

Aminoácidos e proteínas

Prof. Dr. Henning Ulrich

Aminoácidos e a Ligação Peptídica: a base estrutural das proteínas

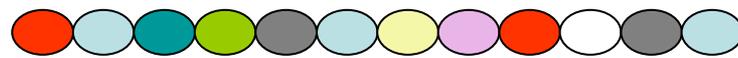
Aminoácidos proteicos:

- propriedades gerais
- classificação
- ionização e carácter anfotérico

Ligação peptídica *versus* ligação amida:

- ressonância e coplanariedade

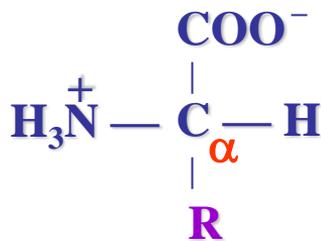
Proteínas podem ser definidas como polímeros compostos de n unidades monoméricas, os aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas



Proteína (polímero)

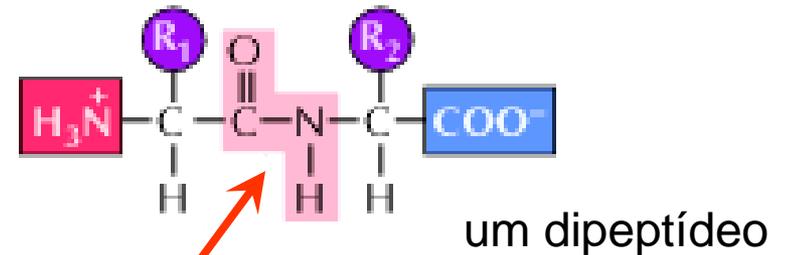
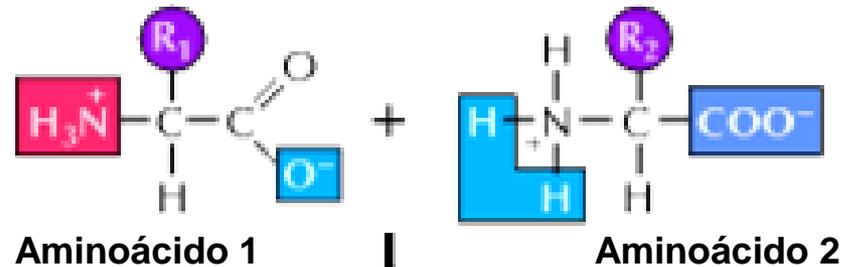
(monômero)

aminoácido



Fórmula geral de um α aminoácido:
os grupos amino e carboxila estão
no carbono α .

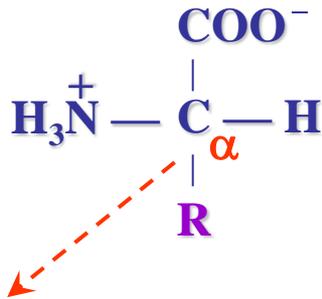
R – a cadeia lateral R diferencia os
aminoácidos entre si



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

Até 100 aminoácidos (10 kDa) \rightarrow peptídeo
Mais de 100 aminoácidos \rightarrow proteína

Para entender a complexidade estrutural de uma proteína é necessário primeiro compreender as propriedades de seus aminoácidos constituintes.



Aminoácidos proteicos são L- α - aminoácidos

O Carbono α é assimétrico, ou seja, tem 4 ligantes diferentes

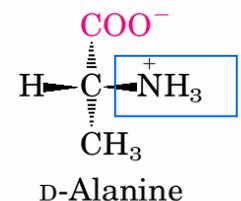
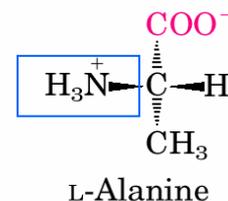
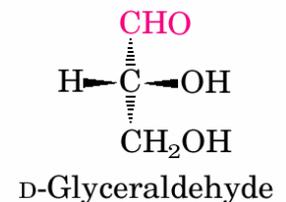
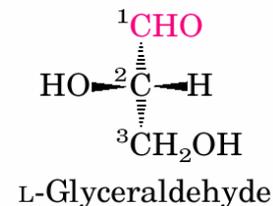
Essa propriedade define o C_α como um centro quiral e confere propriedades ópticas às moléculas.



Existem 2 isômeros ópticos do C_α : formas L e D



- são enantiômeros (imagens especulares) um do outro
- não são interconvertíveis sem quebra de laços covalentes



L- e D-isômeros de gliceraldeído (um açúcar) e do aminoácido alanina

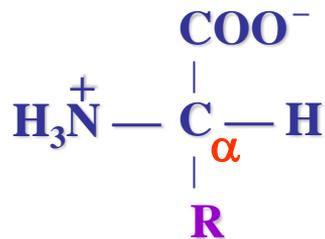
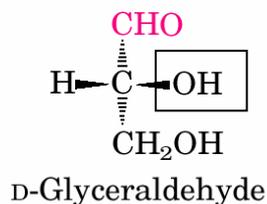
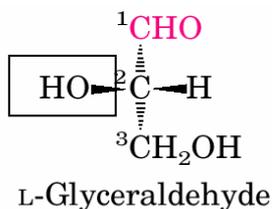
Isomeria óptica

Substâncias ópticamente ativas (possuem C quirais) interagem com a luz polarizada, girando o plano da luz para esquerda (levógiros) ou para a direita (dextrógiros)

Essa propriedade foi inicialmente descoberta para ácidos orgânicos e açúcares, com vários C quirais.

Levógiro: indicado por (-) giro da luz para esquerda

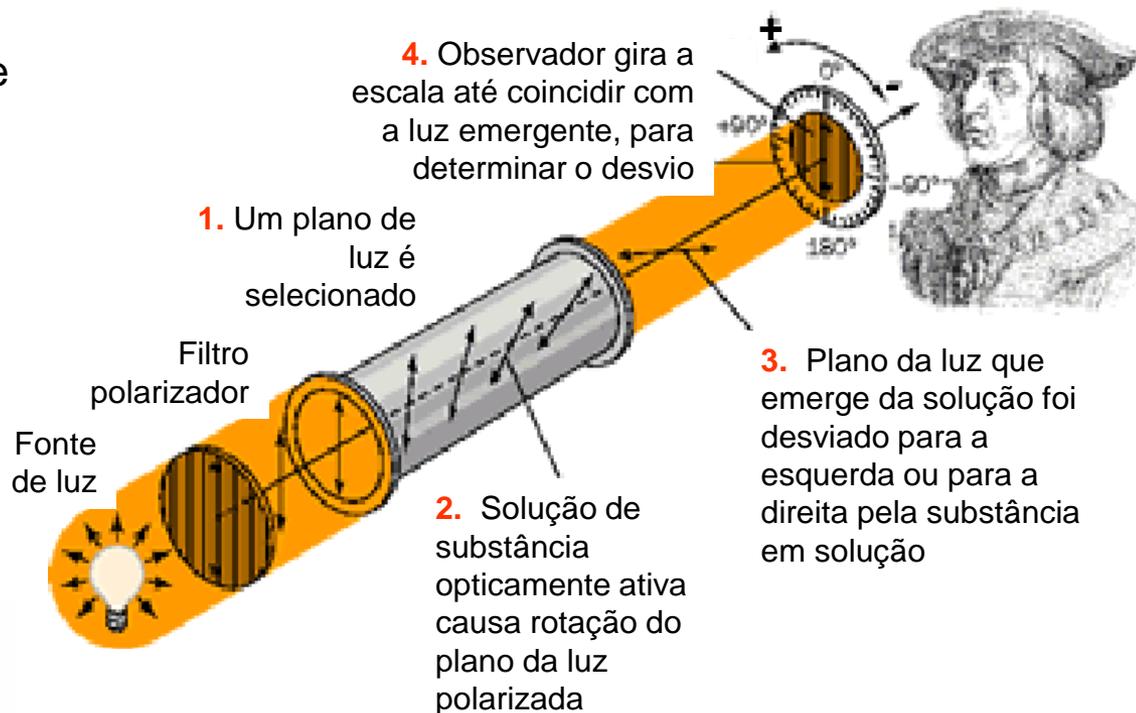
Dextrógiro: indicado por (+) giro da luz para direita



L- α -aminoácido

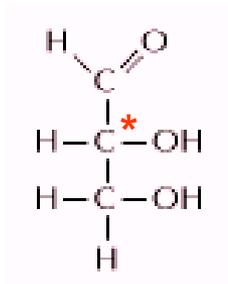
Proteínas naturais possuem somente L-aminoácidos

D-Aminoácidos ocorrem em peptídeos antibióticos



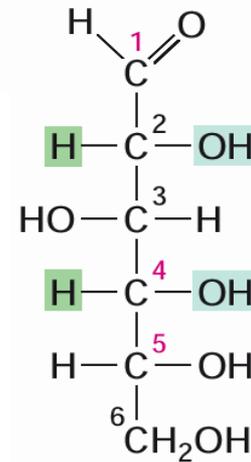
Um polarímetro

Isomeria óptica: os açúcares naturais são de série **D**



D- Gliceraldeído

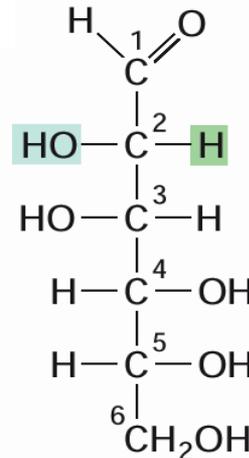
- 1 carbono quiral



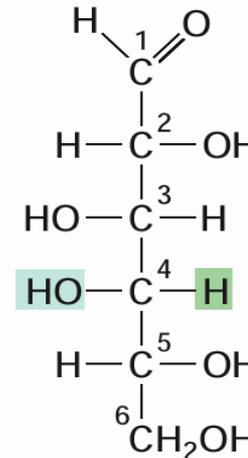
D-glicose

Glicose:

- 4 Carbonos quirais
- 16 isômeros possíveis
- Carbono 5 define a configuração D- ou L-



D-manose



D-galactose

- a manose é um isômero da glicose no C2.
- a galactose é um isômero da glicose no C4.

As letras D- e L- indicam apenas a configuração espacial de um isômero, e não a sua atividade óptica.

Existem compostos D que são levógiros (-) e compostos L que são dextrógiros (+).

Ex: D (-) frutose

L (+) arginina

São as proteínas que fazem o organismo!

TABLE 24-2 DNA, Gene, and Chromosome Content in Some Genomes

	<i>Total DNA (bp)</i>	<i>Number of chromosomes*</i>	<i>Approximate number of genes</i>
Bacterium (<i>Escherichia coli</i>)	4,639,221	1	4,405
Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	12,068,000	16 [†]	6,200
Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	97,000,000	12 [‡]	19,000
Plant (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	125,000,000	10	25,500
Fruit fly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	180,000,000	18	13,600
Plant (<i>Oryza sativa</i> ; rice)	480,000,000	24	57,000
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	2,500,000,000	40	30,000–35,000
Human (<i>Homo sapiens</i>)	3,200,000,000	46	30,000–35,000

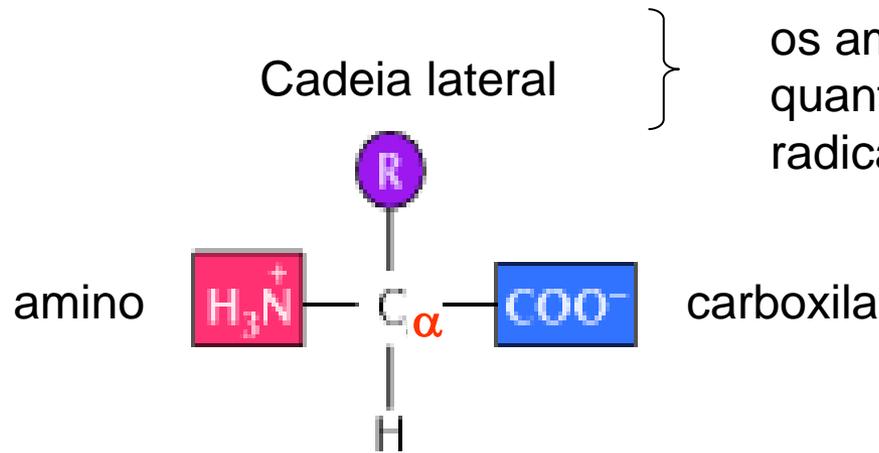
Note: This information is constantly being refined. For the most current information, consult the websites for the individual genome projects.

*The diploid chromosome number is given for all eukaryotes except yeast.

[†]Haploid chromosome number. Wild yeast strains generally have eight (octoploid) or more sets of these chromosomes.

[‡]Number for females, with two X chromosomes. Males have an X but no Y, thus 11 chromosomes in all.

Aminoácidos protéicos são determinados geneticamente: código genético



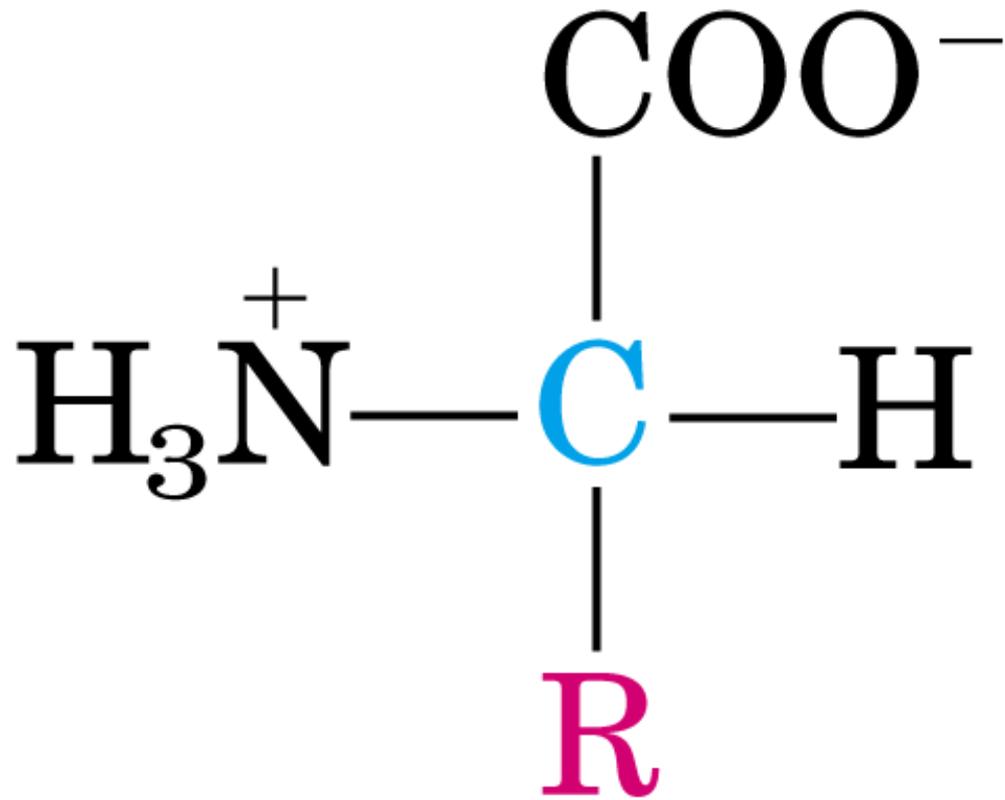
os aminoácidos se diferenciam entre si quanto ao tipo de cadeia lateral, ou grupo radical R, que apresentam.

Existem 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente em proteínas de todos os tipos de organismos, e que são determinados por códons específicos (triplets de nucleotídeos) no material genético dos seres vivos.

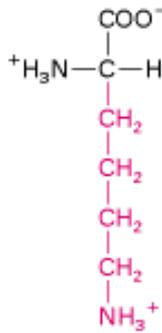
Os aminoácidos protéicos são **classificados** de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais

	U	C	A	G
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

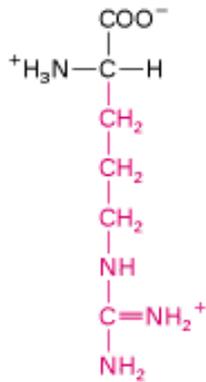
Proteínas são sintetizadas a partir de apenas 20 L- α -aminoácidos diferentes



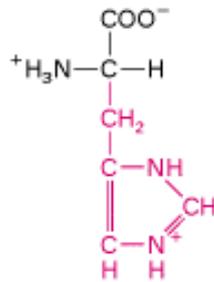
Aminoácidos básicos



Lysine
(Lys or K)

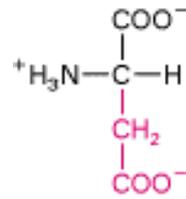


Arginine
(Arg or R)

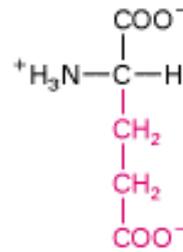


Histidine
(His or H)

Aminoácidos ácidos

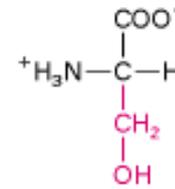


Aspartic acid
(Asp or D)

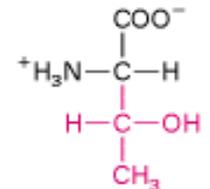


Ácido Glutâmico
(Glu - E)

Aminoácidos polares neutros

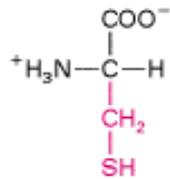


Serina
(Ser - S)

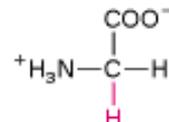


Treonina
(Thr - T)

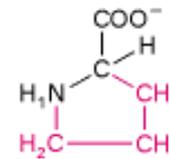
Aminoácidos "especiais"



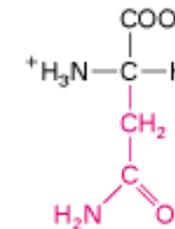
Cysteine
(Cys or C)



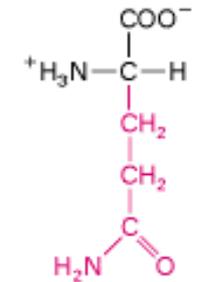
Glycine
(Gly or G)



Proline
(Pro or P)



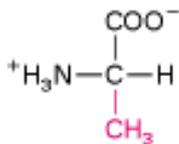
Asparagina
(Asn - N)



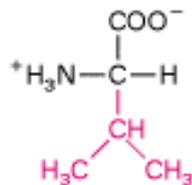
Glutamine
(Gln or Q)

Os 20 aminoácidos proteicos

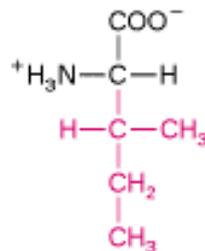
Aminoácidos hidrofóbicos - apolares



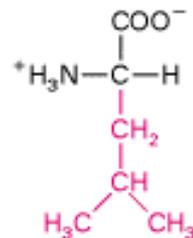
Alanine
(Ala or A)



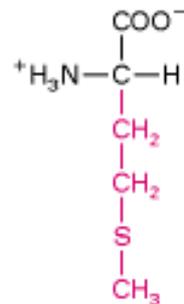
Valine
(Val or V)



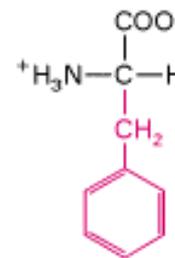
Isoleucine
(Ile or I)



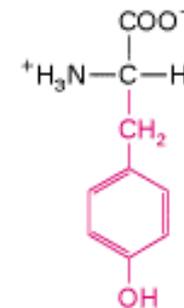
Leucine
(Leu or L)



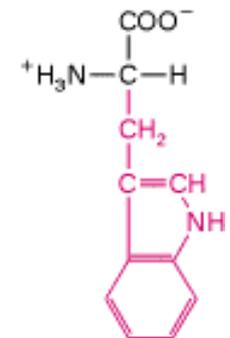
Methionine
(Met or M)



Phenylalanine
(Phe or F)



Tyrosine
(Tyr or Y)



Tryptophan
(Trp or W)

Estudando o slide anterior, **identifique** o critério para classificação de:

- Histidina, como um aminoácido básico
- Valina, como um aminoácido hidrofóbico
- Ácido glutâmico, como um aminoácido ácido

Os aminoácidos “**especiais**” possuem características intermediárias entre os grupos dos aminoácidos polares e apolares.

