e a cadeia β , 146. Para comparação, a cadeia da mioglobina tem 153 resíduos de comprimento. Seqüências de aminoácidos da cadeia α , da cadeia β e da mioglobina são *homólogas*, isto é, os mesmos resíduos de aminoácido estão nas mesmas posições. O grupo heme é o mesmo na mioglobina e na hemoglobina.

Já vimos que uma molécula de mioglobina liga-se a uma molécula de oxigênio. Quatro moléculas de oxigênio podem, portanto, ligar-se a uma molécula de hemoglobina. Tanto a hemoglobina como a mioglobina se ligam ao oxigênio de forma reversível, mas a ligação de oxigênio à hemoglobina mostra **cooperatividade positiva**, o que não ocorre na mioglobina. Cooperatividade positiva significa que, quando uma molécula de oxigênio é ligada, fica mais fácil para a próxima molécula se ligar. Um gráfico das propriedades de ligação de oxigênio da hemoglobina e da mioglobina é uma das melhores formas de ilustrar esse fato (Figura 4.27).

Quando o grau de saturação da mioglobina com o oxigênio é traçado com relação à pressão de oxigênio, observa-se um crescimento constante da curva até que a saturação completa seja atingida e a



► FIGURA 4.26 Estrutura da hemoglobina. A hemoglobina ($\alpha_2\beta_2$) é um tetrâmero que consiste em quatro cadeias polipeptídicas (duas cadeias α e duas β).



▲ FIGURA 4.27 Comparação entre os comportamentos de ligação de oxigênio da mioglobina e da hemoglobina. A curva da ligação de oxigênio da mioglobina é hiperbólica, enquanto a da hemoglobina é sigmoide. A mioglobina é 50% saturada com oxigênio a pressão parcial de 1 torr; a hemoglobina não atinge a saturação de 50% até que a pressão parcial de oxigênio atinja 26 torr.

curva se torne nivelada. A curva de ligação de oxigênio da mioglobina é, assim, chamada de **hiperbólica**. Por sua vez, o formato da curva de ligação do oxigênio na hemoglobina é **sigmoide**. Essa forma indica que a ligação da primeira molécula de oxigênio facilita a ligação da segunda, que facilita a ligação da terceira, que, então, facilita a ligação da quarta. É exatamente isso o que o termo "ligação cooperativa" quer dizer. No entanto, observe que, embora a ligação cooperativa signifique que ligar cada oxigênio subsequente seja mais fácil que ligar o anterior, a curva de ligação ainda é mais baixa que a da mioglobina em qualquer pressão de oxigênio. Em outras palavras, em qualquer pressão de oxigênio, a mioglobina terá uma porcentagem de saturação mais alta que a hemoglobina.

Os dois tipos de comportamento também são relacionados às funções dessas proteínas. A mioglobina tem a função de *armazenar* oxigênio no músculo. Ela deve ligar-se fortemente ao oxigênio em pressões muito baixas e, então, torna-se 50% saturada em uma pressão parcial de oxigênio de 1 torr. (O torr é uma unidade de pressão amplamente utilizada, mas não é uma unidade do SI. Um torr é a pressão exercida por uma coluna de mercúrio com 1 mm de altura a 0 °C. Uma atmosfera é igual a 760 torr.) A função da hemoglobina é *transportar* oxigênio, e ela

deve poder tanto ligar o oxigênio fortemente como liberá-lo facilmente, dependendo das condições. Nos alvéolos pulmonares (onde a hemoglobina deve ligar-se ao oxigênio para transportá-lo aos tecidos), a pressão de oxigênio é de 100 torr. A essa pressão, a hemoglobina está 100% saturada de oxigênio. Nos capilares de músculos ativos, a pressão de oxigênio é de 20 torr, o que corresponde a menos de 50% de saturação da hemoglobina, que ocorre a 26 torr. Em outras palavras, a hemoglobina libera oxigênio facilmente nos capilares, onde a necessidade de oxigênio é muito grande.