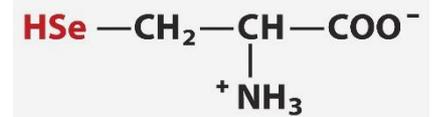
Além disso:

- a **cisteína** é o único aminoácido cuja cadeia lateral é capaz de fazer ligações covalentes e com isso pode contribuir para a estrutura da proteína.
- a **prolina** não é um aminoácido típico, e sim um iminoácido, uma vez que seu $C\alpha$ e seu $N\alpha$ fazem parte de um anel heterocíclico da molécula.

OBS: A classificação dos aminoácidos pode diferir, conforme o autor. O importante em cada caso é entender os critérios para a classificação.

Além dos 20, existem mais 2 aminoácidos protéicos que são determinados geneticamente:

- pirrol-lisina (somente em *Archaea*)
- selenocisteína (presente em animais, algumas bactérias; mas ausente em plantas e *Archaea*)



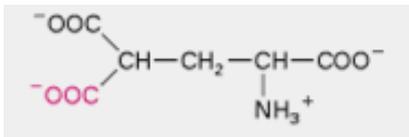
Selenocysteine

Outros aminoácidos, além dos 20 codificados geneticamente, podem ocorrer em proteínas e peptídeos biologicamente ativos, ou como aminoácidos ou derivados livres.

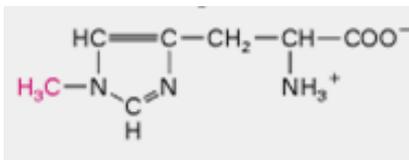
Esses aminoácidos são produzidos enzimaticamente, por modificação pós-tradução de um dos 20 aminoácidos clássicos. Exemplos:

Em muitas proteínas:

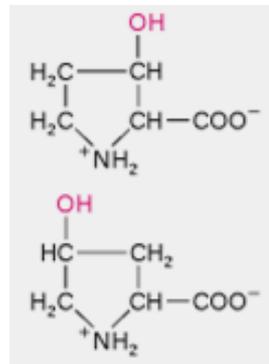
- aminoácidos glicosilados (Ser, Thr, Asn, Gln)
- aminoácidos fosforilados (Ser, Tyr)



- Ac. γ -carboxi-glutâmico (protrombina e fatores da coagulação)



- 3-metil-histidina (actina)



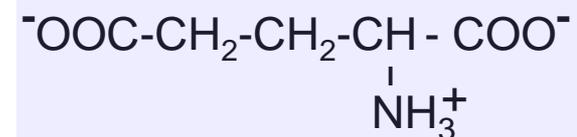
- 3-hidroxi-prolina
- 4 hidroxi-prolina (colágeno)

Neurotransmissores:

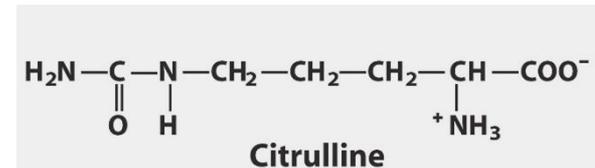
- GABA (Ác. γ -aminobutírico)



- Glutamato

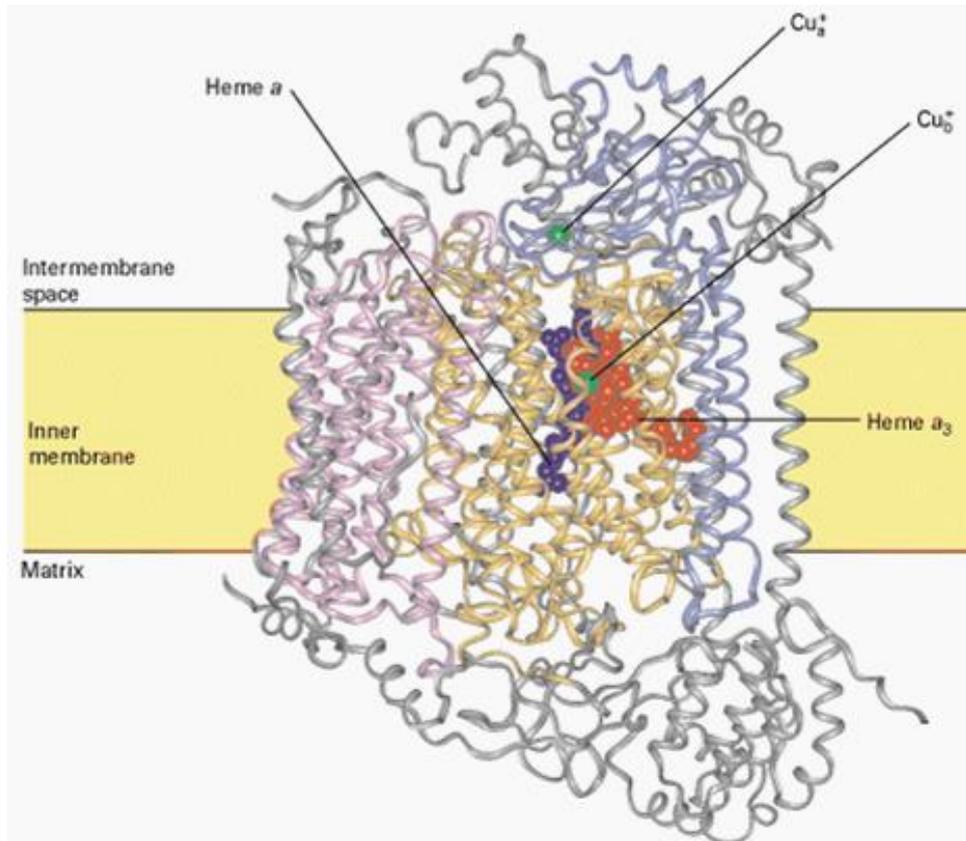


Intermediário do ciclo da uréia



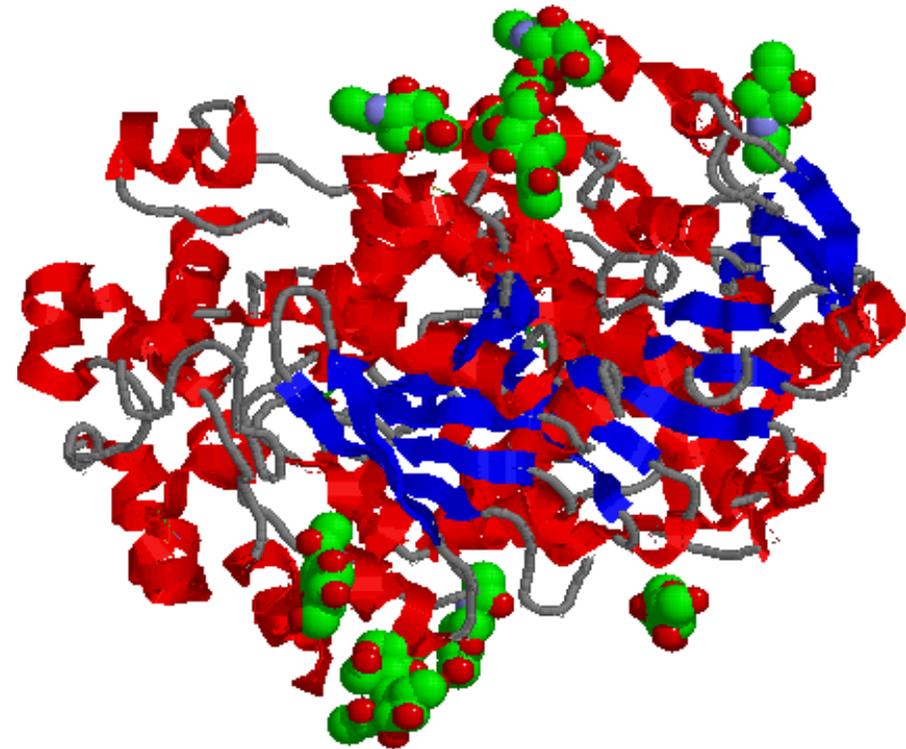
Proteínas são moléculas tridimensionais.

A forma da molécula é determinante de sua função.



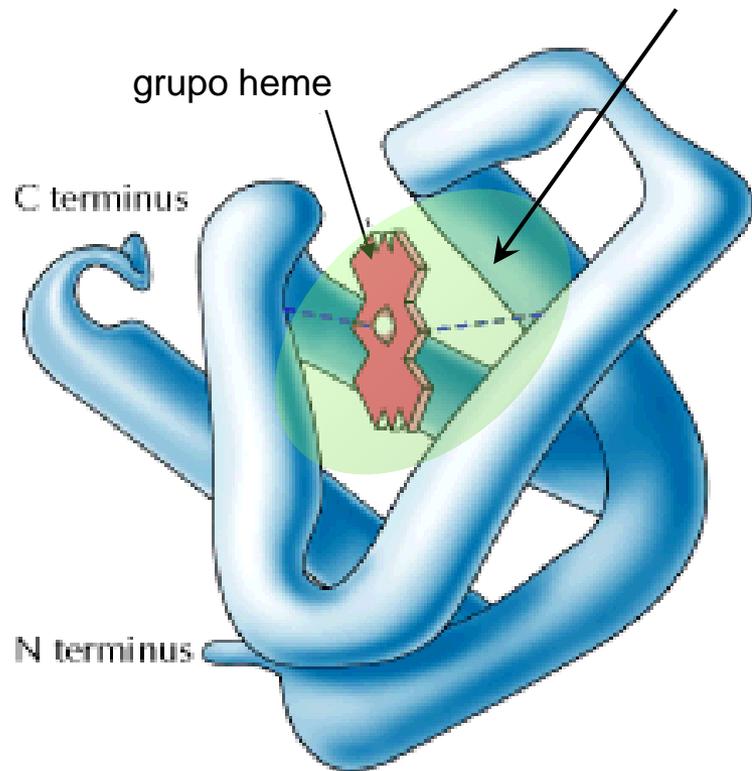
A **Citocromo C oxidase** é uma proteína integral da membrana interna de mitocôndrias

A **Lipase gástrica** é uma proteína solúvel em meio aquoso.



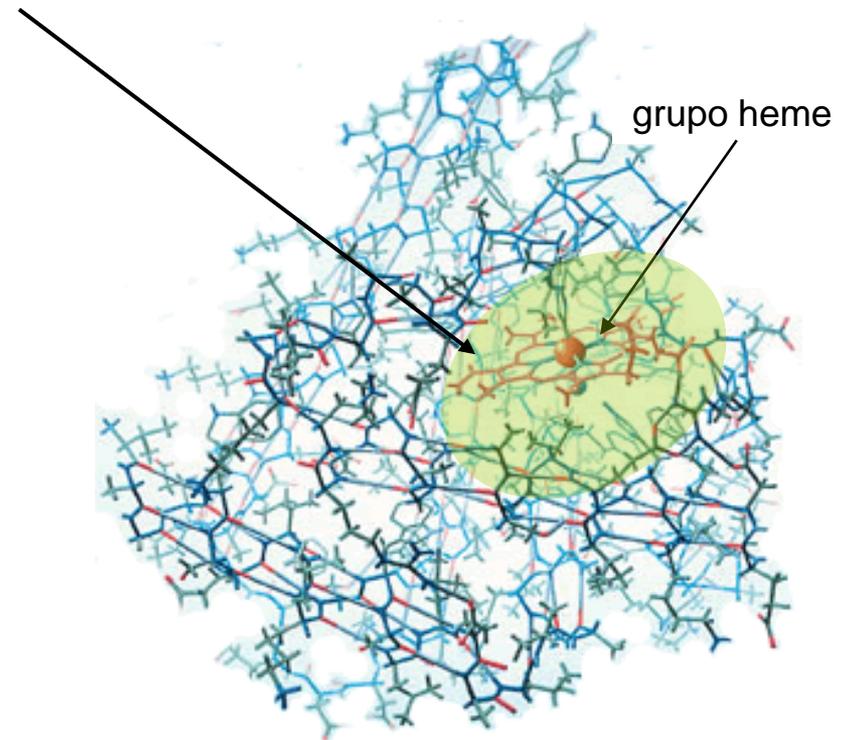
Para entender a relação estrutura X função de uma proteína, como exemplo veremos a mioglobina, proteína armazenadora de O₂ nos músculos dos mamíferos.

A mioglobina da baleia cachalote é uma proteína de forma globular, de 153 aminoácidos, contendo um grupo prostético **heme**. A proteína é bastante solúvel em meio aquoso. O interior da molécula é forrado com cadeias laterais de aminoácidos apolares, formando um **ambiente hidrofóbico**.



Mioglobina da baleia cachalote

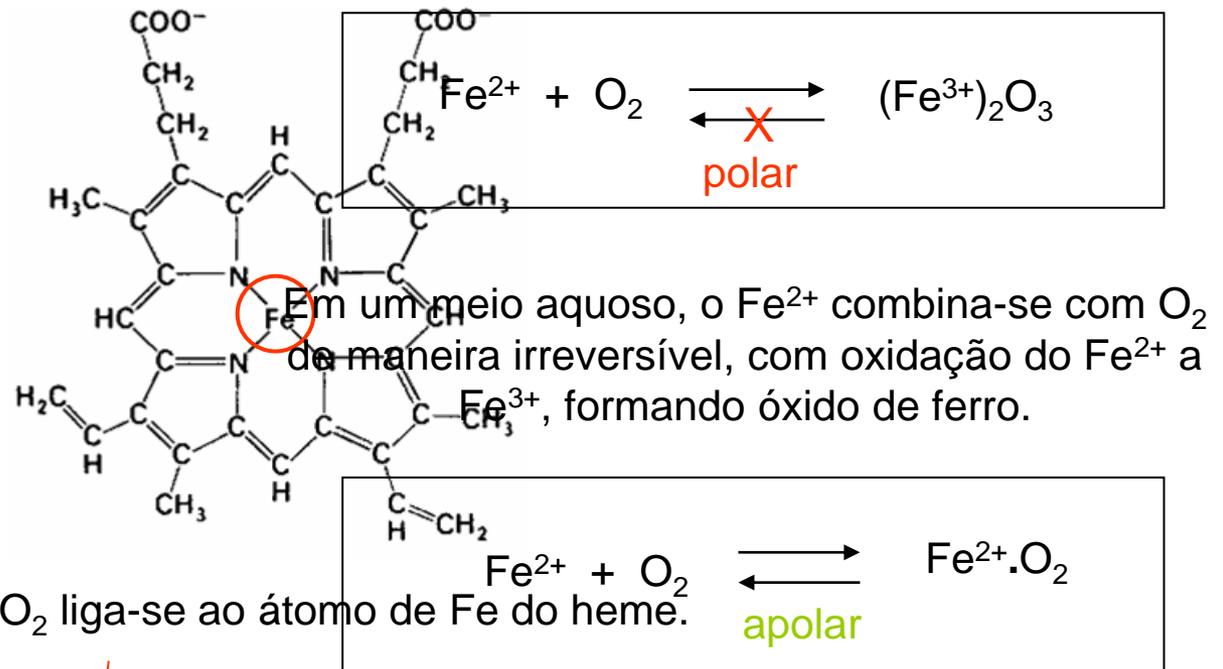
Modelo simplificado
(somente o “esqueleto” -N-C-C- da proteína)



Modelo com cadeias laterais dos aminoácidos

A forma globular da mioglobina, formando um bolsão hidrofóbico em torno do heme, é fundamental para o desempenho da função de armazenamento de O₂.

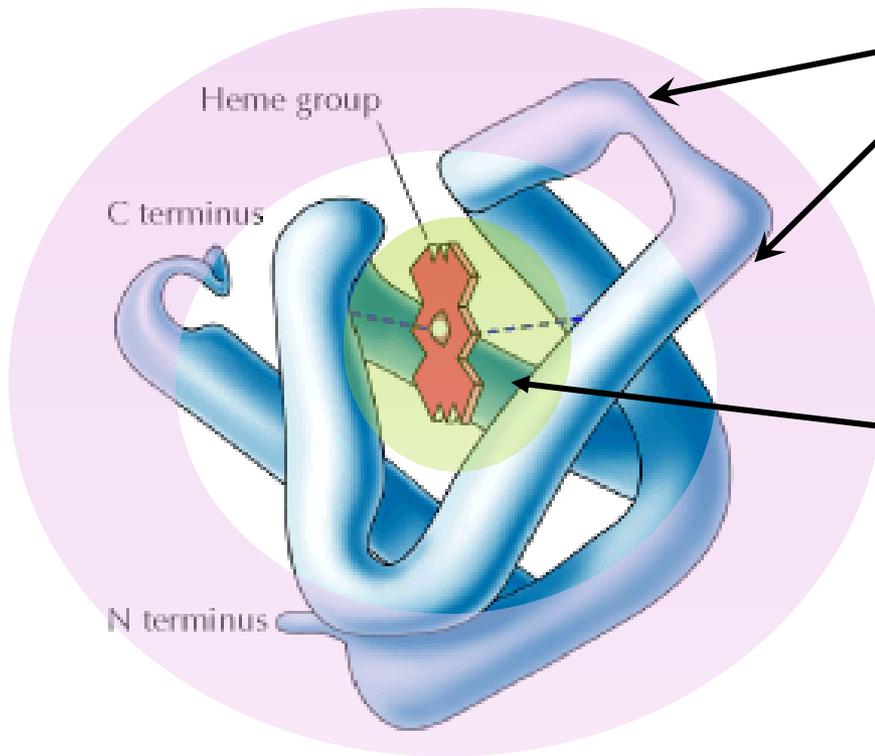
Heme



Mutações nas globinas que levam a trocas de aminoácidos no bolsão do heme por outros mais polares podem ser **letais**, pois afetam a interação da proteína com o O₂.

No meio **apolar** proporcionado pela mioglobina, a ligação do Fe²⁺ ao O₂ é **reversível** e não envolve oxidação do Fe.

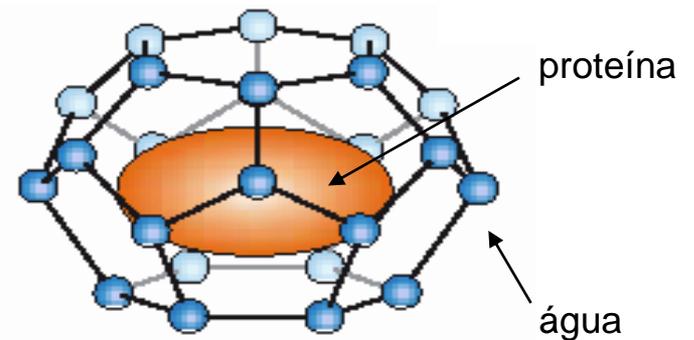
Por que a mioglobina é solúvel em água ?



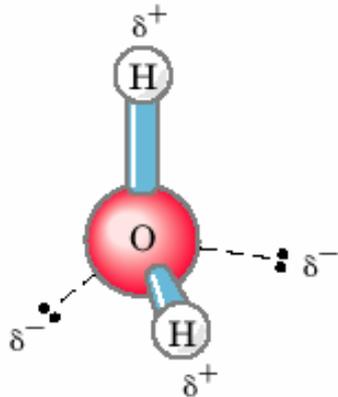
Mioglobina da baleia cachalote

As cadeias laterais de aminoácidos **polares**, carregados ou não, voltam-se para o meio aquoso e fazem contacto (pontes de H) com as moléculas de água do meio.

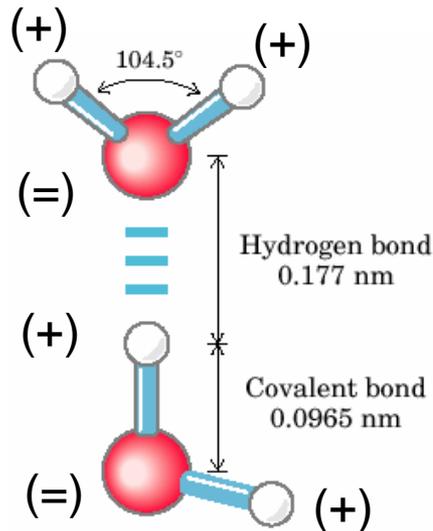
Aminoácidos apolares voltados para o interior da molécula.



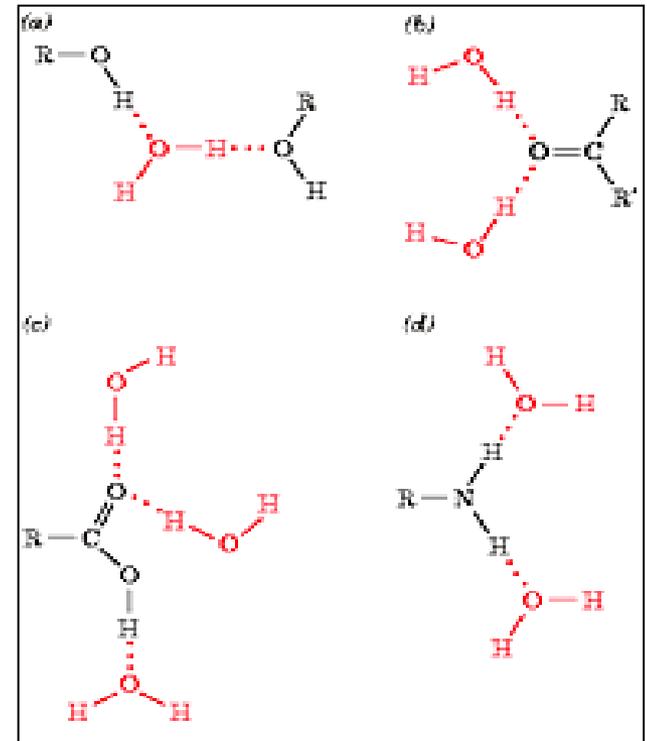
As cadeias laterais de aminoácidos polares podem fazer pontes de H entre si e com moléculas de água do meio, solubilizando proteínas.



A água é um dipolo permanente, devido à diferença de eletronegatividade de seus átomos.

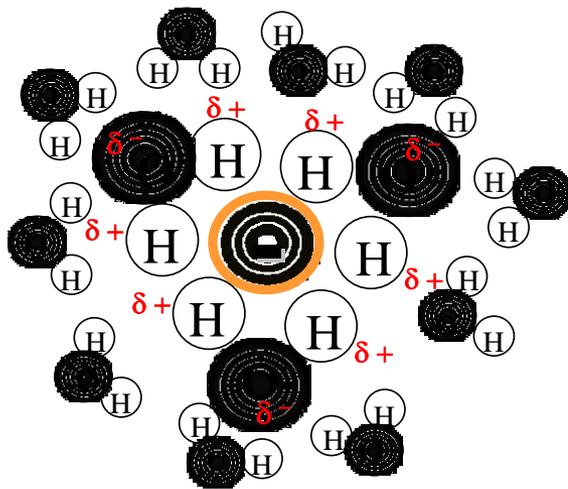


Ponte de H formada entre duas moléculas de água

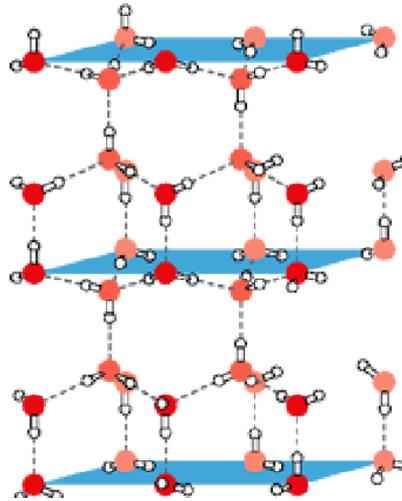


Tipos possíveis de pontes de H entre aminoácidos e a água

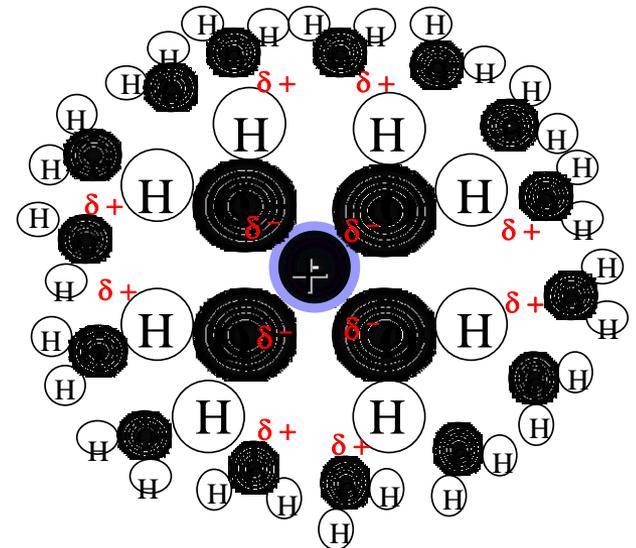
Proteínas organizam moléculas de água em torno de si, formando uma camada de solvatação, que garante a solubilidade em meio aquoso.



Camada de solvatação de um composto aniônico

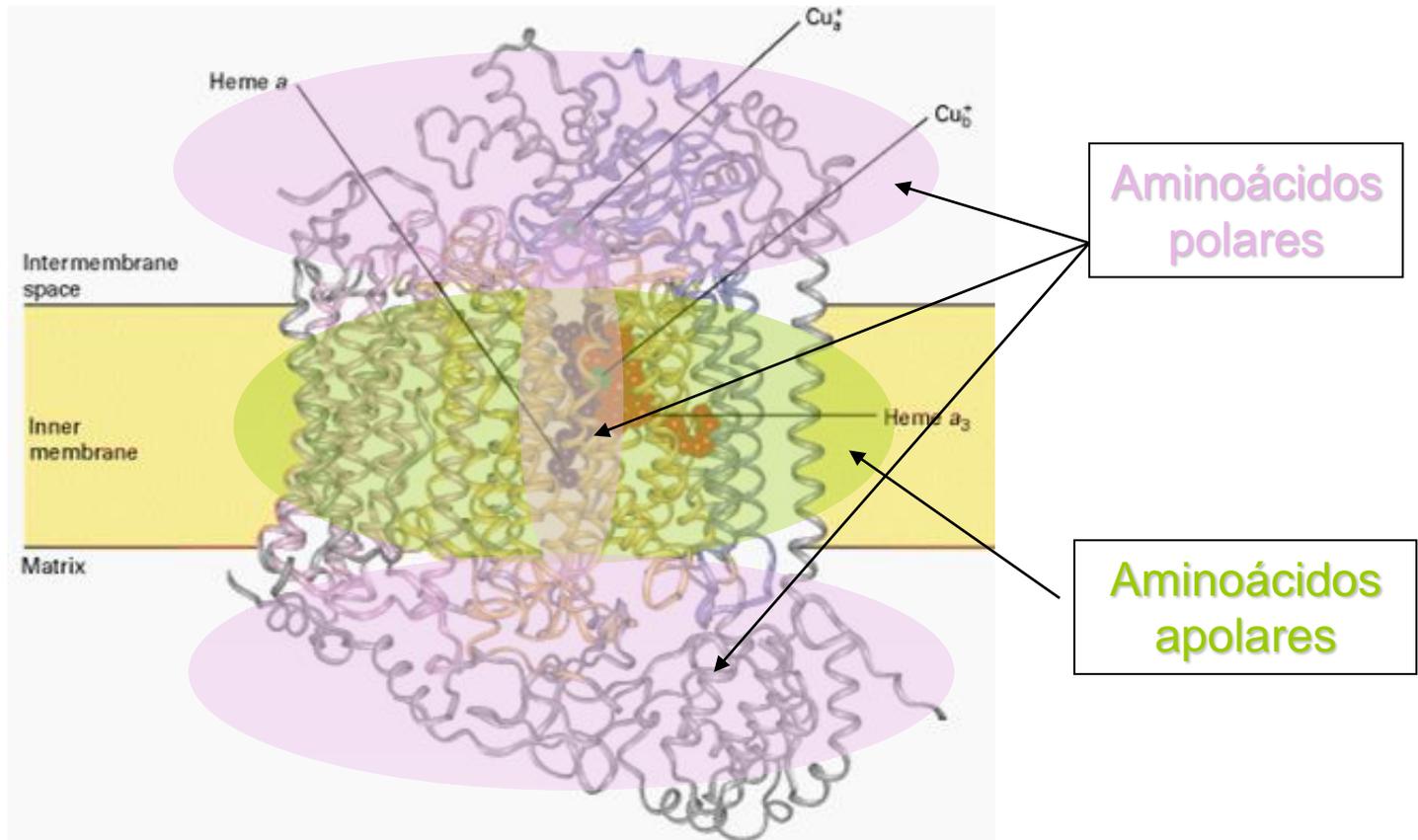


Moléculas de água interagindo no gelo. Na água líquida, a rede de interações é menos organizada.



Camada de solvatação de um composto catiônico

Corte transversal da membrana interna da mitocôndria



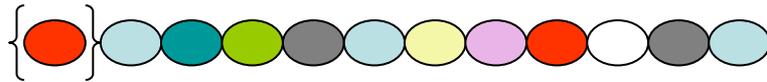
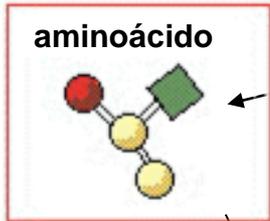
A Citocromo C oxidase é uma proteína de membrana.

Proteínas de membrana possuem uma região de aminoácidos hidrofóbicos **apolares**, cujas cadeias laterais projetam-se para “fora” e interagem com a porção lipídica de membrana celulares. Outras regiões dessas proteínas ricas em aminoácidos hidrofílicos **polares** projetam-se para os meios aquosos extra- ou intracelular, e podem formar “canais” hidrofílicos que atravessam a membrana, interconectando os meios separados por ela.

Perguntas cruciais :

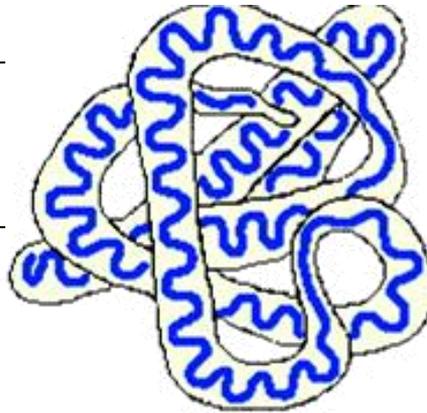
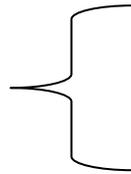
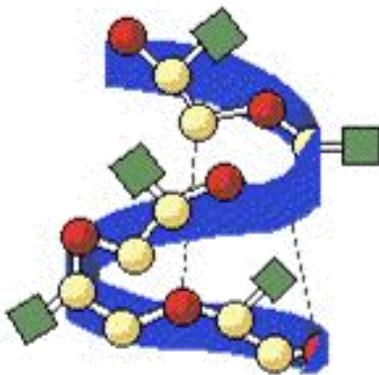
Como as proteínas assumem uma forma tridimensional a partir de suas estruturas lineares ?

Que tipo de forças físicas mantêm a estrutura tridimensional das proteínas ?

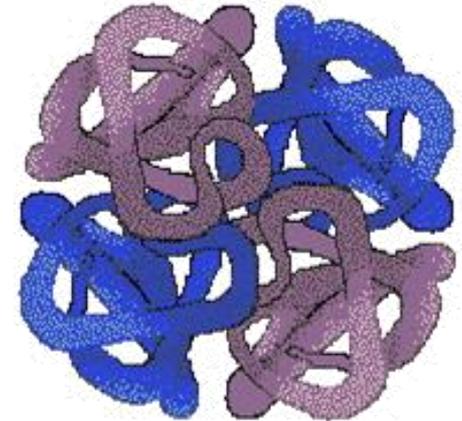


Estrutura primária: é a sequência dos aminoácidos na cadeia polipeptídica; mantida por ligações peptídicas

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



x 4



Estrutura secundária:

- Enovelamento de partes da cadeia polipeptídica
- Formada somente pelos átomos da ligação peptídica, através de pontes de H.
- Ex: alfa-hélices e folhas beta.

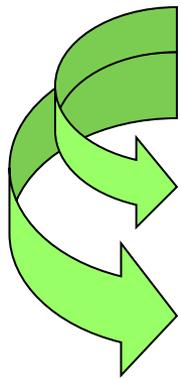
Estrutura terciária:

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

Estrutura quaternária:

- Associação de mais de uma cadeia polipeptídica
- No modelo, um tetrâmero composto de 4 cadeias polipeptídicas

As características físico-químicas



- da ligação peptídica
- das cadeias laterais dos aminoácidos

determinam como o esqueleto covalente de uma proteína vai se enovelar

determinam os tipos de forças, covalentes e não covalentes, que irão estabilizar a estrutura tridimensional de uma proteína.

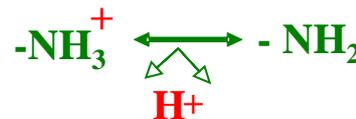
Os aminoácidos apresentam várias funções químicas que podem se ionizar e conferir carga elétrica à molécula.

Exemplo:

Função carboxila



Função amina



- Todos os aminoácidos possuem um grupo carboxila
- Ácido aspártico e ácido glutâmico possuem 2 grupos carboxila

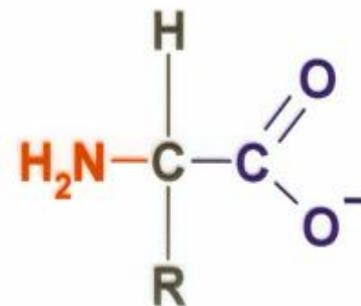
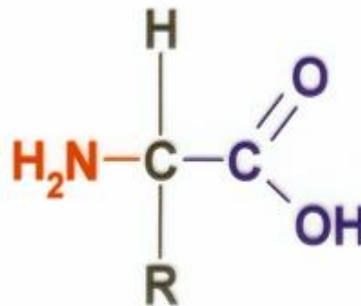
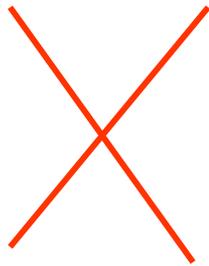
- Todos os aminoácidos possuem um grupo amina
- Lisina possui 2 grupos amina

estado de ionização depende do pH do meio

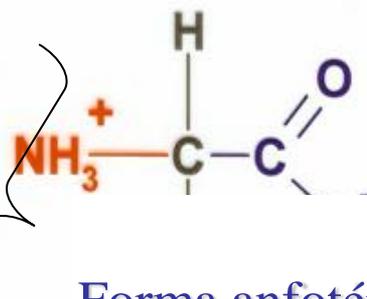
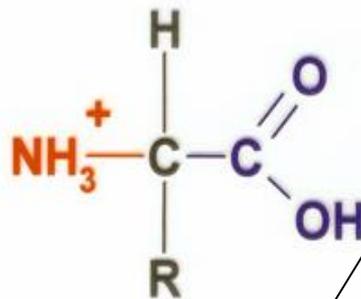
Comportamento ácido-básico de aminoácidos: ionização

Abaixo estão 4 formas de um aminoácido variando o estado de ionização do grupo amino e do grupo carboxila.

Qual dessas formas de um aminoácido não pode existir? Porque?

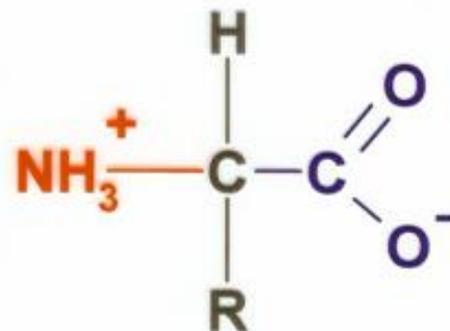
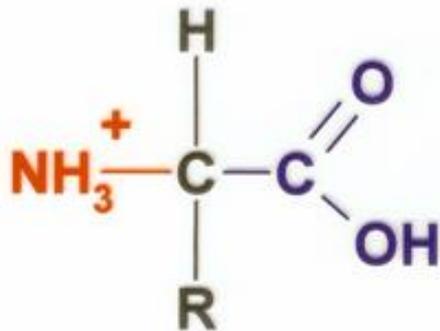
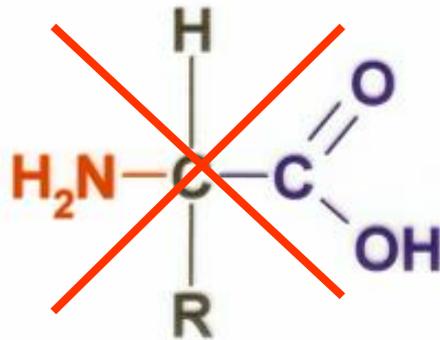


Meio alcalino
carga (-)



Forma anfotérica (sem carga)
presente em pH fisiológico

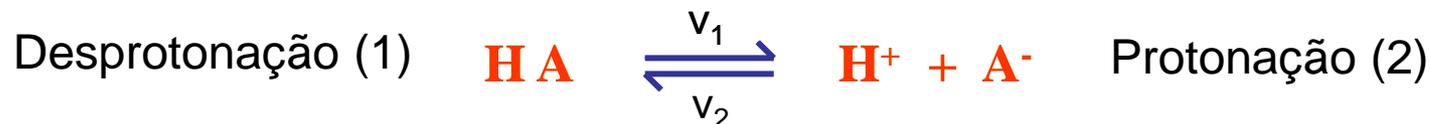
Meio ácido
carga (+)



Para entender por que a forma assinalada não pode existir, vamos relembrar os conceitos de pK e constante de dissociação de um ácido.

DISSOCIAÇÃO DE UM ÁCIDO

Considere a equação geral de dissociação de um ácido HA dada abaixo:



Quando a velocidade da reação 1 iguala-se a da reação 2, atingiu-se o ponto de equilíbrio. Pode-se dizer que a reação “terminou”, pois não há mais modificação das quantidades dos reagentes ou produtos de ambas as reações.

A **Lei de Ação da Massas** permite calcular a constante de equilíbrio da reação de dissociação do ácido, ou constante de dissociação, como se segue:

$$K_{eq} = K_d = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{A}^-]}{\text{HA}} \quad (\text{quando } v_1 \text{ é igual a } v_2)$$

O pK é igual ao logaritmo negativo da Kd

Observe os valores de pKs da tabela abaixo.

α -Amino Ácido	pK ₁ α -COOH	pK ₂ α -NH ₃ ⁺	pK _R Cadeia Lateral (R)
Alanina	2.35	9.87	
Arginina	1.82	8.99	12.48 (guanidino)
Asparagina	2.1	8.84	
Ácido Aspártico	1.99	9.90	3.90 (β -COOH)
Cisteína	1.92	10.78	8.33 (sulfidril)
Ácido Glutâmico	2.10	9.47	4.07 (γ -COOH)
Glutamina	2.17	9.13	
Glicina	2.35	9.78	
Histidina	1.80	9.33	6.04 (imidazol)
Isoleucina	2.32	9.76	
Leucina	2.33	9.74	
Lisina	2.16	9.18	10.79 (ϵ -NH ₃ ⁺)
Metionina	2.13	9.28	
Fenilalanina	2.16	9.18	
Prolina	2.95	10.65	
Serina	2.19	9.21	
Treonina	2.09	9.10	
Triptofano	2.43	9.44	
Tirosina	2.20	9.11	10.13 (fenol)
Valina	2.29	9.74	

pK dos α -NH₃⁺
valor médio ~ 9.0

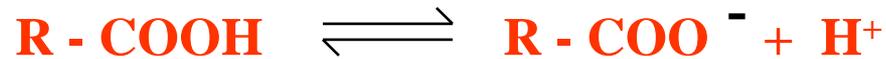
pK dos α -COOH
valor médio ~ 2.0

O que significa a
diferença de 7 unidades
log desses pKs ?