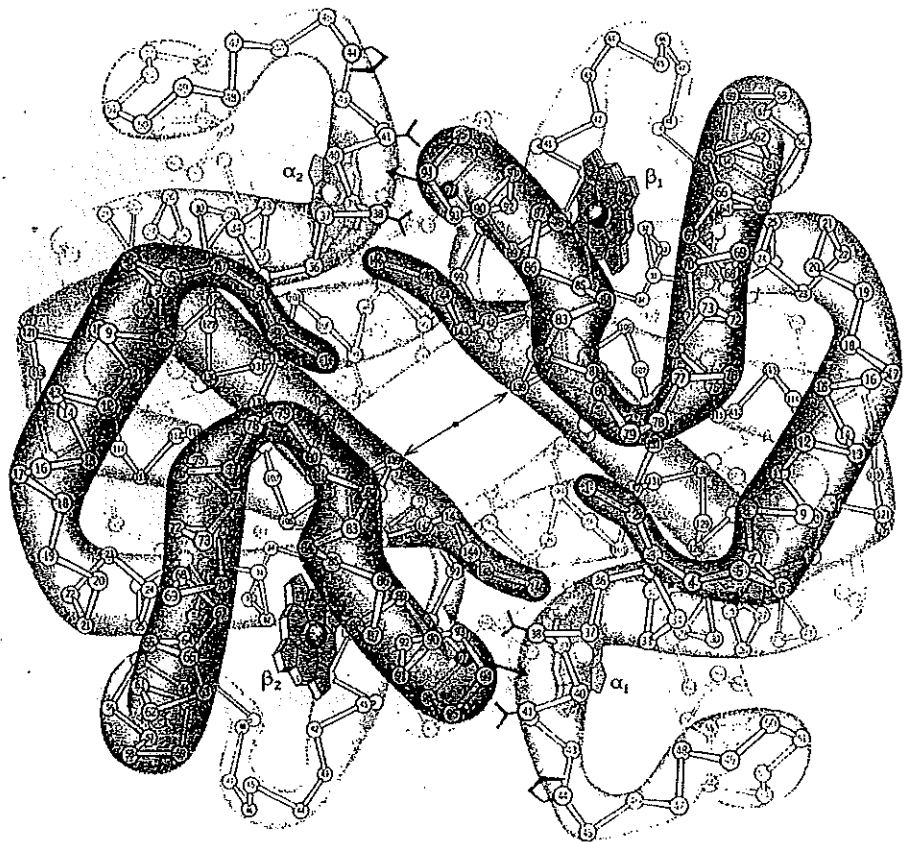
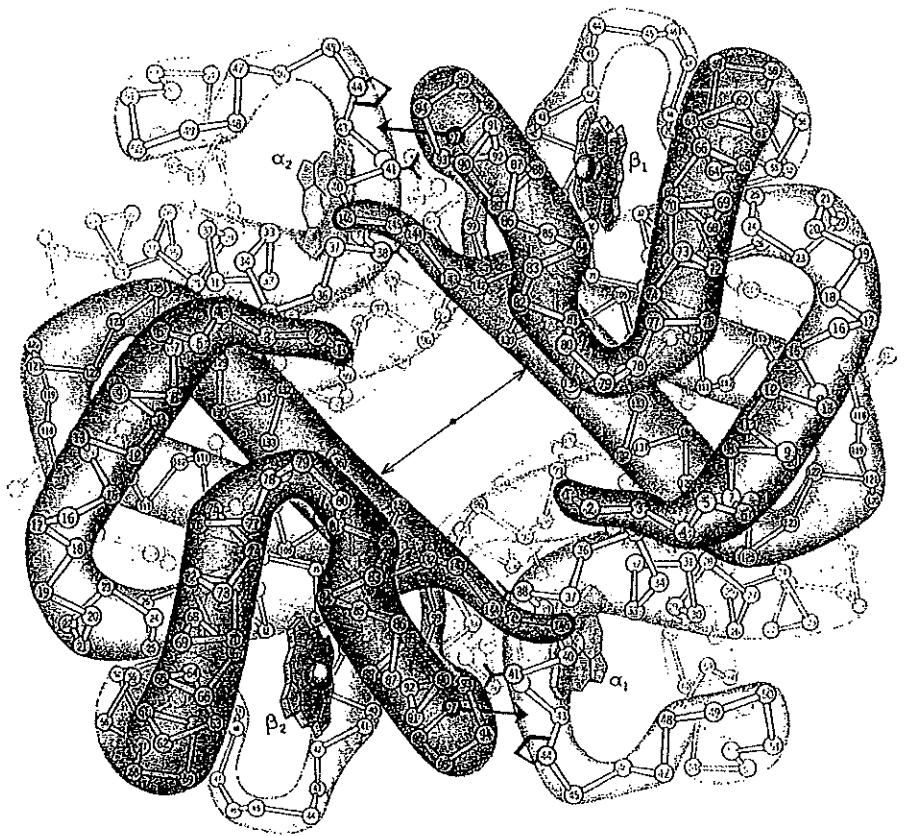
Mudanças estruturais durante a ligação de moléculas pequenas são características de proteínas alostéricas, como a hemoglobina. Esta tem estruturas quaternárias diferentes nas formas ligada (oxigenada) e não ligada (desoxigenada). Na hemoglobina oxigenada, as duas cadeias β são muito mais próximas entre si do que na hemoglobina desoxigenada. A mudança é tão marcante que as duas formas da hemoglobina possuem estruturas cristalinas diferentes (Figura 4.28).

Mudanças Conformacionais que Acompanham a Função da Hemoglobina

Outros ligantes estão envolvidos nos efeitos cooperativos quando o oxigênio se liga à hemoglobina. Tanto o H^+ como o CO_2 , que também se ligam à hemoglobina, afetam a afinidade dela pelo oxigênio, alterando a estrutura tridimensional da proteína de forma sutil, mas importante. O efeito do H^+ (Figura 4.29) é chamado *efeito Bohr*, em homenagem a seu descobridor, Christian Bohr (pai do físico Niels Bohr). A capacidade da mioglobina de ligar-se ao oxigênio não é afetada pela presença de H^+ ou de CO_2 .