Alguns aminoácidos
apresentam grupos
ionizáveis em suas
cadeias laterais

Valores pK dos grupos ionizáveis dos α -aminoácidos a 25^o C

Para o grupo **carboxila**, a forma ácida sem carga se dissocia no íon carboxilato:



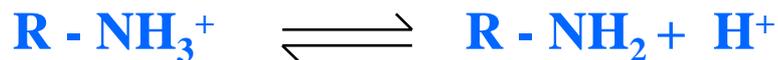
Considerando-se o pK médio de 2,0, no equilíbrio dessa reação, teremos:

$$\text{Keq} = \frac{[\text{R} - \text{COO}^-][\text{H}^+]}{\text{R} - \text{COOH}} \sim 10^{-2} = \frac{1}{100}$$

$\text{pK} = -\log \text{Keq} \rightarrow -\log(10^{-2}) = 2.0$

} 1 íon carboxilato (-) para cada 100 carboxilas neutras

Para o grupo **amino**, a forma ácida catiônica se dissocia na forma neutra:



Considerando-se o pK médio de 9,0, no equilíbrio dessa reação, teremos:

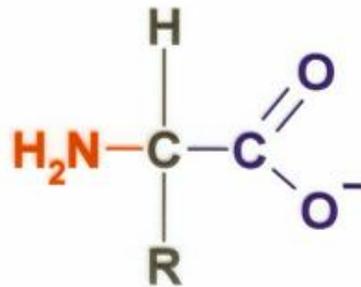
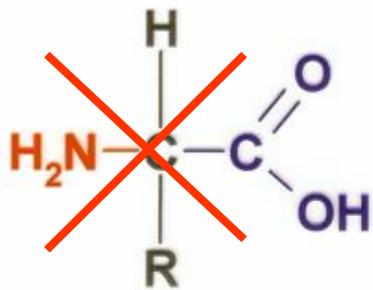
$$\text{Keq} = \frac{[\text{R} - \text{NH}_2][\text{H}^+]}{\text{R} - \text{NH}_3} \sim 10^{-9} = \frac{1}{1.000.000.000}$$

$\text{pK} = -\log \text{Keq} \rightarrow -\log(10^{-9}) = 9.0$

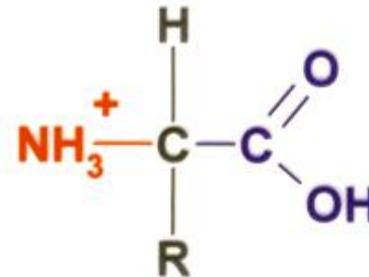
} 1 grupo amino sem carga para cada 100 trilhões com carga (+)

Portanto, a diferença de 7 unidades logarítmicas entre os pKs dos grupos α -amino e α -carboxila reflete a diferença de afinidade que as funções químicas em questão apresentam pelo próton H^+ .

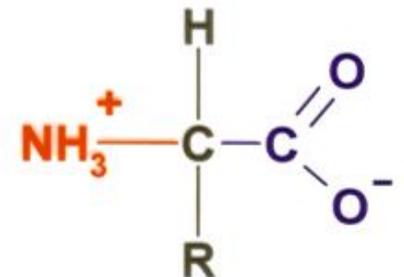
A afinidade por prótons do grupo amino ($pK \sim 9$) é 10^7 vezes maior do que a do grupo carboxila ($pK \sim 2$).



forma básica



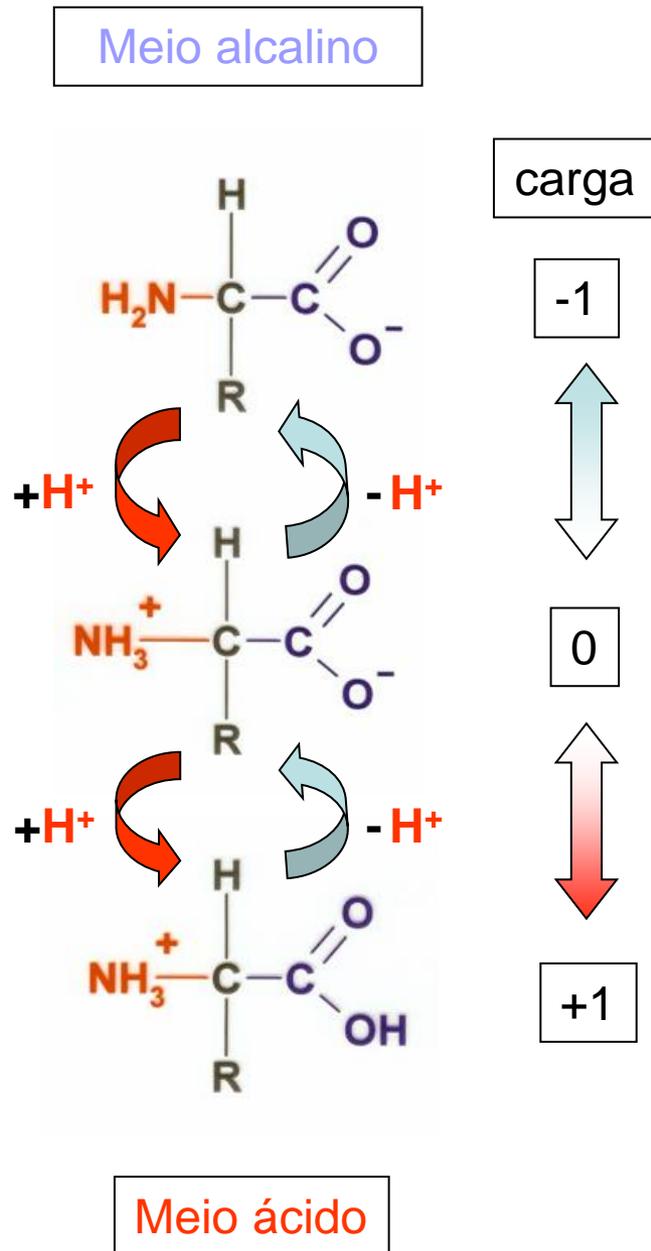
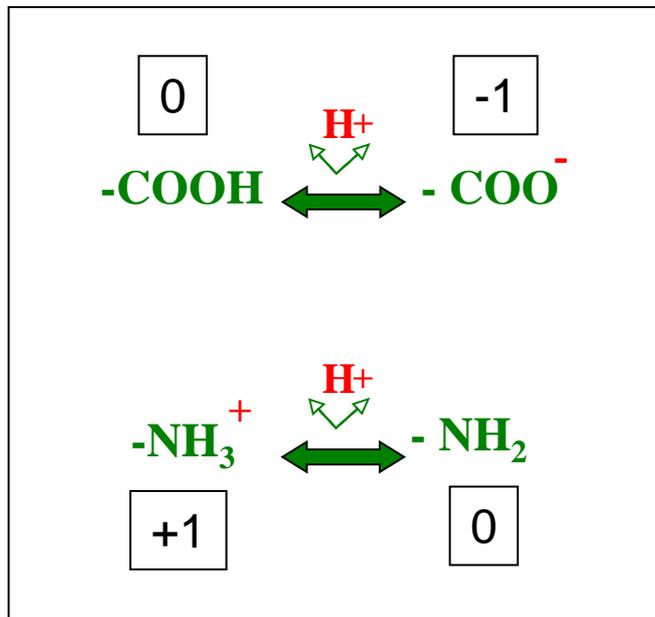
forma ácida



forma neutra

Observe nas formas possíveis do aminoácido, que o grupo NH_3^+ **só se dissocia** se o grupo $-COOH$ **já estiver completamente dissociado** em $-COO^-$.

As formas iônicas de um aminoácido se interconvertem, variando a carga da molécula na dependência do pH do meio e do pK de cada grupo:



Aminoácidos, peptídeos e proteínas são bons **tampões**

Um **tampão** é definido como um composto ou conjunto de compostos que impedem variações da concentração de $[H^+]$, ou seja do pH, do meio.

Para ter essa propriedade, os compostos devem ter **grupos ionizáveis** capazes de doar e de receber prótons H^+

A faixa de pH em que um composto apresenta poder tamponante depende do pK de seus grupos ionizáveis. A **Lei de Henderson-Hasselbach** estabelece a correlação entre o pH do meio e o pK do tampão.

$$pH = pK + \log \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]}$$

Quando $[H^+] \cdot [A^-] = [HA]$

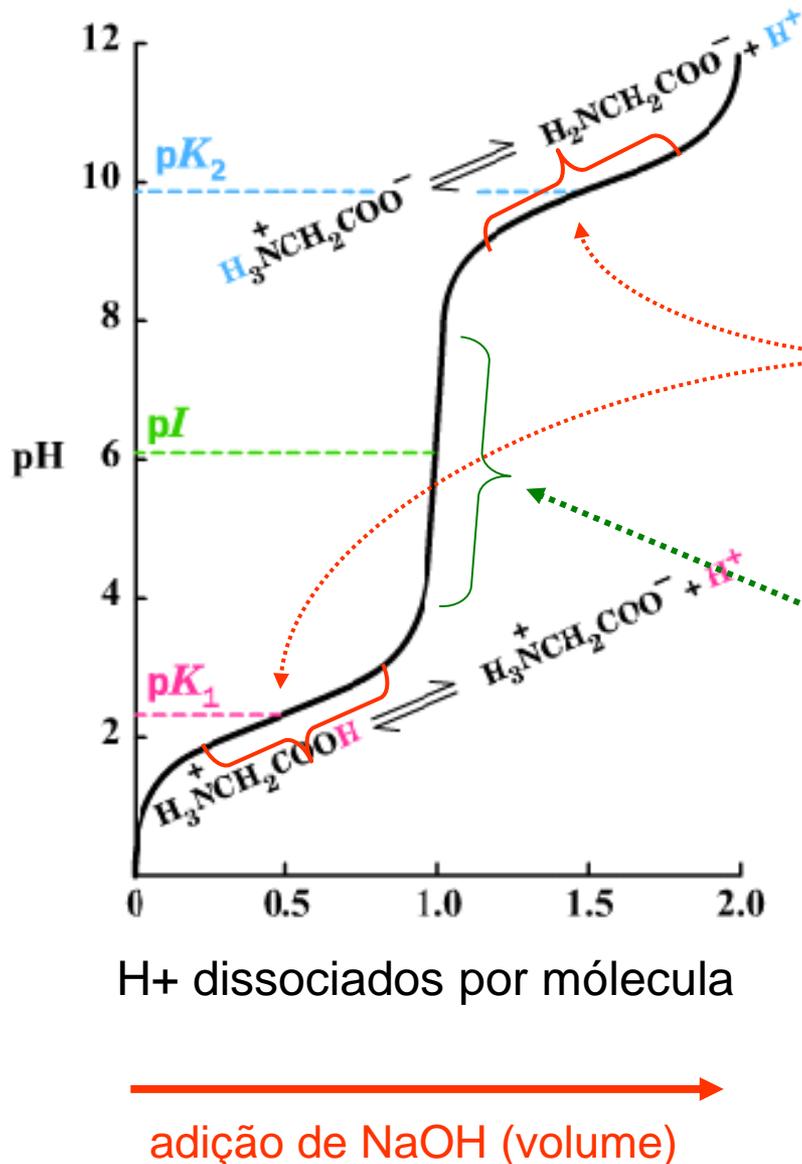
Temos que $\frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} = 1$, **substituindo na equação:** $pH = pK + \underbrace{\log 1}_{\text{zero}} \longrightarrow pH = pK$

Traduzindo:

- quando o **pH** do meio é **igual** ao **pK** do grupo ionizável, este está **50%** dissociado
- o poder tamponante é máximo no **pK** pois há igual proporção das formas doadora e acceptora de prótons:



Poder tamponante e curva de titulação da glicina

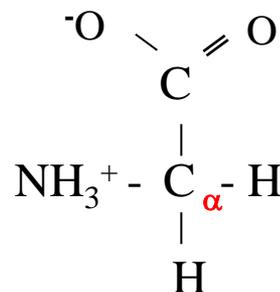


A curva mostra a variação do pH de uma solução do aminoácido glicina quando se adiciona uma base, por exemplo, NaOH.

A glicina vai se dissociando, e libera H^+ para o meio.

O poder tamponante da glicina pode ser observado em dois pontos da curva, em que o aumento de pH é mais lento.

Observe que o pH da solução na metade desses trechos da curva coincide com os valores de pK dos grupos ionizáveis da glicina. O efeito tampão nesses pHs ocorre por que há duas formas de glicina presentes na solução, uma dissociada (50%) e outra não, como mostra a figura.



Glicina

(forma anfotérica – carga zero)

$$\text{pK } \alpha\text{-COOH} = 2.34$$

$$\text{pK } \alpha\text{-NH}_3^+ = 9.60$$

Como o estado de ionização e a carga elétrica da glicina variam em função do pH do meio ?

Para a glicina os valores de pK são:

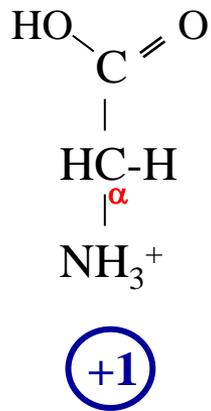
$$\text{pK } \alpha - \text{NH}_3^+ = 9.60$$

$$\text{pK } \alpha - \text{COOH} = 2.34$$

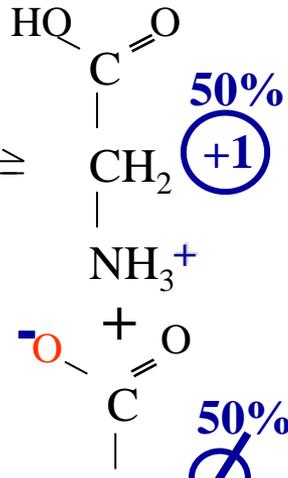
Cálculo do ponto isoelétrico

$$\text{pI} = \frac{2.34 + 9.6}{2} = 5.97$$

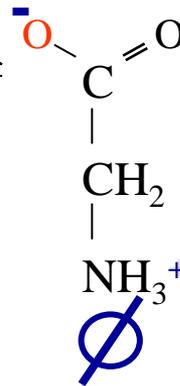
pH 0 - 2



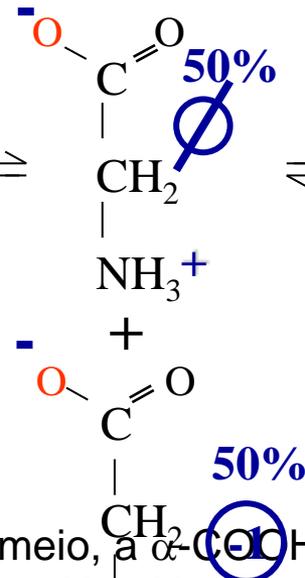
pH 2,34



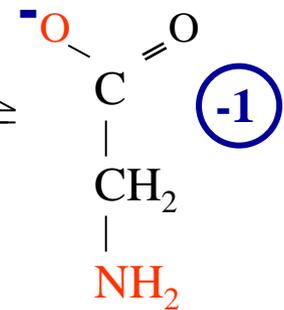
pH 3.0 - pH 9.0



pH 9.6



pH 10 - 14

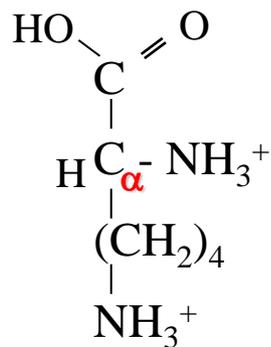


Em pH < 2,34, todos os grupos ionizáveis da glicina estão protonados. A molécula apresenta carga +1.

Diminuindo a [H+] do meio, a α -COOH começa a desprotonar. No pH 2,34, metade das -COOH desprotonaram, gerando a glicina com carga zero.

Em pH > 10 predomina a forma de glicina com carga -1.

Como o pH do meio afeta a carga de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis ?



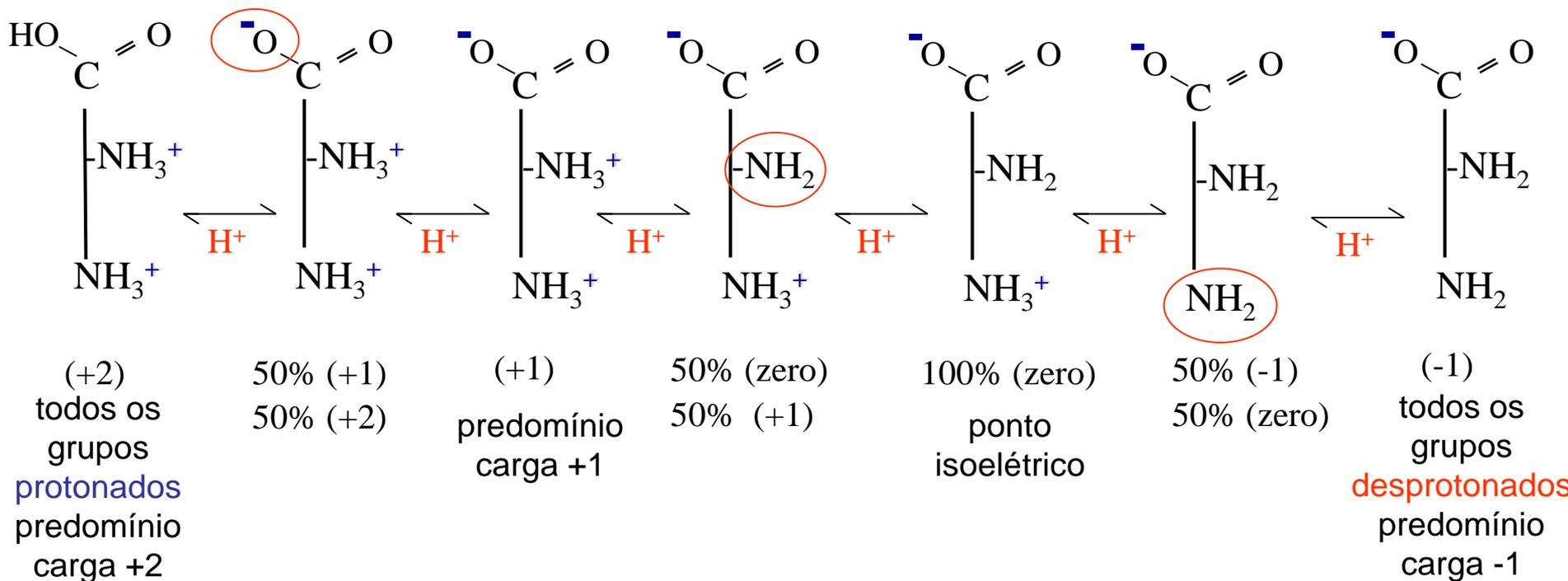
Como exemplo, veremos a ionização da **Lisina**:

$\text{pK } \alpha\text{-COOH} = 2.18$
$\text{pK } \alpha\text{-NH}_3^+ = 8.95$
$\text{pK } \text{R-NH}_3^+ = 10.53$

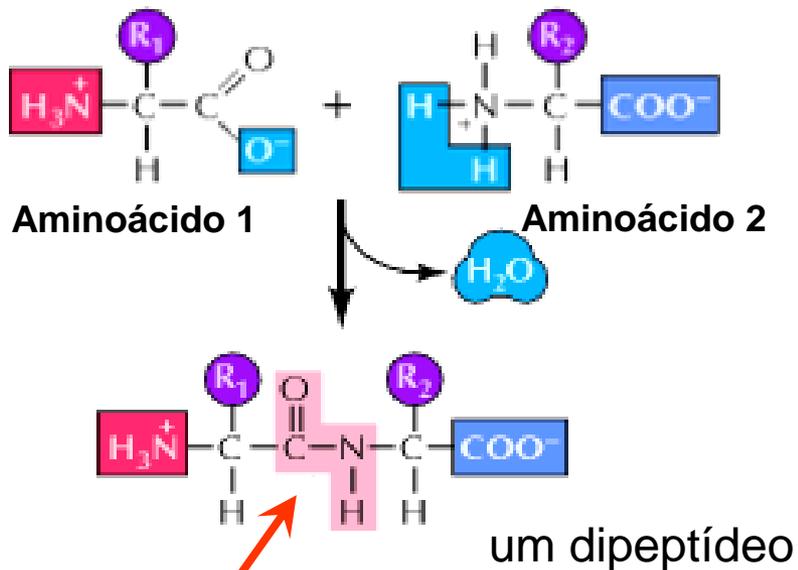
$$\text{pI} = \frac{8.85 + 10.53}{2} = 9.69$$

(ponto isoelétrico)

$\text{pH} < 2$ $\text{pH } 2.18$ $\text{pH } 3 - 8$ $\text{pH } 8.95$ $\text{pH } 9.69$ $\text{pH } 10.53$ $\text{pH} > 11$
 $\text{pK } \alpha\text{-COOH}$ $\text{pK } \alpha\text{-NH}_3^+$ $\text{pK } \text{R-NH}_3^+$

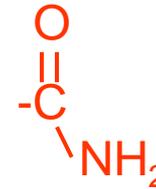


O laço covalente que liga os aminoácidos no esqueleto covalente de uma proteína é a ligação peptídica.