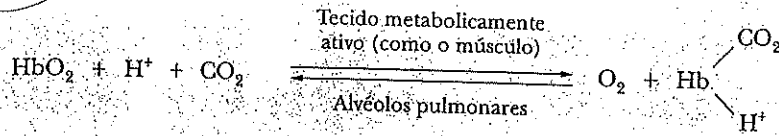
Um aumento na concentração de H^+ (isto é, uma redução do pH) diminui a afinidade da hemoglobina por oxigênio. O aumento do H^+ causa a protonação dos principais aminoácidos, incluindo os N-terminais das cadeias α e a His^{146} das cadeias β . A histidina protonada é atraída para – e estabilizada por – uma ponte salina para a Asp^{94} . Isso favorece a forma desoxigenada de hemoglobina. Um tecido metabolicamente ativo, que requer oxigênio, libera H^+ , acidificando, assim, seu ambiente. A hemoglobina tem uma afinidade menor pelo oxigênio nessas condições e libera oxigênio onde é necessário (Figura 4.30). As propriedades ácido-básicas da hemoglobina afetam – e são afetadas por – suas propriedades de ligação do oxigênio. A forma oxigenada da hemoglobina é um ácido mais forte (tem pK_a menor) que sua forma desoxigenada. Em outras palavras, a hemoglobina desoxigenada tem maior afinidade pelo H^+ que a

114



► FIGURA 4.28 Estruturas da (a) desoxiemoglobina e (b) oxiemoglobina. Observe as movimentações das subunidades umas em relação às outras. Há muito menos espaço livre no centro da oxiemoglobina. (Ilustração por Irving Geis. Direitos de propriedade do Howard Hughes Medical Institute. Não pode ser reproduzida sem autorização.)

115

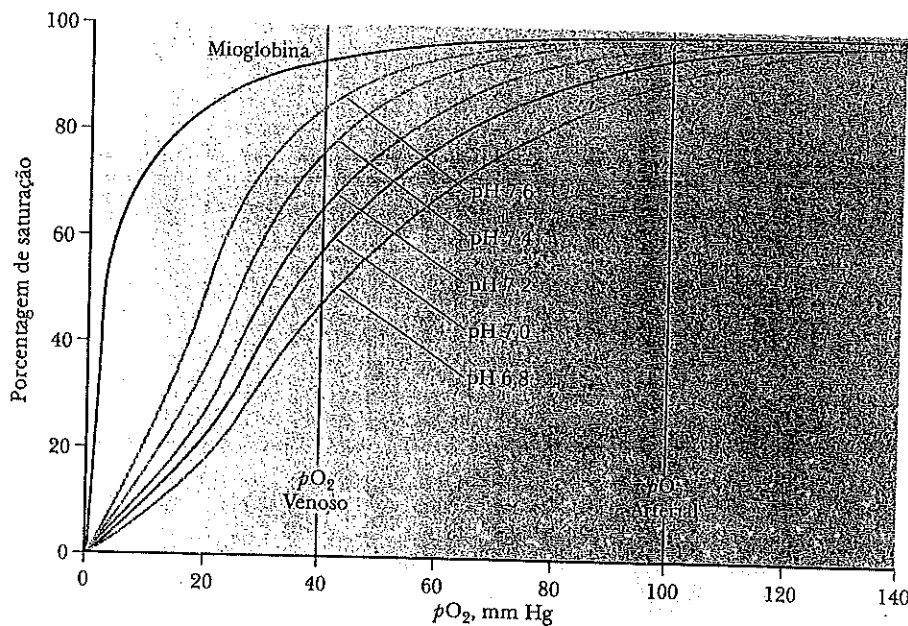
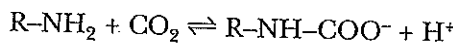


◀ FIGURA 4.29 Características gerais do efeito Bohr. Em tecido metabolicamente ativo, a hemoglobina libera oxigênio e liga-se ao CO₂ e ao H⁺. Nos pulmões, a hemoglobina libera CO₂ e H⁺ e liga-se ao oxigênio.

forma oxigenada. Assim, as mudanças na estrutura quaternária da hemoglobina podem modular o tamponamento do sangue por meio da própria molécula de hemoglobina.

A Tabela 4.1 resume as características importantes do efeito Bohr.

Grandes quantidades de CO₂ são produzidas pelo metabolismo. O CO₂, por sua vez, forma o ácido carbônico, H₂CO₃. O pK_a do H₂CO₃ é 6,35; o pH normal do sangue é 7,4. Como consequência, cerca de 90% do CO₂ dissolvido estarão presentes como íon bicarbonato, HCO₃⁻, liberando H⁺. (A equação de Henderson-Hasselbalch pode ser utilizada para confirmar esse fato.) O sistema de tamponamento *in vivo* envolvendo o H₂CO₃ e o HCO₃⁻ no sangue foi discutido na Seção 2.6. A presença de maiores quantidades de H⁺ como resultado da produção de CO₂ favorece a estrutura quaternária característica da hemoglobina desoxigenada. Portanto, a afinidade da hemoglobina por oxigênio é reduzida. O HCO₃⁻ é transportado até os pulmões, onde se une ao H⁺ liberado quando a hemoglobina é oxigenada, formando H₂CO₃. Por sua vez, o H₂CO₃ libera CO₂, que é, então, exalado. A hemoglobina também transporta algum CO₂ diretamente. Quando a concentração de CO₂ é alta, ela se combina aos grupos amina livres para formar carbamato:



◀ FIGURA 4.30 Curvas de saturação de oxigênio para a mioglobina e a hemoglobina em cinco valores diferentes de pH.

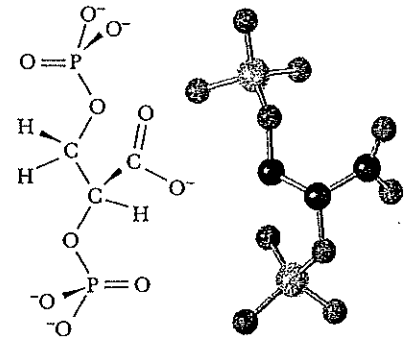
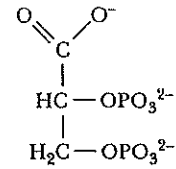
Tabela 4.1	
Resumo do Efeito Bohr	
Pulmões	Músculo Metabolicamente Ativo
Maior pH que no tecido metabolicamente ativo	Menor pH devido à produção de H ⁺
Hemoglobina liga-se ao O ₂	Hemoglobina libera O ₂
Hemoglobina libera H ⁺	Hemoglobina liga-se ao H ⁺

116

Essa reação transforma os terminais α -aminas em ânions, que, então, podem interagir com a cadeia α Arg¹⁴¹, também estabilizando a forma desoxigenada.

Na presença de grandes quantidades de H⁺ e CO₂, como no tecido respiratório, a hemoglobina libera oxigênio. A presença de grande quantidade de oxigênio nos pulmões reverte o processo, fazendo que a hemoglobina se ligue ao O₂. A hemoglobina oxigenada pode, então, transportar oxigênio aos tecidos. O processo é complexo, mas permite um ajuste preciso do pH, assim como dos níveis de CO₂ e O₂.

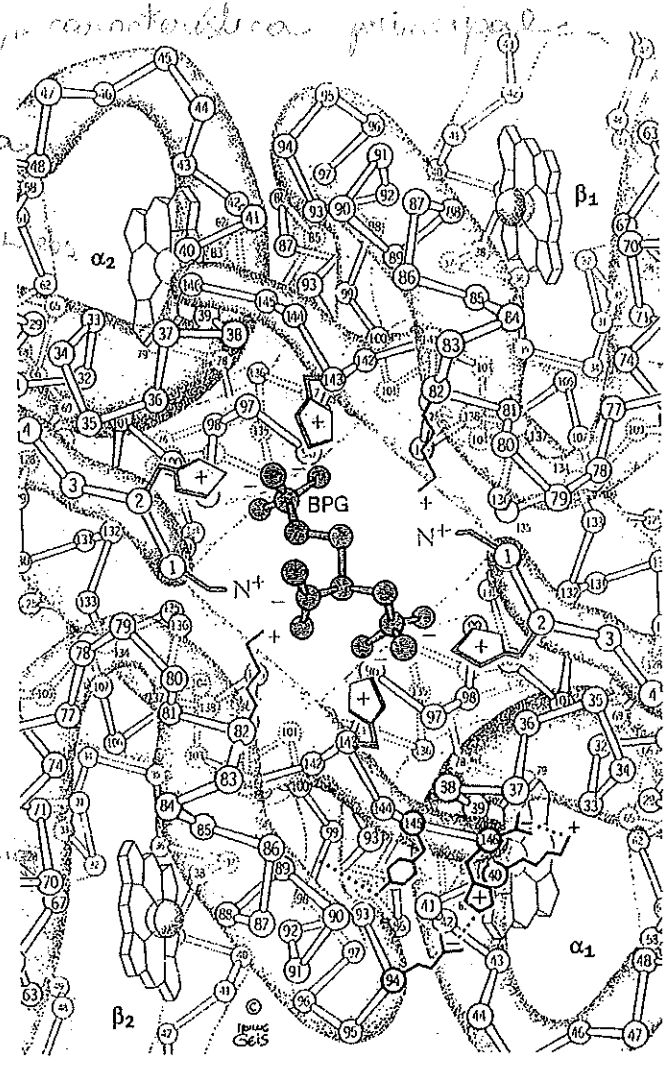
A hemoglobina no sangue também está ligada a um outro ligante, o 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) (Figura 4.31), com efeitos drásticos em sua capacidade de ligação com o oxigênio. A ligação do BPG à hemoglobina é eletrostática; ocorrem interações específicas entre as cargas negativas do BPG e as cargas positivas da proteína (Figura 4.32). Na presença de BPG, a pressão parcial na qual 50% da hemoglobina se liga ao oxigênio é de 26 torr. Se não houvesse BPG no sangue, a capacidade de ligação ao oxigênio da hemoglobina



▲ FIGURA 4.31 A estrutura do BPG (2,3-bisfosfoglicerato), um importante efector alostérico da hemoglobina.

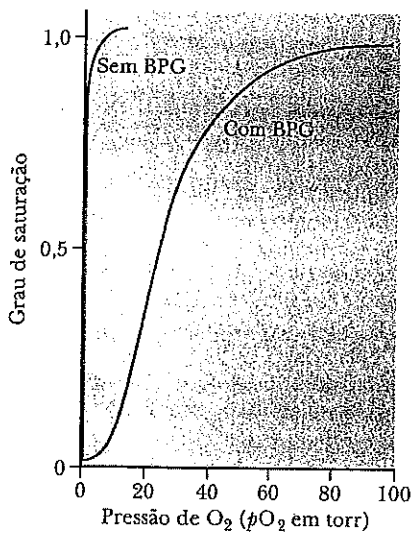
ATP
 A parte
 Enzimas → São específicas!
 ↳ acessórios: co-fator e co-enzima
 (ions) (NAD e FAD)
 Sacarose $\xrightarrow{\text{degradação}}$ CO₂ + H₂O + ATP
 + O₂

► FIGURA 4.32 Ligação do BPG à desoxiemo-globina. Observe as interações eletrostáticas entre o BPG e a proteína. (Ilustração por Irving Geis. Direitos de propriedade do Howard Hughes Medical Institute. Não pode ser reproduzida sem autorização.)