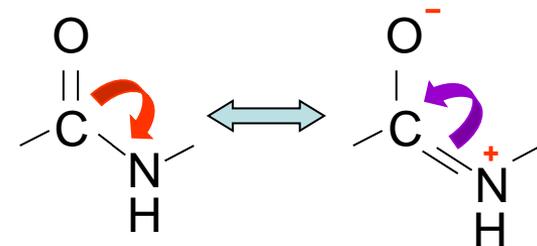


A **ligação peptídica** ocorre entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino de outro aminoácido.

A ligação peptídica é uma amida.

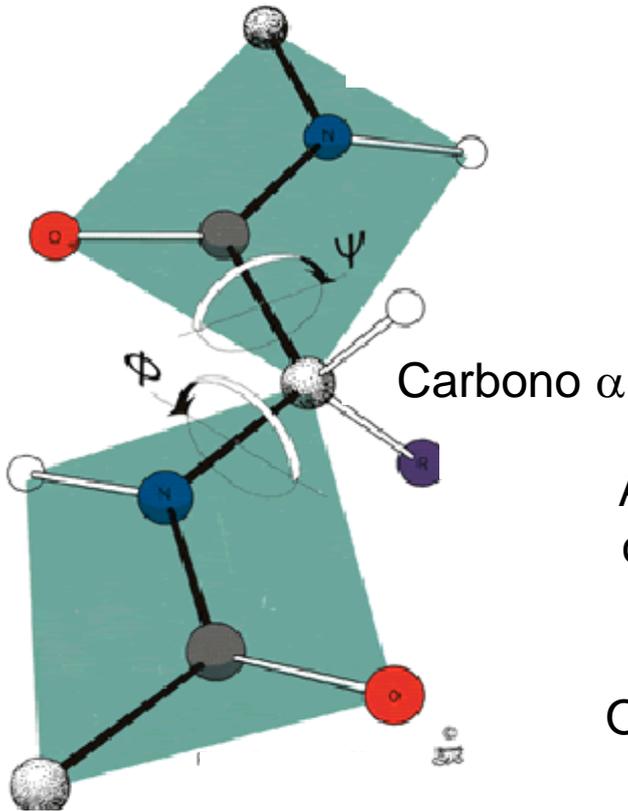


As distâncias interatômicas na ligação peptídica são menores que as de uma ligação amida comum.



Esse fato evidencia **ressonância eletrônica**, com uma nuvem de elétrons oscilando entre o **C** e o **N**. Isso atribui à ligação simples C – N um caráter parcial (50%) de dupla ligação

Como resultado da ressonância da ligação peptídica, ela é mais **rígida** que uma ligação simples, colocando todos os átomos participantes no **mesmo plano espacial**.



Assim, o esqueleto covalente de uma proteína, representado pela seqüência linear dos átomos (-N-C-C_α-)_n, apresenta **restrições de mobilidade** que são importantes determinantes do enovelamento da molécula.

A figura mostra duas ligações peptídicas -CO-N-, com os átomos alinhados no plano determinado pela ressonância da ligação.

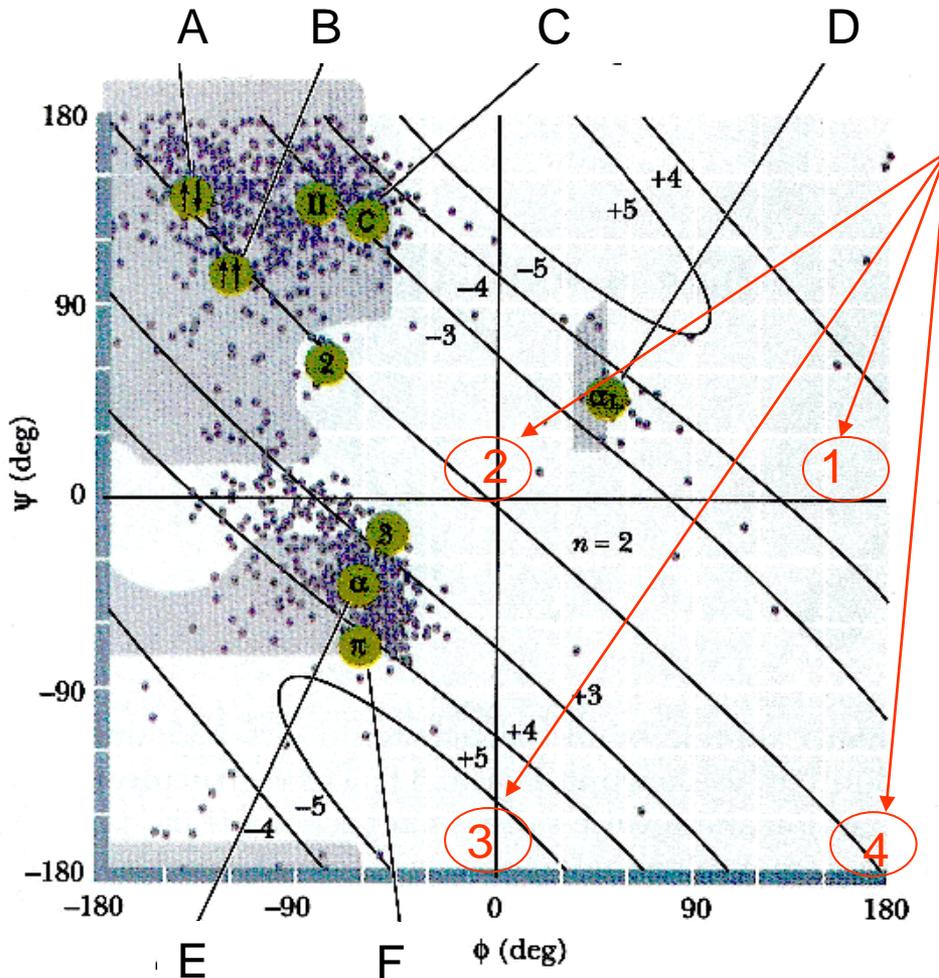
O único ponto de rotação possível da cadeia peptídica é em torno do C_α, entre as ligações peptídicas, definindo dois ângulos de rotação:

Ψ- (psi) – ângulo de rotação entre o C_α e o C

Φ (fi) – ângulo de rotação entre o C_α e N

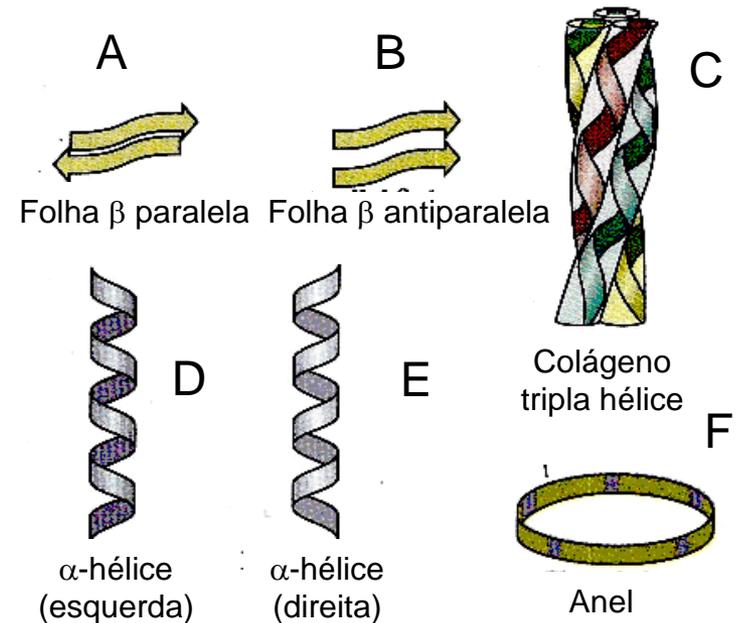
Gráfico de Ramachandran

Na década de 1950, o físico Ramachandran fez uma teoria sobre os ângulos possíveis de torção da ligação peptídica. Sua teoria previa que somente nas áreas **sombreadas** no gráfico abaixo poderia ocorrer um enovelamento estável das proteínas.

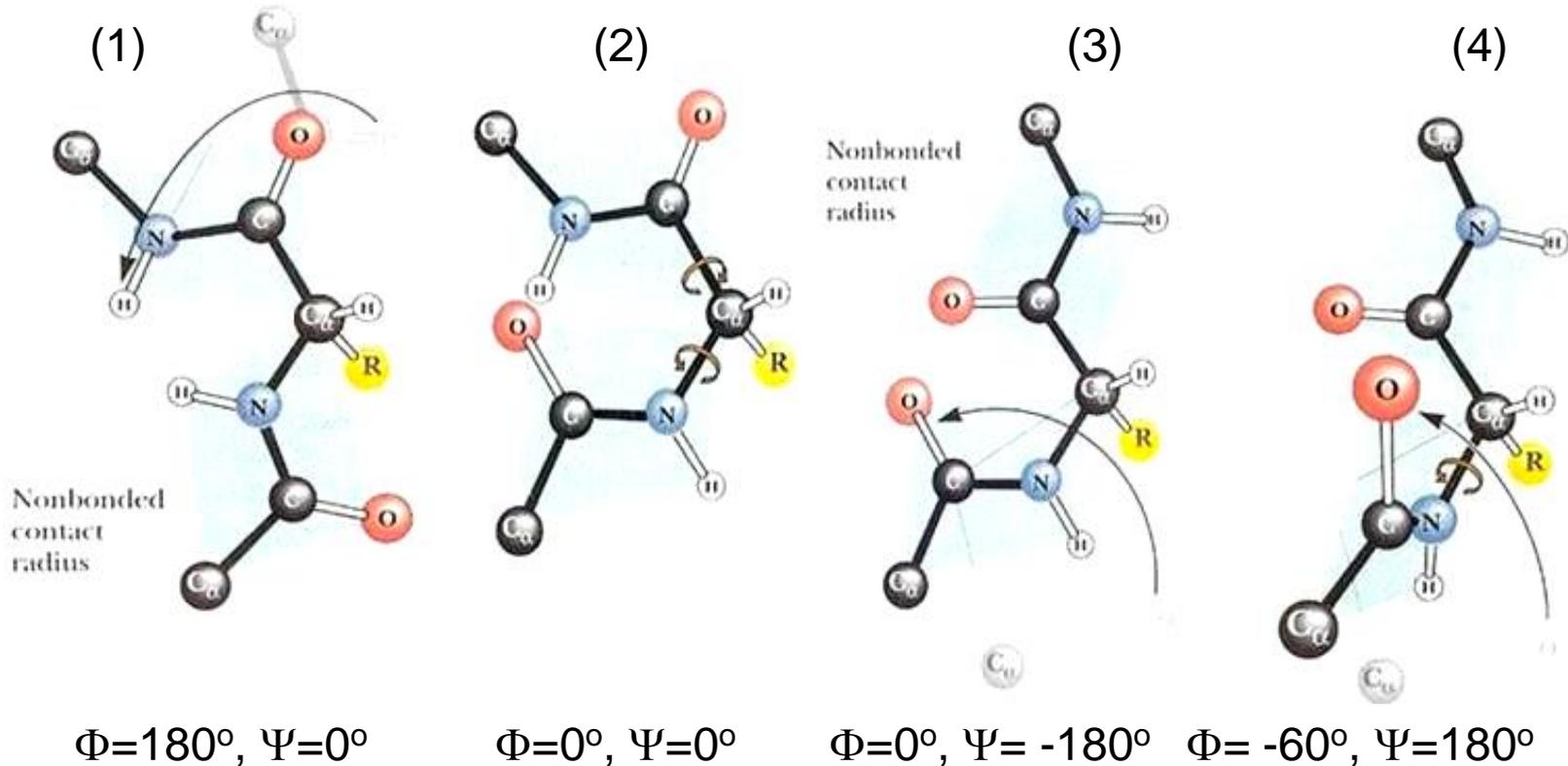


Observe no gráfico que nas regiões indicadas pelos círculos vermelhos, em que Ramachandran previu que não seria possível existir estruturas estáveis, até hoje não se descobriu nenhuma proteína.

Veja no próximo slide o que acontece com a ligação peptídica nessas regiões.



Ângulos de rotação da cadeia polipeptídica em torno de um carbono alfa



Ψ - (psi) – ângulo de rotação entre o $C\alpha$ e o C

Φ (fi) – ângulo de rotação entre o $C\alpha$ e N

Algumas das restrições de rotação da ligação peptídica implicam em colisão da nuvem eletrônica do O ou N (ex: 2 e 4), ou ainda no posicionamento dos átomos de tal modo que não possibilita a formação de pontes de H (ex: 1 e 3).

Ligações peptídicas

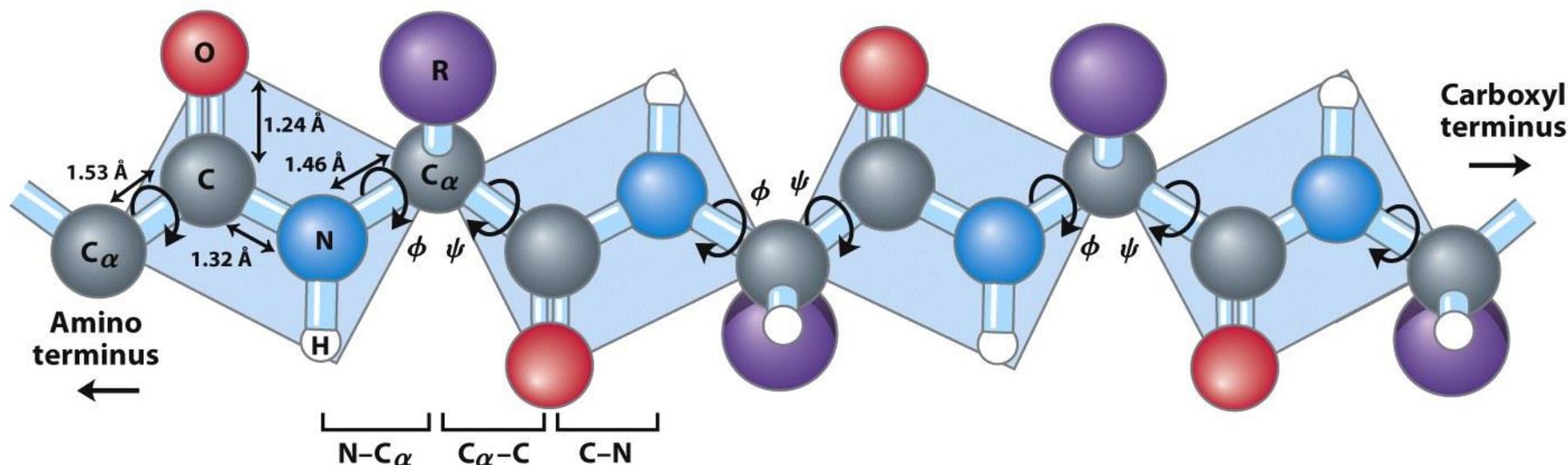


Figure 4-2b

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

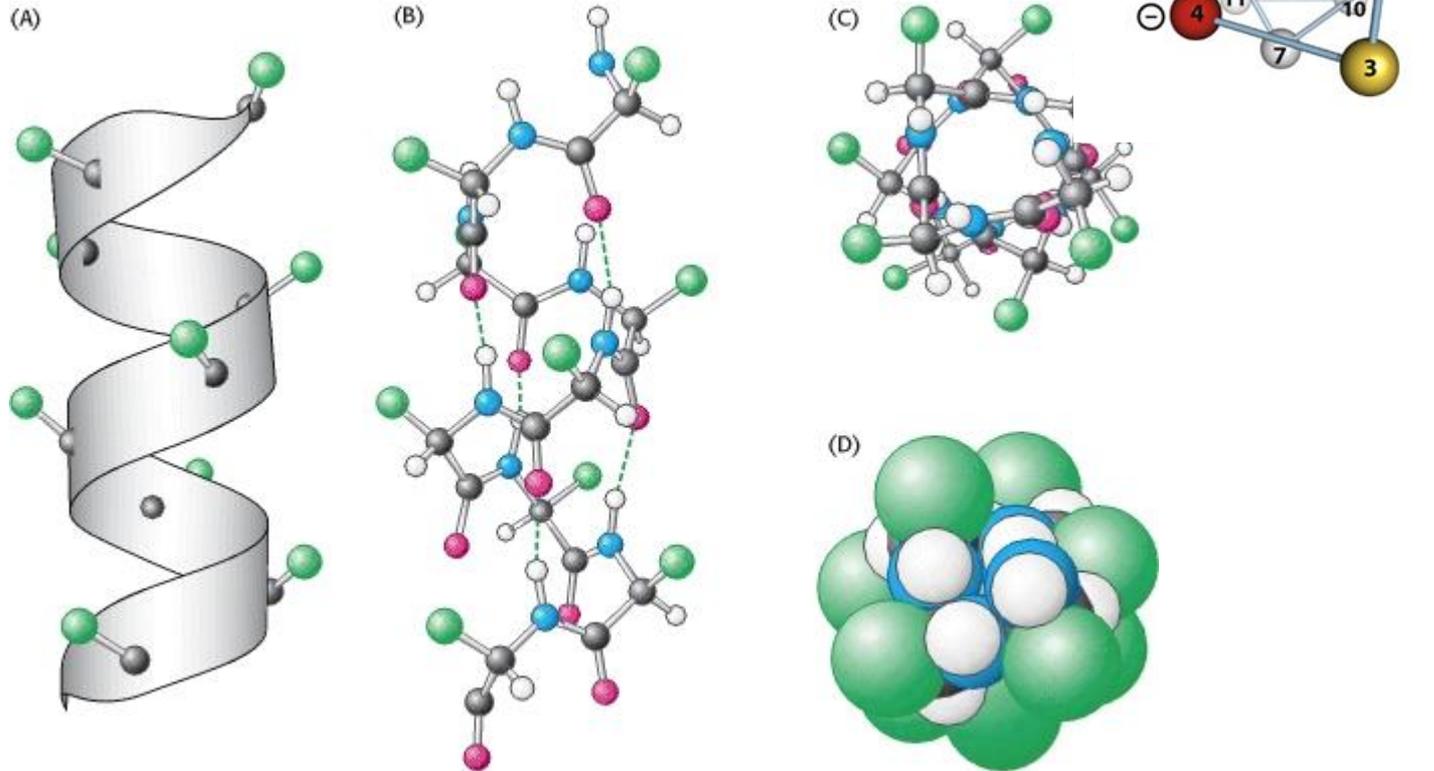
© 2008 W. H. Freeman and Company

- Angulos de ligação do C_{α} :
 - ϕ (phi): $C_{\alpha} - N$
 - ψ (psi): $C_{\alpha} - C$ do grupo carbonila

Estruturas secundárias regulares

- Estabilizadas por ligações de hidrogênio entre grupos NH e C=O do esqueleto da cadeia
- Ângulos ϕ e ψ praticamente idênticos ao longo da cadeia
- α helix, folha β [e β -turn (volta β)]

α hélice



Esqueleto mais compacto

$0^\circ < \psi < -70^\circ$ ($C\alpha$ - carbonila)

- 3,6 resíduos de aa por volta

- Ligações de H paralelas ao eixo, entre 1 aa e o 4º aa seguinte
- Cadeias laterais voltadas para fora

TABLE 4-1

Propensity of Amino Acids to Take Up an α -Helical Conformation

Amino acid	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)*	Amino acid	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)*
Ala	0	Leu	0.79
Arg	0.3	Lys	0.63
Asn	3	Met	0.88
Asp	2.5	Phe	2.0
Cys	3	Pro	>4
Gln	1.3	Ser	2.2
Glu	1.4	Thr	2.4
Gly	4.6	Tyr	2.0
His	2.6	Trp	2.0
Ile	1.4	Val	2.1

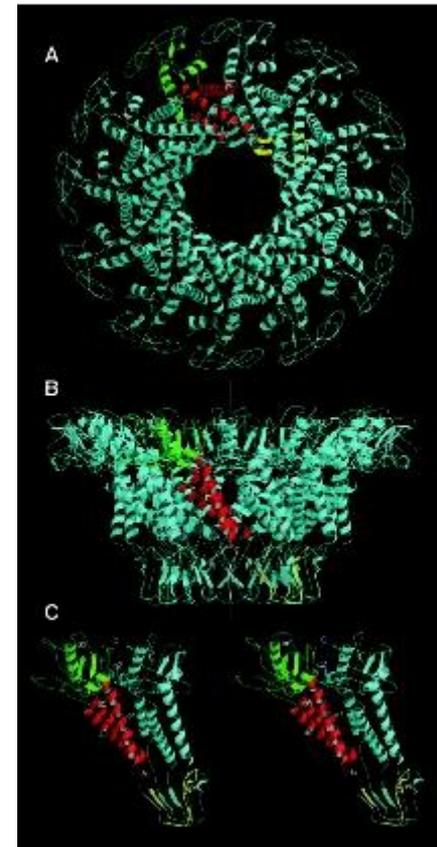
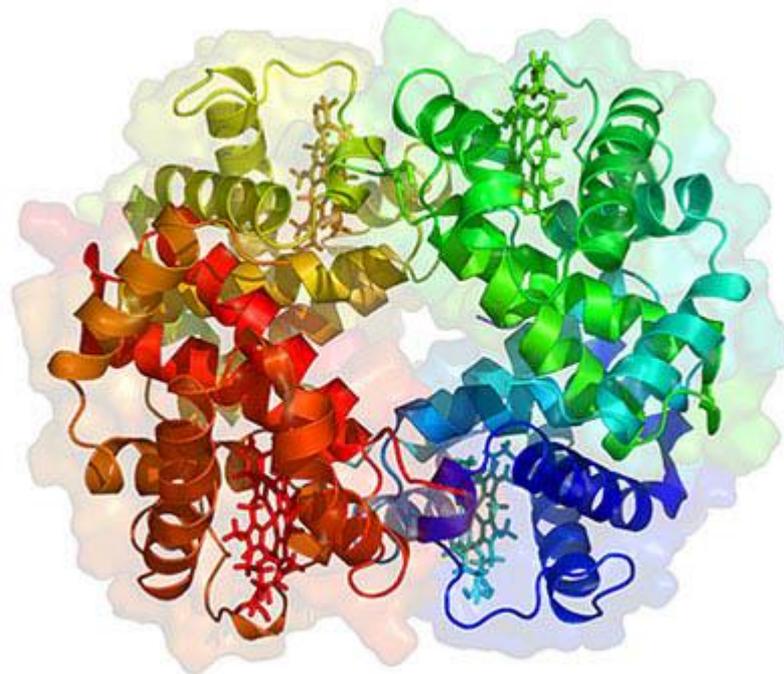
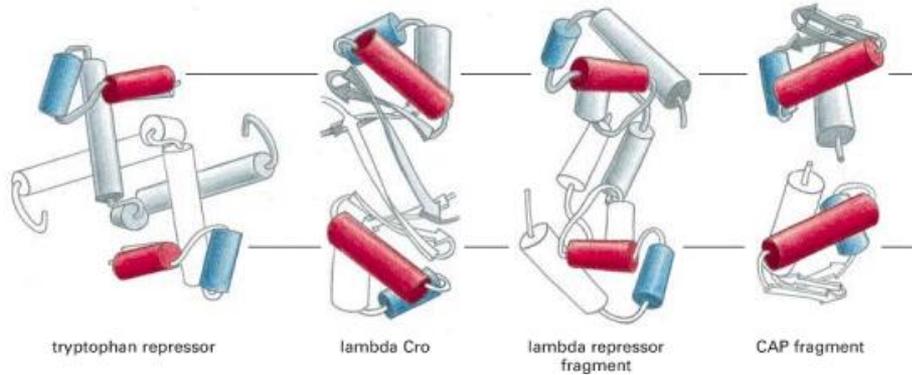
Quanto menor o $\Delta\Delta G^\circ$, maior a propensão

Sources: Data (except proline) from Bryson, J.W., Betz, S.F., Lu, H.S., Suich, D.J., Zhou, H.X., O'Neil, K.T., & DeGrado, W.F. (1995) Protein design: a hierarchic approach. *Science* 270, 935. Proline data from Myers, J.K., Pace, C.N., & Scholtz, J.M. (1997) Helix propensities are identical in proteins and peptides. *Biochemistry* 36, 10,926.

* $\Delta\Delta G^\circ$ is the difference in free-energy change, relative to that for alanine, required for the amino acid residue to take up the α -helical conformation. Larger numbers reflect greater difficulty taking up the α -helical structure. Data are a composite derived from multiple experiments and experimental systems.

Table 4-1

α hélices



The ø29 DNA Packaging Motor

Parallel

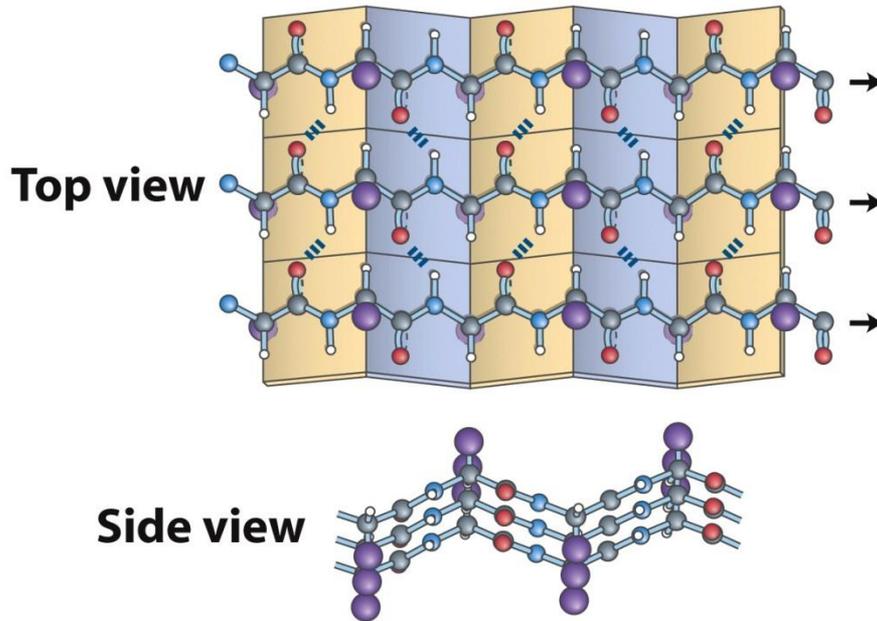


Figure 4-6b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Folhas β

Antiparalela

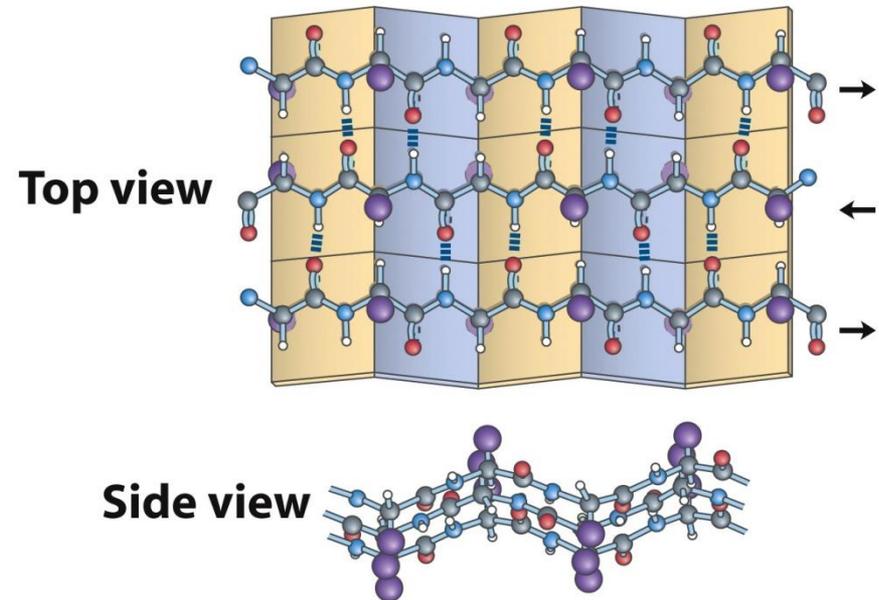
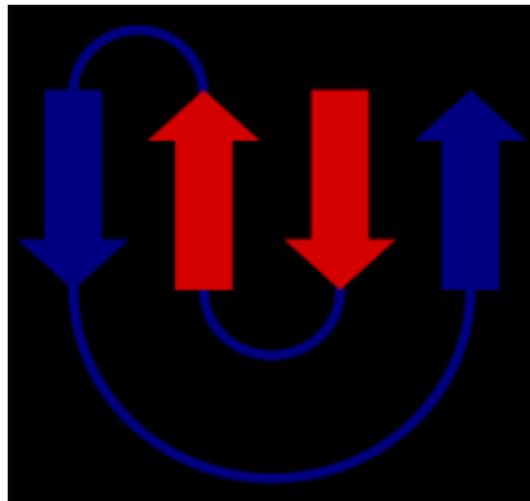
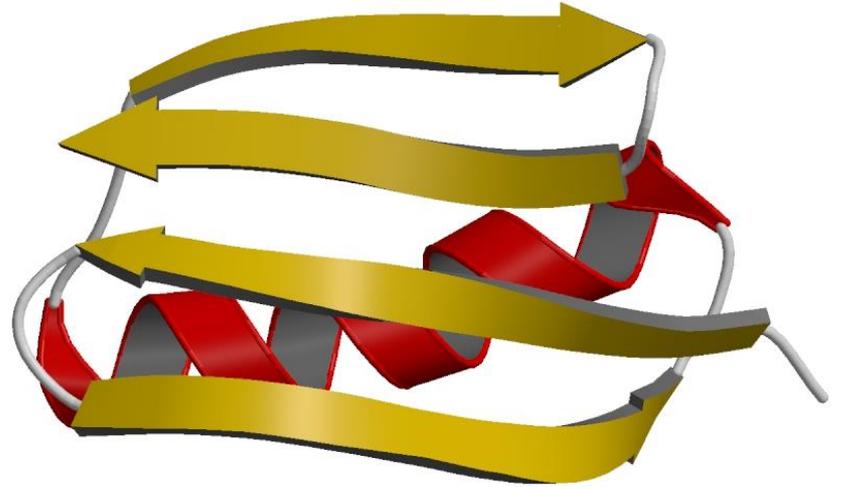
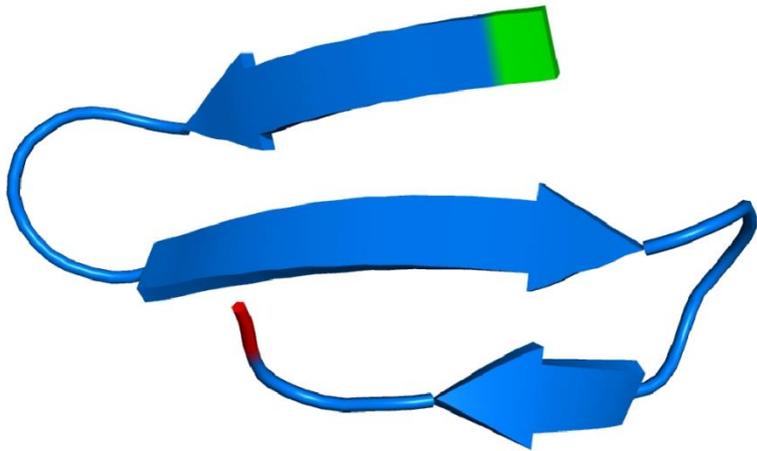


Figure 4-6a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

- Esqueleto mais distendido ($90^\circ < \theta < 180^\circ$)
- Pontes de H entre aa mais distantes
- Cadeias laterais em planos alternados

Folhas β



Proteína fibrosas - colágeno

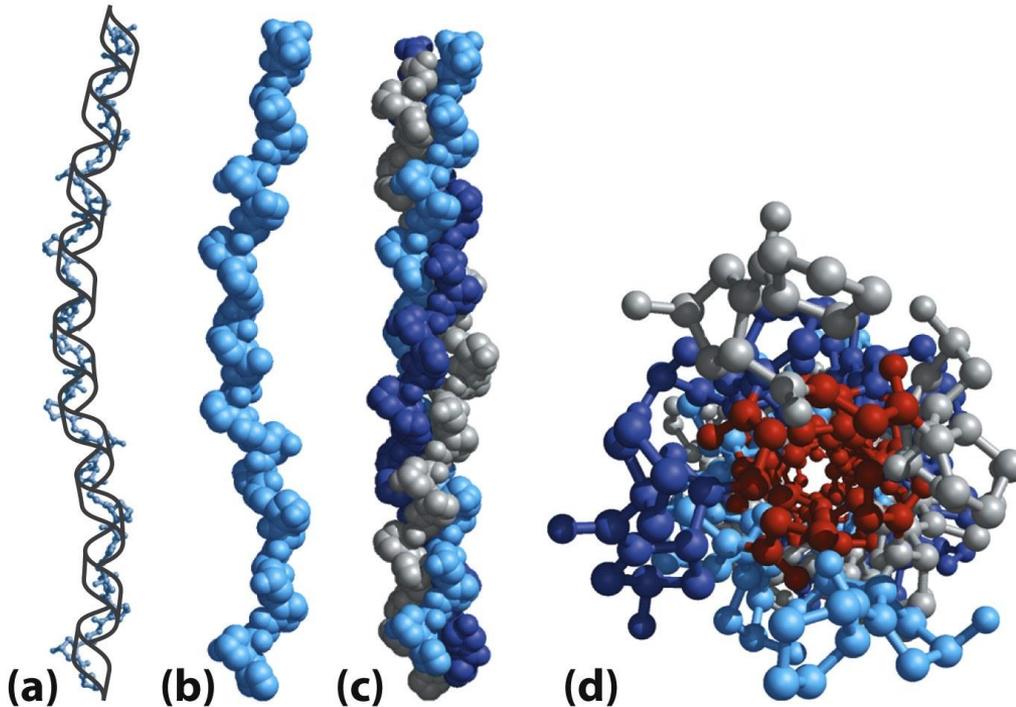


Figure 4-11
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

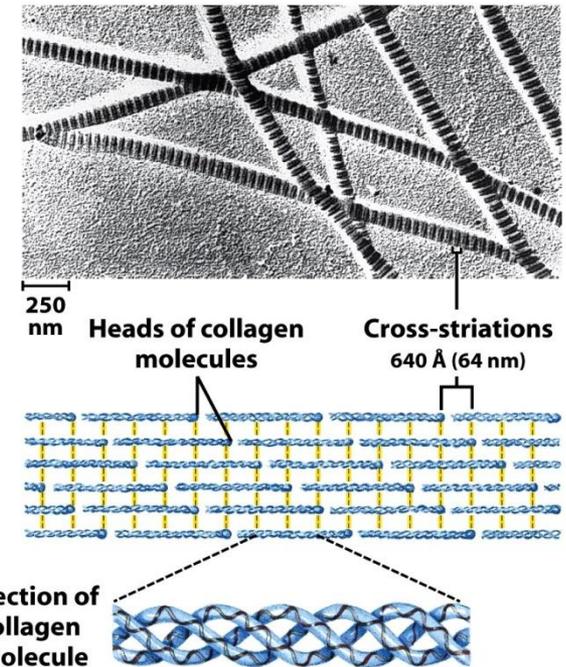


Figure 4-12
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

- Tecido conectivo
- Tripla hélice
- Rica em Gly, Pro e hidróxi-Pro
- fibrilas

Proteína fibrosas – fibroína da seda

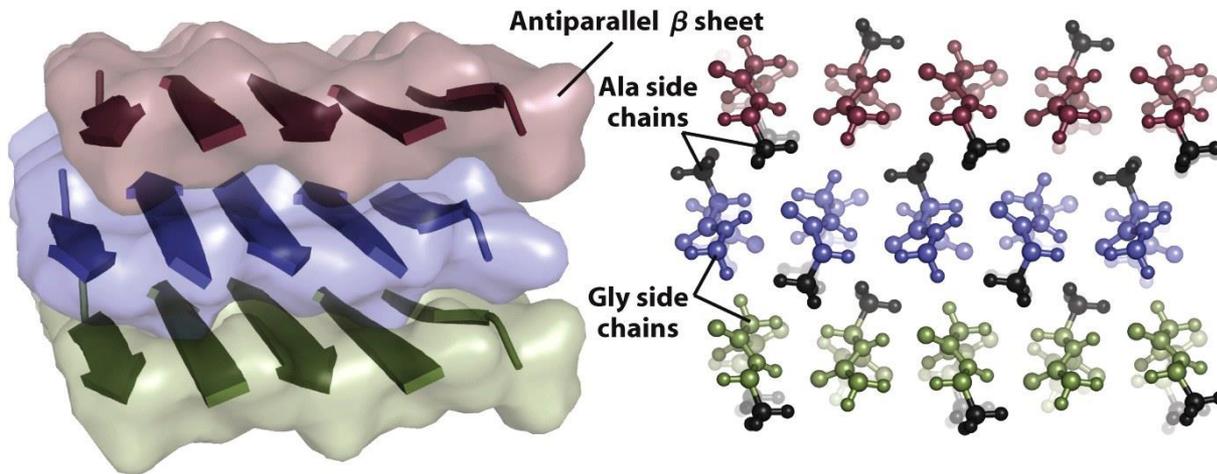
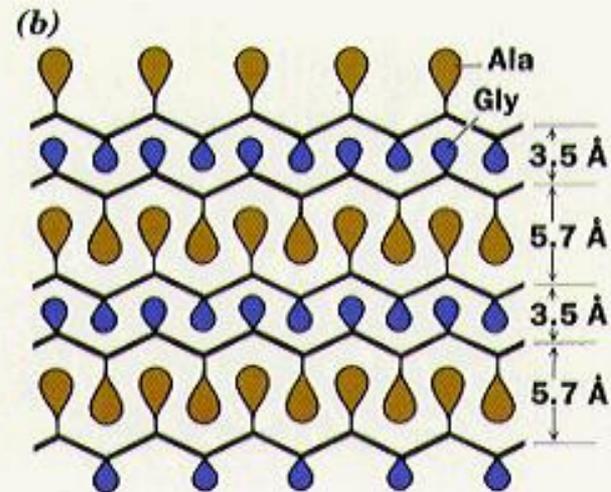


Figure 4-13a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



- Folhas b antiparalelas
- Aa pequenos (Ala e Gly)