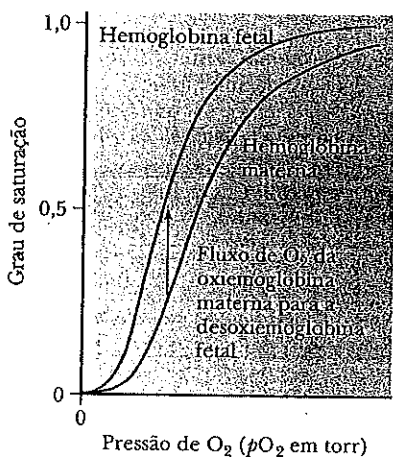


Qual a função da membrana plasmática procarionica (q tem em comum com as eucarionicas)?
 ↳ Respiração: transf de e⁻ plasm.
 ↳ receptores de e⁻ (nos animais) plasm.
 ↳ síntese de ATP (na membrana)
 ↳ necessita de VÁRIAS enzimas plasm. procarion.
 ↳ não tem NAD

↳ não tem NAD



▲ FIGURA 4.33 Comparação entre as propriedades de ligação de oxigênio da hemoglobina na presença e na ausência de BPG. Observe que a presença de BPG reduz acentuadamente a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.



▲ FIGURA 4.34 Comparação entre a capacidade de ligação de oxigênio das hemoglobinas fetal e materna. A hemoglobina fetal liga-se menos fortemente ao BPG e, conseqüentemente, tem maior afinidade pelo oxigênio que a hemoglobina materna.

seria muito maior (50% da hemoglobina ligada ao oxigênio ao redor de 1 torr), e pouco oxigênio seria liberado nos capilares. A hemoglobina "purificada", que é isolada do sangue e da qual o BPG endógeno foi removido, exibe esse comportamento (Figura 4.33).

O BPG também tem papel no suprimento de oxigênio para o feto em crescimento. O feto recebe oxigênio da corrente sanguínea da mãe via placenta. A hemoglobina fetal (Hb F) tem maior afinidade pelo oxigênio que a hemoglobina materna, o que permite a transferência eficiente de oxigênio da mãe para o feto (Figura 4.34). Duas características da hemoglobina fetal contribuem para essa maior capacidade de ligação de oxigênio. Uma é a presença de duas cadeias polipeptídicas diferentes. A estrutura da subunidade da Hb F é $\alpha_2\gamma_2$, em que as cadeias β da hemoglobina adulta (Hb A), a hemoglobina normal, foram substituídas pelas cadeias γ , que têm estrutura semelhante, mas não idêntica. A segunda característica é que a Hb F se liga menos fortemente ao BPG que a Hb A. Na cadeia β da hemoglobina adulta, a His¹⁴³ forma uma ponte salina até o BPG. Na hemoglobina fetal, a cadeia γ tem uma substituição de aminoácido, de uma serina para a His¹⁴³. Essa mudança de um aminoácido carregado positivamente para um neutro diminui o número de contatos entre a hemoglobina e o BPG, reduzindo efetivamente o efeito alostérico o suficiente para dar à hemoglobina fetal uma curva de ligação mais alta que a da hemoglobina adulta.

Resumo

4.1 Como a Estrutura das Proteínas Determina Sua Função? A estrutura das proteínas é complexa, com poucas estruturas regulares óbvias. Diversas conformações tridimensionais são possíveis para as proteínas, mas apenas uma, ou no máximo poucas, têm atividade biológica — essas são chamadas de conformações nativas. Para facilitar a determinação da estrutura, é costume definir quatro níveis de organização.

4.2 O que É a Estrutura Primária das Proteínas? A estrutura primária é a ordem na qual os aminoácidos se unem de forma covalente. A estrutura primária de uma proteína pode ser determinada por métodos químicos. A seqüência de aminoácidos (estrutura primária) de uma proteína determina sua estrutura tridimensional, o que, por sua vez, determina suas propriedades. Um exemplo notável da importância da estrutura primária é a anemia falciforme, uma doença causada pela mudança de um aminoácido em duas das quatro cadeias da hemoglobina.

4.3 O que É a Estrutura Secundária das Proteínas? A estrutura secundária é o arranjo espacial do esqueleto mantido por pontes de hidrogênio, a cadeia polipeptídica. Alguns dos arranjos de esqueleto mais importantes são o α -hélice, a folha β pregueada e a volta β . Elas podem ser combinadas de diversas formas para produzir motivos estruturais que ocorrem em várias proteínas.

4.4 O que Podemos Dizer sobre a Termodinâmica do Dobramento Protéico? Os níveis de ordem mais elevada da estrutura (secundário e terciário) dependem principalmente de interações não-covalentes, incluindo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e formação de complexos de íons metálicos. As interações hidrofóbicas, que dependem da entropia desfavorável da água que envolve solutos apolares de hidratação, são particularmente importantes para determinar o dobramento protéico.

4.5 O que É a Estrutura Terciária das Proteínas? A estrutura terciária inclui o arranjo tridimensional de todos os átomos na proteína. As estruturas tridimensionais das proteínas podem ser completamente desfeitas e, sob condições experimentais adequadas, completamente recuperadas. Esse processo de desnaturação e renaturação é um exemplo impressionante da relação entre a estrutura primária da proteína e as forças que determinam a estrutura terciária. As estruturas secundária e terciária de uma proteína podem ser determinadas simultaneamente pela cristalografia por raios X. A proteína mioglobina, armazenadora de oxigênio, foi a primeira proteína para a qual a estrutura terciária completa foi determinada pela cristalografia.