Proteína fibrosas – queratina

Keratin α helix 

Two-chain coiled coil 

Protofilament  20–30 Å

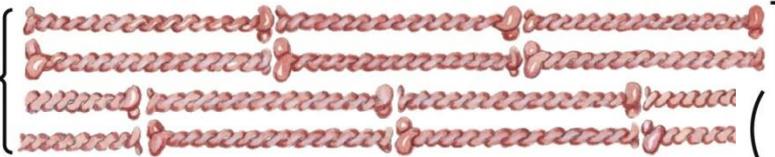
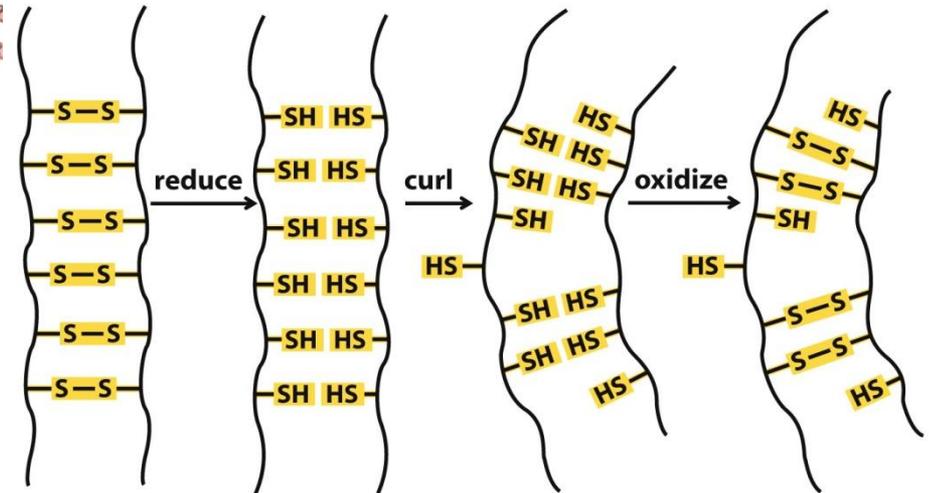
Protofibril 

Figure 4-10a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



Box 4-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

- Coiled-coil de alfa-hélices
- Pontes dissulfeto

Volta β (β turns)

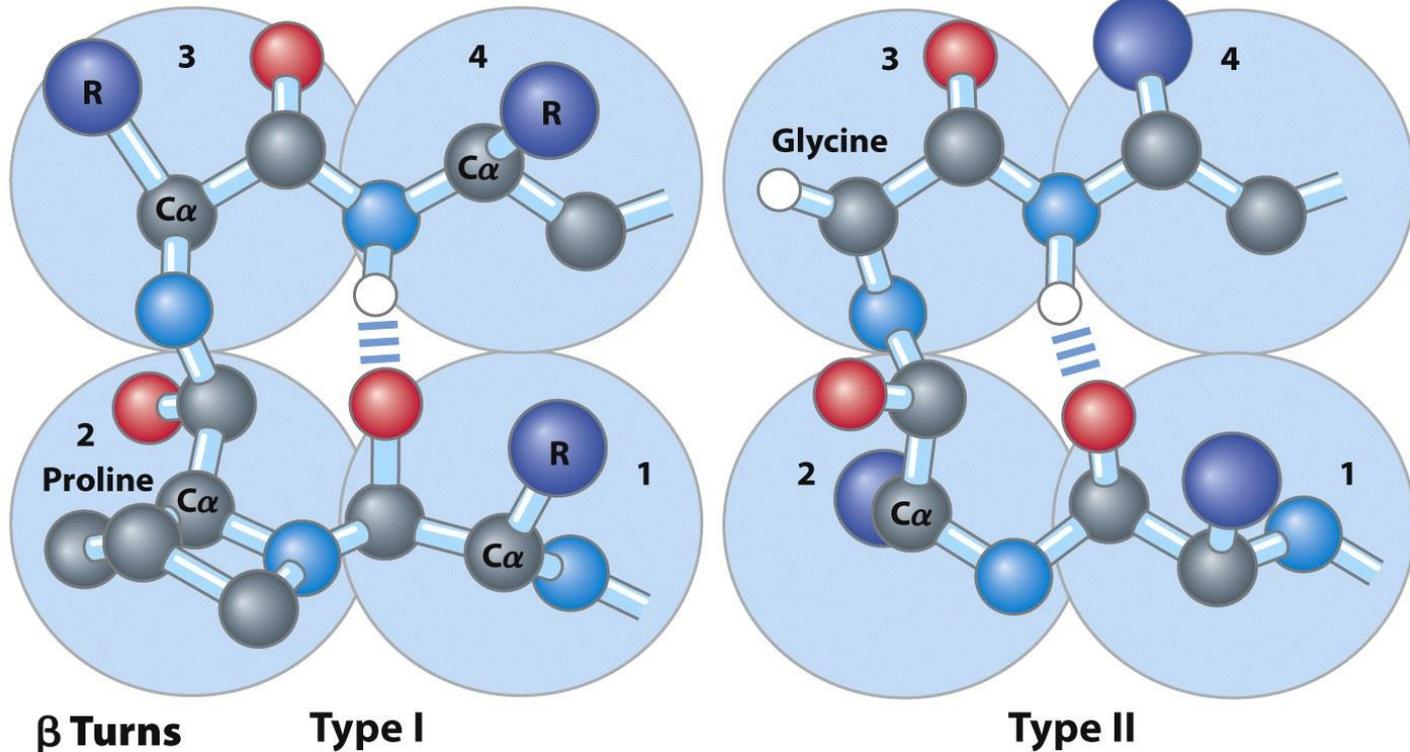


Figure 4-7a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Apenas 4 aa
Volta de 180° na cadeia
Entre folhas β

Estrutura Terciária

- Arranjo espacial total da cadeia polipeptídica
- Cadeias laterais dos aa participam de interações;
 - hidrofóbicas
 - pontes salinas (ligações iônicas)
 - pontes de hidrogênio
 - pontes dissulfeto
- Globulares ou fibrosas

Motivos em proteínas globulares

- tipos de estrutura que podem estar presentes em várias proteínas

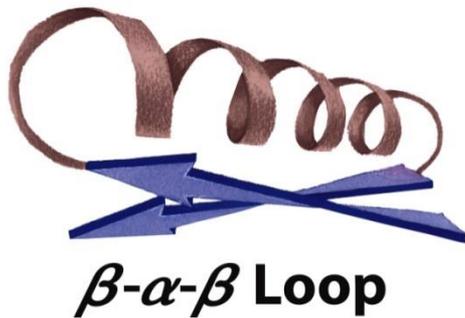
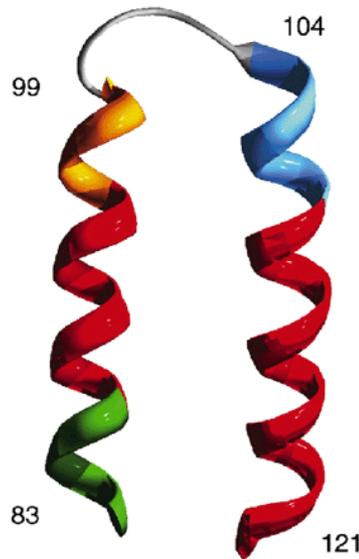


Figure 4-17a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



HTH

Motivos Hélice-Volta-Hélice

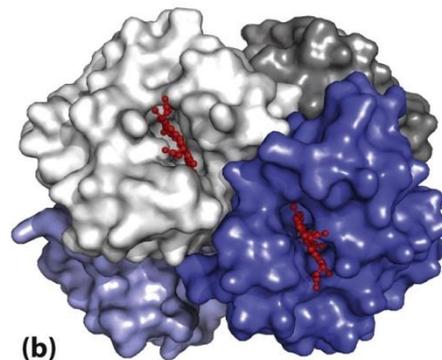
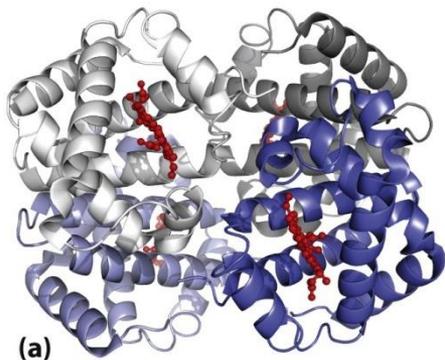


β Barrel

Figure 4-17b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

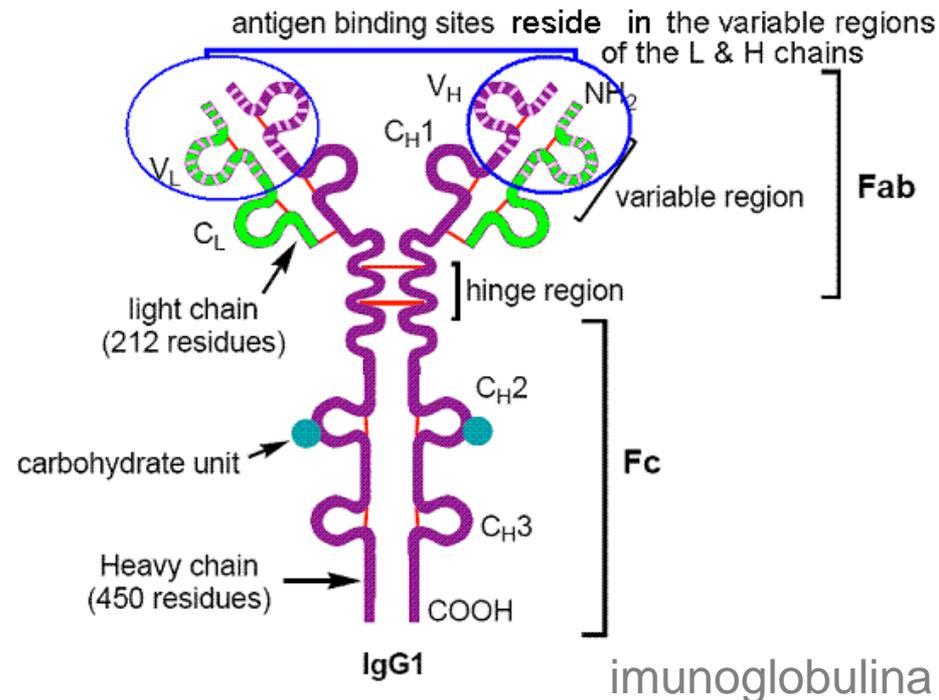
Estrutura quaternária

- Associação de cadeias polipeptídicas (subunidades)
- Estabilizada pelas mesmas forças que a estrutura terciária



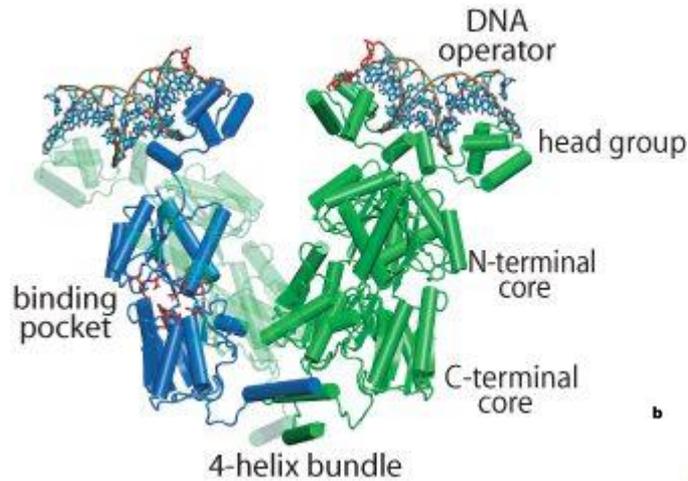
hemoglobina

Figure 4-22
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

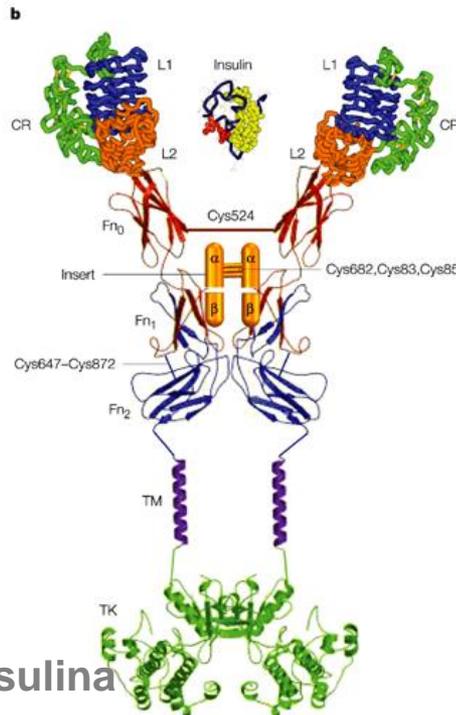
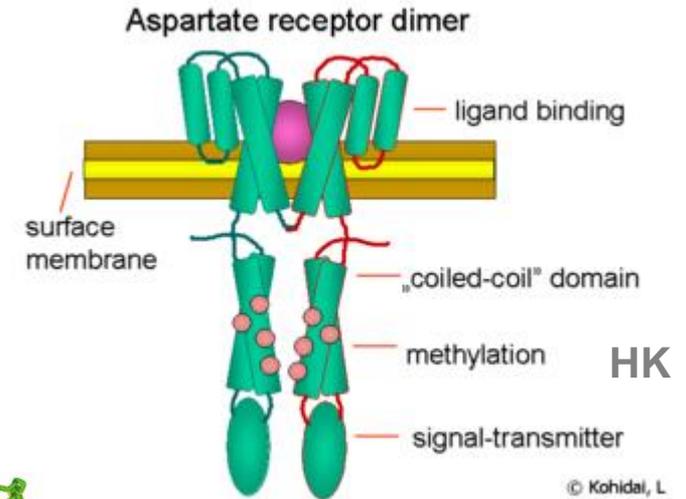


Domínios

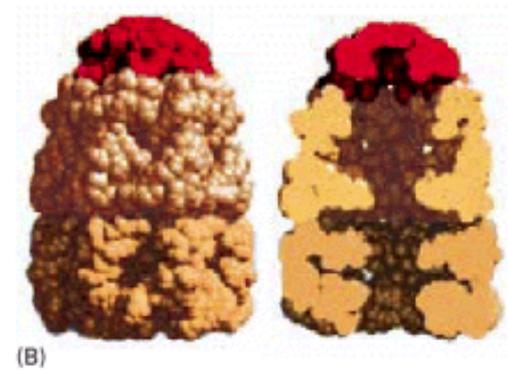
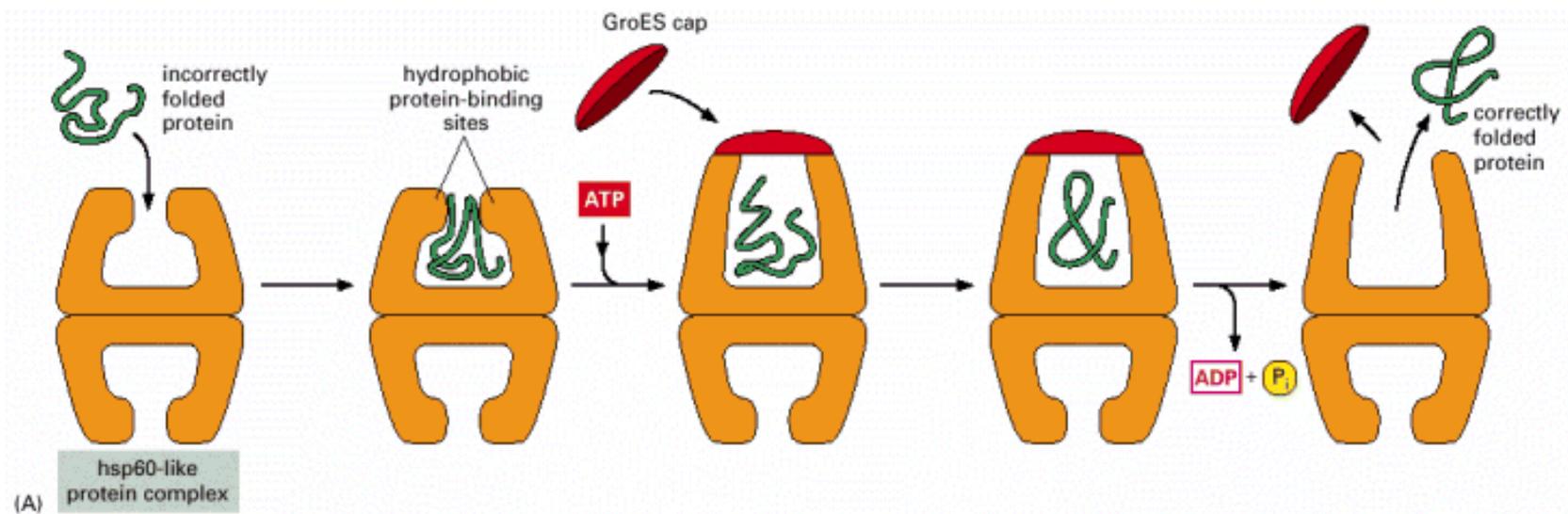
Regiões de um proteína com estrutura e função “independentes”



Repressor Lac



Receptor de insulina



Laskey, RA, Honda, BM, Mills, AD, and Finch, JT (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420.

Chaperonas Moleculares

conceitos gerais

O que é preciso para ser uma chaperonina:

- (1) interagir e estabilizar formas não-nativas de proteínas
- (2) não participar da estrutura da proteína

Função das chaperoninas:

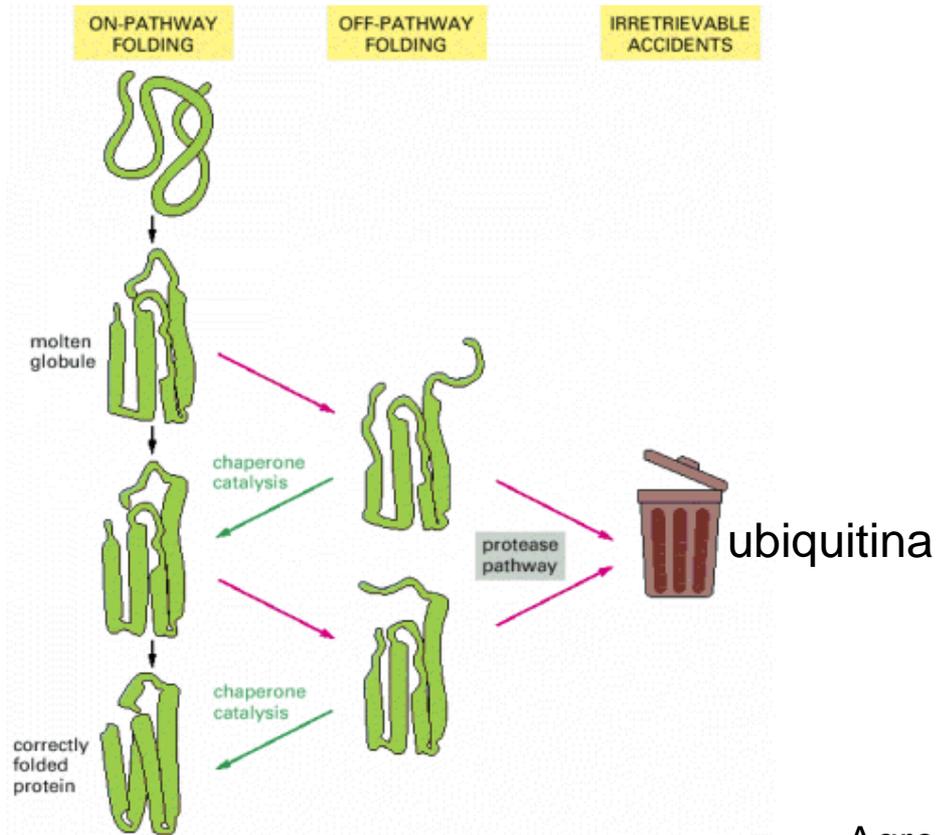
“classica”

- ajudar as proteínas na sua conformação

recente

- modular a conformação
- transporte
- desagregar agregados de proteína
- *unfold* da proteína