4.6 Podemos Prever o Dobramento Protéico a Partir da Seqüência? É possível, até certo ponto, prever a estrutura tridimensional de uma proteína a partir de sua seqüência de aminoácidos. Os algoritmos por computador se baseiam em duas abordagens, uma das quais é baseada na comparação de seqüências com as das proteínas cujo padrão de dobramento é conhecido. A outra abordagem se baseia nos motivos de dobramento que ocorrem em diversas proteínas.

4.7 O que É a Estrutura Quaternária das Proteínas? A estrutura quaternária é o arranjo de subunidades em proteínas com múltiplas subunidades. As cadeias polipeptídicas individuais de proteínas com múltiplas subunidades interagem entre si de forma não-covalente. Como resultado, mudanças sutis na estrutura em um sítio da molécula podem causar alterações drásticas em propriedades de um sítio distante. As proteínas com essa propriedade são chamadas alostéricas. As propriedades da proteína alostérica hemoglobina podem ser contrastadas com as da mioglobina, que não é alostérica. Na hemoglobina, uma proteína transportadora de oxigênio, a ligação de oxigênio é cooperativa (à medida que cada oxigênio é ligado, fica mais fácil para o próximo se ligar) e é modulada por ligantes como H^+ , CO_2 e BPG. A ligação de oxigênio à mioglobina não é cooperativa.

Perguntas Essenciais para Revisão

4.1 Como a Estrutura das Proteínas Determina sua Função?

1. Verificação de Fatos Associe as seguintes afirmações sobre a estrutura protéica com seus níveis adequados de organização.

- | | | |
|---------------------------|---|---|
| (a) Estrutura primária | (1) Arranjo tridimensional de todos os átomos | b |
| (b) Estrutura secundária | (2) A ordem dos resíduos de aminoácido na cadeia polipeptídica | a |
| (c) Estrutura terciária | (3) A interação entre as subunidades em proteínas que consistem em mais de uma cadeia polipeptídica | d |
| (d) Estrutura quaternária | (4) O arranjo do esqueleto polipeptídico mantido por pontes de hidrogênio | c |

2. Verificação de Fatos Defina desnaturação em termos dos seus efeitos nas estruturas secundária, terciária e quaternária.

3. Verificação de Fatos Qual é a natureza da estrutura "aleatória" das proteínas?

4.2 O que É Estrutura Primária das Proteínas?

4. Pergunta de Raciocínio Sugira uma explicação para a observação de que, quando as proteínas são quimicamente modificadas para que as cadeias laterais específicas tenham uma natureza química diferente, elas não podem mais ser desnaturadas de forma reversível.

5. Pergunta de Raciocínio Racionalize as seguintes observações:

- A serina é o resíduo de aminoácido que pode ser substituído causando menor efeito sobre a estrutura e a função de uma proteína.
- A substituição do triptofano causa o maior efeito sobre a estrutura e a função de uma proteína.
- Substituições como $Lys \rightarrow Arg$ e $Leu \rightarrow Ile$ normalmente têm pouquíssimo efeito sobre a estrutura e a função de uma proteína.

119

6. **Pergunta de Raciocínio** A glicina é um aminoácido altamente conservado nas proteínas (ou seja, é encontrado na mesma posição na estrutura primária de proteínas relacionadas). Sugira um motivo para isso ocorrer.
7. **Pergunta de Raciocínio** Uma mutação que altera um resíduo de alanina em uma proteína para uma isoleucina leva à perda de atividade de tal proteína. A atividade é recuperada quando uma outra mutação no mesmo sítio transforma a isoleucina em glicina. Por quê?
8. **Pergunta de Raciocínio** Um estudante de bioquímica caracteriza o processo de cozinhar carne como um exercício de desnaturação de proteínas. Comente a validade dessa observação.
9. **Conexões Bioquímicas** A doença da imunodeficiência combinada severa (SCID) é caracterizada pela ausência total de um sistema imunológico. Linhagens de camundongos com essa doença (que são predispostos a doenças causadas por príons) quando são infectados por PrP^{sc}, eles não desenvolvem essas doenças. Como esses fatos se relacionam à transmissão de doenças causadas por príons?
10. **Conexões Bioquímicas** Uma linhagem isolada de ovelhas foi encontrada na Nova Zelândia. A maioria delas tinha o gene para predisposição a *scrapie*, mas nenhum animal contraiu a doença. Como esses fatos se relacionam à transmissão de doenças causadas por príons?

4.3 O que É Estrutura Secundária das Proteínas?

11. **Verificação de Fatos** Cite as três principais diferenças entre proteínas fibrosas e globulares.
12. **Conexões Bioquímicas** O que é a razão de eficiência protéica?
13. **Conexões Bioquímicas** Que alimento tem o maior REP?
14. **Conexões Bioquímicas** Quais são os aminoácidos essenciais?
15. **Conexões Bioquímicas** Por que os cientistas estão atualmente tentando criar alimentos geneticamente modificados?
16. **Verificação de Fatos** O que são ângulos de Ramachandran?
17. **Verificação de Fatos** O que é uma protuberância β ?
18. **Verificação de Fatos** O que é uma volta reversa? Desenhe dois tipos.
19. **Verificação de Fatos** Cite algumas diferenças entre as formas de α -hélice e de folha β pregueada da estrutura secundária.
20. **Verificação de Fatos** Cite algumas combinações possíveis entre α -hélices e folhas β pregueadas de estruturas supersecundárias.
21. **Verificação de Fatos** Por que a prolina é frequentemente encontrada em sítios onde a cadeia polipeptídica se curva em um ângulo fechado nas moléculas de mioglobina e hemoglobina?
22. **Verificação de Fatos** Por que a glicina deve ser encontrada em intervalos regulares na tripla hélice do colágeno?
23. **Pergunta de Raciocínio** Você ouviu o comentário de que a diferença entre lã e seda é a diferença entre estruturas helicoidais e a de folha pregueada. Você considera esse ponto de vista válido? Por quê?
24. **Pergunta de Raciocínio** As roupas de lã encolhem quando lavadas em água quente, mas peças de seda, não. Sugira um motivo, com base nas informações deste capítulo.

4.4 O que Podemos Dizer sobre a Termodinâmica do Dobramento Protéico?

25. **Verificação de Fatos** Cite cinco forças responsáveis pela manutenção das formas tridimensionais corretas das proteínas. Especifique quais grupos na proteína estão envolvidos em cada tipo de interação.

26. **Pergunta de Raciocínio** Comente sobre a energética do dobramento protéico com base nas informações deste capítulo.

4.5 O que É a Estrutura Terciária das Proteínas?

27. **Verificação de Fatos** Desenhe duas pontes de hidrogênio, uma que faça parte de uma estrutura secundária e outra que faça parte de uma estrutura terciária.
28. **Verificação de Fatos** Desenhe uma interação eletrostática possível entre dois aminoácidos em uma cadeia polipeptídica.
29. **Verificação de Fatos** Desenhe uma ligação dissulfeto entre duas cisteínas em uma cadeia polipeptídica.
30. **Verificação de Fatos** Desenhe a região de uma cadeia polipeptídica mostrando um bolsão hidrofóbico que contenha cadeias laterais apolares.
31. **Verificação de Fatos** O que é uma chaperona?
32. **Pergunta de Raciocínio** Os termos *configuração* e *conformação* aparecem em descrições de estrutura molecular. Qual a diferença entre eles?
33. **Pergunta de Raciocínio** Teoricamente, uma proteína pode assumir um número praticamente infinito de configurações e conformações. Sugira algumas características protéicas que limitem drasticamente esse número.
34. **Pergunta de Raciocínio** Qual é o maior nível de estrutura protéica encontrado no colágeno?

4.6 Podemos Prever o Dobramento Protéico a Partir da Seqüência?

35. **Pergunta de Raciocínio** Você descobriu uma nova proteína, cuja seqüência tem cerca de 25% de homologia com a ribonuclease A. Como você realizaria a previsão, em vez da determinação experimental, de sua estrutura terciária?
36. **Pergunta de Raciocínio** Entre no site da RCSB para o Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Dê uma breve descrição da molécula prefoldin, que pode ser encontrada em *chaperonas*.

4.7 O que É a Estrutura Quaternária das Proteínas?

37. **Conexões Bioquímicas** O que é um príon?
38. **Conexões Bioquímicas** Quais são as doenças conhecidas causadas por príons anormais?
39. **Conexões Bioquímicas** Quais são as estruturas secundárias protéicas diferentes entre um príon normal e outro infeccioso?
40. **Verificação de Fatos** Cite duas semelhanças e duas diferenças entre a hemoglobina e a mioglobina.
41. **Verificação de Fatos** Quais são os dois aminoácidos essenciais próximos ao grupo heme na hemoglobina e na mioglobina?
42. **Verificação de Fatos** Qual é o maior nível de organização na mioglobina? E na hemoglobina?
43. **Verificação de Fatos** Sugira uma forma na qual a diferença entre funções da hemoglobina e da mioglobina está refletida nos formatos de suas respectivas curvas de ligação de oxigênio.
44. **Verificação de Fatos** Descreva o efeito Bohr.
45. **Verificação de Fatos** Descreva o efeito do 2,3-bisfosfoglicerato na ligação do oxigênio à hemoglobina.
46. **Verificação de Fatos** Como a curva de ligação de oxigênio da hemoglobina fetal é diferente daquela encontrada na hemoglobina materna?
47. **Verificação de Fatos** Qual é a diferença essencial de aminoácido entre a cadeia β e a cadeia γ da hemoglobina?

48. **Pergunta de Raciocínio** Na hemoglobina oxigenada, $pK_a = 6,6$ para as histidinas na posição 146 das cadeias β . Na hemoglobina desoxigenada, o pK_a desses resíduos é 8,2. Como essa informação pode estar correlacionada ao efeito Bohr?
49. **Pergunta de Raciocínio** Você está estudando com uma amiga que está no processo de descrição do efeito Bohr. Ela te diz que, nos pulmões, a hemoglobina se liga ao oxigênio e libera íons hidrogênio. Como resultado, o pH aumenta. Ela também diz que, no tecido muscular metabolicamente ativo, a hemoglobina libera oxigênio e se liga ao íon hidrogênio e, como resultado, o pH diminui. Você concorda com o raciocínio dela? Por quê?
50. **Pergunta de Raciocínio** Como a diferença entre a cadeia β e a cadeia γ da hemoglobina explica as diferenças na ligação de oxigênio entre a Hb A e a Hb F?
51. **Pergunta de Raciocínio** Sugira um motivo para a observação de que as pessoas com anemia falciforme às vezes

têm problemas de respiração durante vôos em grandes altitudes.

52. **Pergunta de Raciocínio** Um feto homocigoto para Hb S tem Hb F normal?
53. **Pergunta de Raciocínio** Por que a Hb fetal é essencial para a sobrevivência de animais placentários?
54. **Pergunta de Raciocínio** Por que é de esperar encontrar alguma Hb F em adultos que sofrem de anemia falciforme?
55. **Pergunta de Raciocínio** Quando a desoxiemoglobina foi isolada pela primeira vez em sua forma cristalina, o pesquisador notou que os cristais mudavam de cor, de púrpura para vermelho, e também de formato, enquanto ele os olhava ao microscópio. O que está acontecendo em nível molecular? *Dica:* os cristais foram montados em uma lâmina de microscópio com uma lamínula *levemente* colocada sobre ela.

Bibliografia Comentada

- Ferguson, N. M.; Ghan, A. C.; Donnelly, C. A.; Hagenaars, T. J.; Anderson, R. M. Estimating the Human Health Risk from Possible BSE Infection of the British Sheep Flock. *Nature*, n. 415, p. 420-424, 2002. [O título diz tudo: estimativa do risco à saúde humana de possível infecção de encefalopatia espongiforme pelo rebanho britânico de ovelhas.]
- Gibbons, A.; Hoffman, M. New 3-D Protein Structures Revealed. *Science*, n. 253, p. 382-383, 1991. [Exemplos do uso de cristalografia por raios X para determinar a estrutura protéica.]
- Gierasch, L. M.; King, J. (eds.) *Protein Folding: Deciphering the Second Half of the Genetic Code*. Waldorf, Md.: AAAS Books, 1990. [Coletânea de artigos sobre descobertas recentes relacionadas aos processos envolvidos no dobramento protéico. Ênfase em métodos experimentais para estudo do dobramento protéico.]
- Hall, S. Protein Images Update Natural History. *Science*, n. 267, p. 620-624, 1995. [Combinação entre cristalografia por raios X e software de computador para produzir imagens da estrutura protéica.]
- Hauptmann, H. The Direct Methods of X-ray Crystallography. *Science*, n. 233, p. 178-183, 1986. [Discussão sobre os aprimoramentos dos métodos de cálculos envolvidos na determinação da estrutura protéica, baseada em um discurso do Prêmio Nobel. Esse artigo deve ser lido em conjunto com o de Karle e oferece um contraste interessante com os artigos de Perutz, ambos descrevendo os marcos iniciais na cristalografia por proteínas.]
- Helfand, S. L. Chaperones Take Flight. *Science*, n. 295, p. 809-810, 2002. [Artigo sobre o uso de chaperonas para combater o mal de Parkinson.]
- Holm, L.; Sander, C. Mapping the Protein Universe. *Science*, n. 273, p. 595-602, 1996. [Artigo sobre a busca em bancos de dados quanto à estrutura protéica para prever a estrutura tridimensional de proteínas. Parte de uma série de artigos sobre informática na biologia.]
- Karle, J. Phase Information from Intensity Data. *Science*, n. 232, p. 837-843, 1986. [Discurso do Prêmio Nobel sobre cristalografia por raios X. Veja comentários sobre o artigo feitos por Hauptmann.]
- Kasha, K. J. Biotechnology and the World Food Supply. *Genome*, n. 42, v. 4, p. 642-645, 1999. [As proteínas são frequentemente escassas na dieta de muitas pessoas ao redor do mundo, mas a tecnologia pode ajudar a melhorar essa situação.]
- Mitten, D. D.; MacDonald, R.; Klonus, D. Regulation of Foods Derived from Genetically Engineered Crops. *Curr. Opin. Biotechnol.*, n. 10, p. 298-302, 1999. [Como a engenharia genética pode afetar o suprimento de alimentos, especialmente o de proteínas.]
- O'Quinn, P. R.; Nelsens, J. L.; Goodband, R. D.; Knabe, D. A.; Woodworth, J. C.; Tokach, M. D.; Lohrmann, T. T. Nutritional Value of a Genetically Improved High-Lysine, High-Oil Corn for Young Pigs. *J. Anim. Sci.*, n. 78, v. 8, p. 2144-2149, 2000. [A disponibilidade de aminoácidos afeta as proteínas formadas.]
- Peretz, D.; Williamson, R. A.; Kaneko, K.; Vergara, J.; Leclerc, E.; Schmitt-Ulms, G.; Mehlhorn, I. R.; Legname, C.; Wormald, M. R.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Burton, R. D.; Prusiner, S. B. Antibodies Inhibit Prion Propagation and Clear Cell Cultures of Prion Infectivity. *Nature*, n. 412, p. 739-742, 2001. [Descrição de um possível tratamento para doenças causadas por príons.]
- Perutz, M. The Hemoglobin Molecule. *Sci. Amer.*, n. 211, v. 5, p. 64-76, 1964. [Descrição do trabalho que levou ao Prêmio Nobel.]
- Perutz, M. The Hemoglobin Molecule and Respiratory Transport. *Sci. Amer.*, n. 239, v. 6, p. 92-125, 1978. [A relação entre estrutura molecular e ligação cooperativa de oxigênio.]
- Ruibal-Mendieta, N. L.; Lints, F. A. Novel and Transgenic Food Crops: Overview of Scientific versus Public Perception. *Transgenic Res.*, n. 7, v. 5, p. 379-386, 1998. [Aplicação prática da pesquisa sobre estruturas protéicas.]
- Yam, P. Mad Cow Disease's Human Toll. *Sci. Amer.*, n. 284, v. 5, p. 12-13, 2001. [Panorama da doença da vaca louca e como ela passou a infectar os seres humanos.]

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and is too light to transcribe accurately.

Bibliographic Committee

11