Controle de qualidade



proteína recém-sintetizada

Agregado proteico

Conformação correta sem ajuda

Conformação correta com chaperoninas

Conformação incorreta degradação

Tempo



Mecanismo da ubiquitina

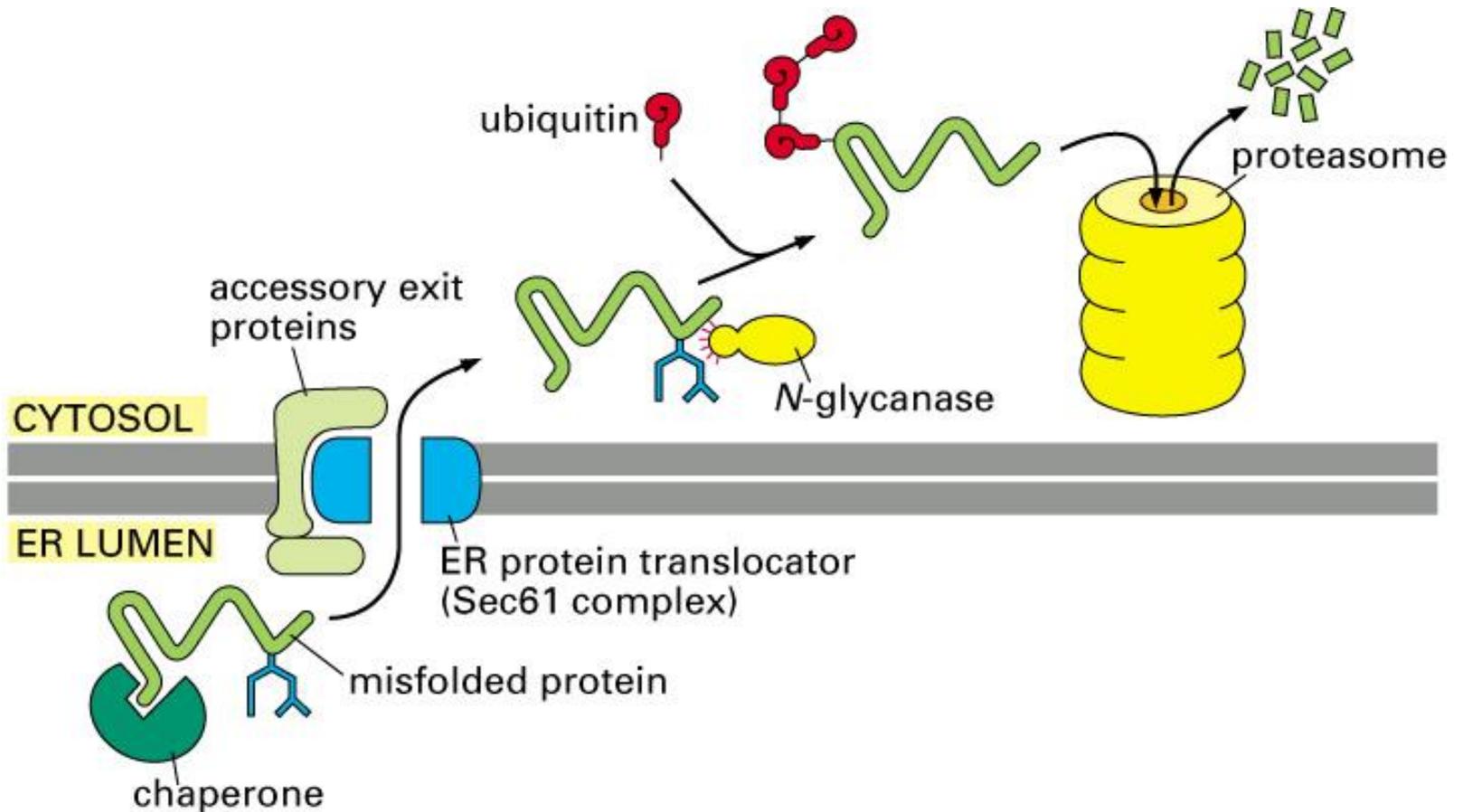


Figure 12-55. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Então...

Sabendo como é e como ocorre o processo de conformação das proteínas
E lembrando que a sua forma é fundamental para sua função...

Como que a proteína vai para o lugar onde ela tem que agir?

Como que ela sabe onde que é?

Ela se modifica nesse processo?

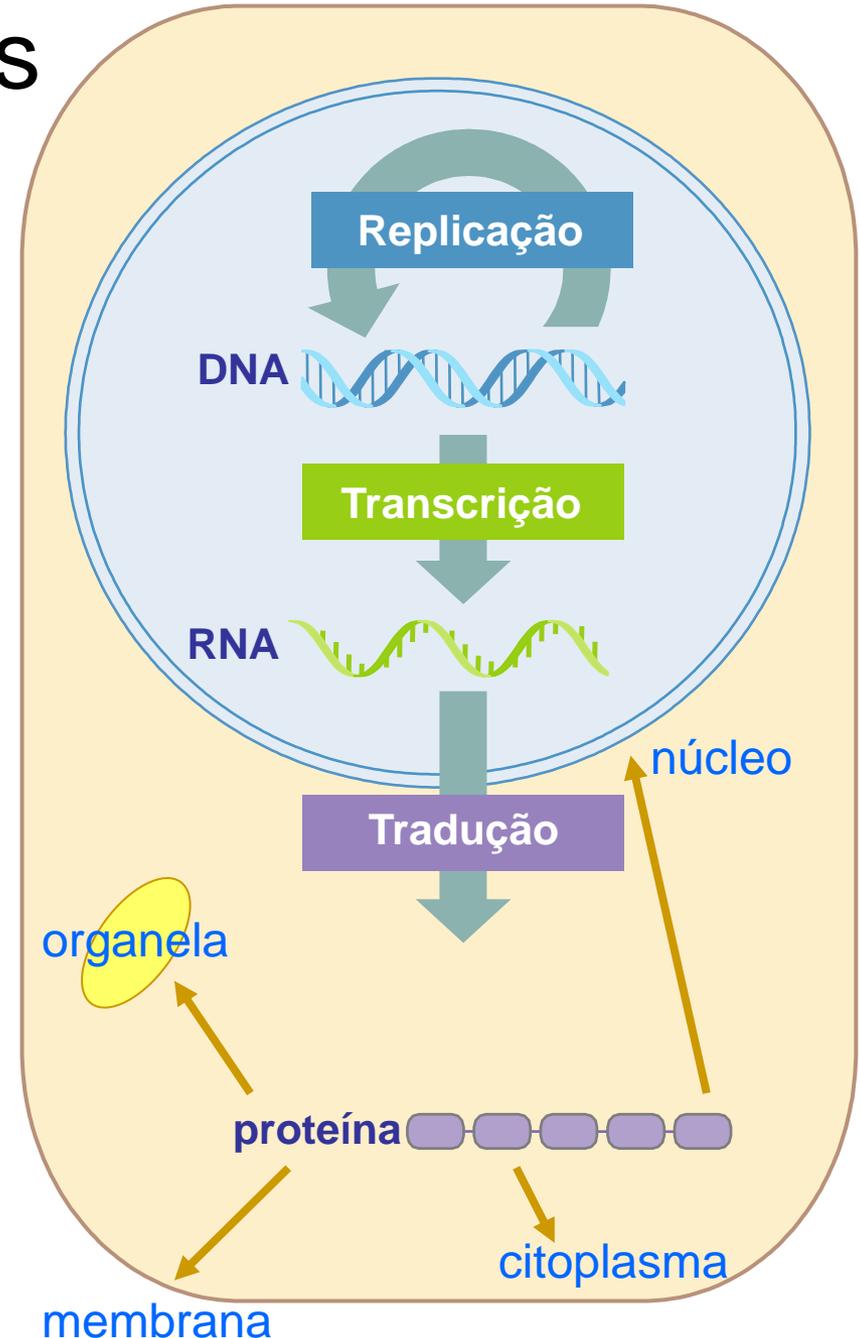
Transporte de proteínas

As proteínas que se movem para o citoplasma não tem sistema de transporte, utilizam os movimentos citoplasmáticos

As proteínas que se movem do citoplasma para o núcleo passam por meio dos poros nucleares

As proteínas que se movem do citoplasma para o RE e organelas são transportados por translocadores protéicos

As proteínas que se movem do citoplasma para a membrana é conduzida por vesículas de transporte



Transporte de proteínas

As seqüências sinais direcionam as proteínas

- O sinal típico de uma proteína é uma porção de seqüência, tipicamente com 15 a 60 aminoácidos
- Esta seqüência é tipicamente removida da proteína final

Seqüências sinais

Região	seqüência
RE	Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Phe-Trp-Ala
lúmen	-Lys-Asp-Glu-Leu-
mitocôndria	Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-
núcleo	Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Lys-Val-
peroxissomo	Ser-Lys-Leu

Revisando

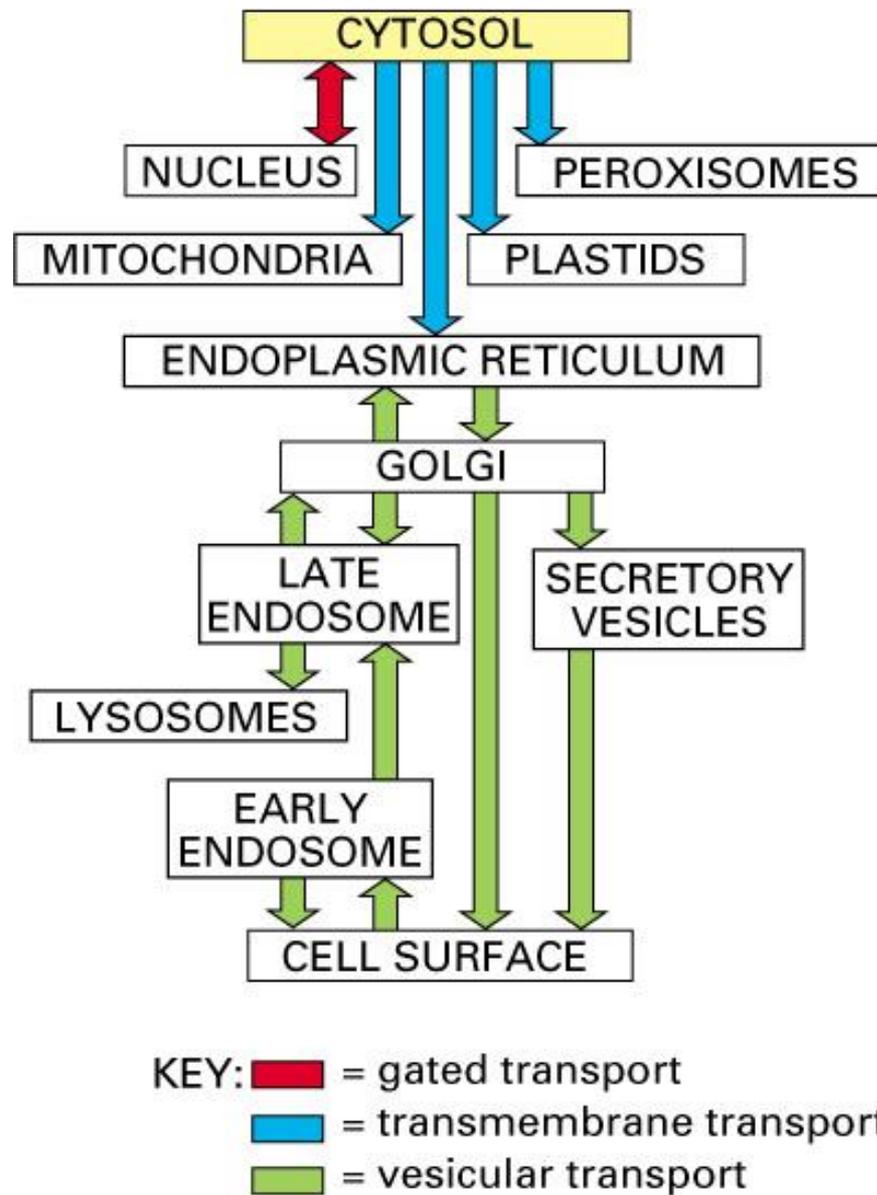
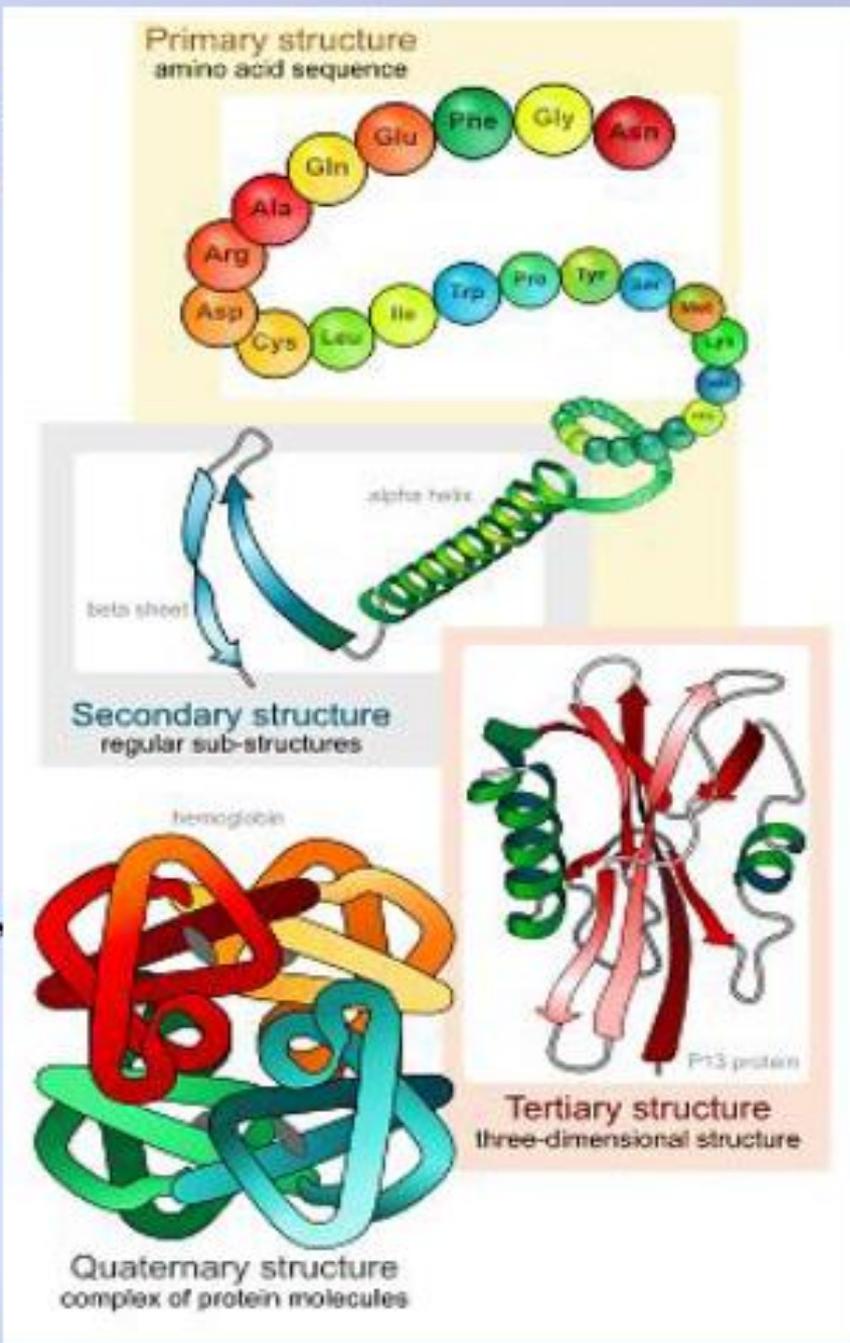


Figure 12–6. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Métodos de Separação e Identificação de Proteínas

Estrutura primária
sequência linear dos aminoácidos unidos por ligações peptídicas

Estrutura terciária
arranjo tridimensional da cadeia polipeptídica, interações entre aminoácidos mais distantes

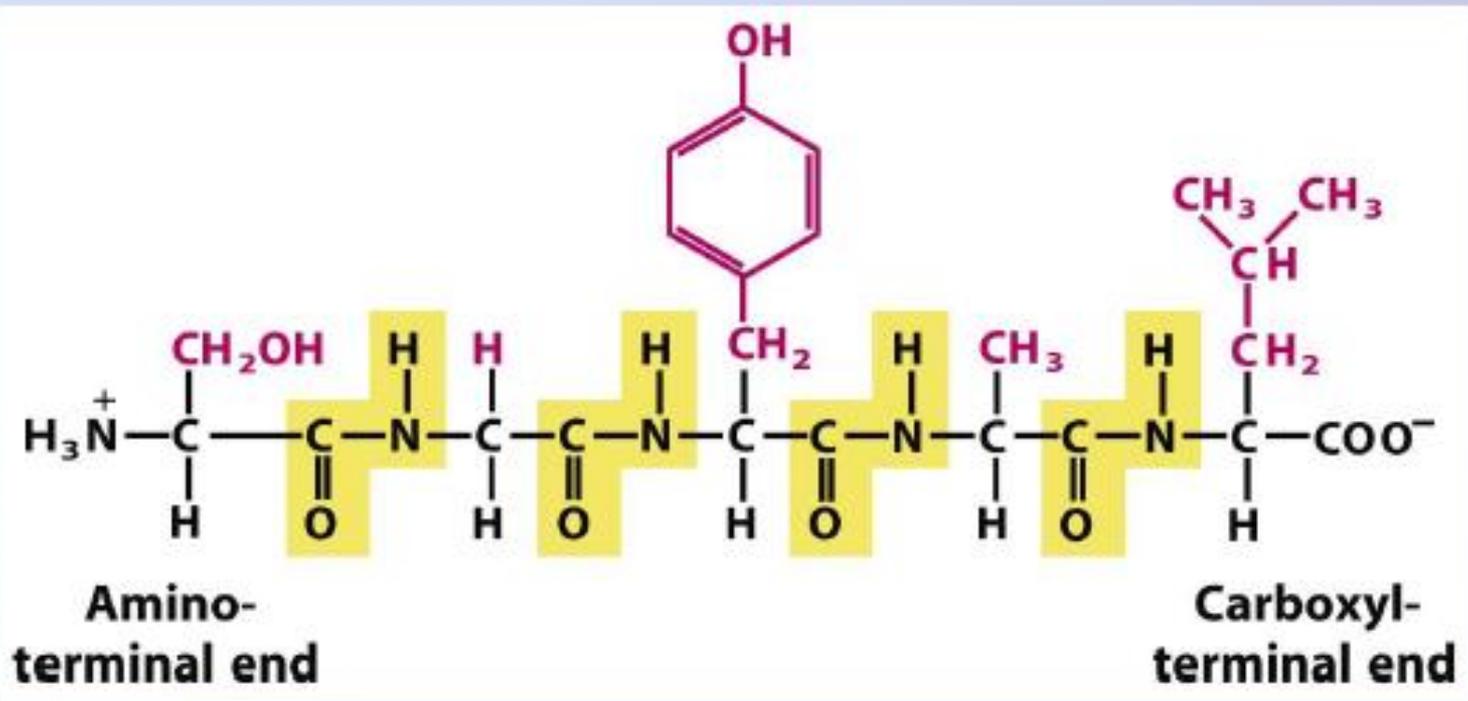


Estrutura secundária
conformação local de alguns regiões da cadeia polipeptídica (α -hélice, β -pregueada e dobras β)

Estrutura quaternária
arranjo tridimensional de diferentes cadeias polipeptídicas

Estrutura primária das proteínas

- Seqüência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas
- Terminal amino e carboxila
- Número variável de resíduos de aminoácidos



Principais componentes moleculares da bactéria *E. coli*

Componentes	Nº de moléculas diferentes	% peso total
H ₂ O	1	70
Proteínas	3.000	15
Ac. Nucléico	1 - DNA e 1000-RNA	7
Carbohidratos	50	3
Lipídeos	40	2
Outros	Íons - 12 Mol. Monoméricas - 500	3

O **isolamento ou purificação** de uma proteína é uma etapa que precede os estudos de suas características físico-químicas, de sua estrutura 3D e a compreensão de suas propriedades biológicas.

Métodos de Isolamento de Biomoléculas

Os métodos de separação de biomoléculas são agrupados em duas categorias:

Métodos baseados em características físico-químicas das biomoléculas:

1. Tamanho – Massa – Densidade (ex: centrifugação, diálise, gel-filtração)
2. Carga elétrica (ex: cromatografia de troca iônica, eletroforese)
3. Solubilidade ou hidrofobicidade (ex: cromatografia em papel, fase reversa)

Métodos baseados em afinidade biológica, que exploram a interação entre duas moléculas:

4. Cromatografia de afinidade (pressupõe que uma das moléculas do par que interage é um “reagente” de fácil obtenção, disponível comercialmente)

MATERIAL BIOLÓGICO DE PARTIDA: (100g)

SOBRENADANTE

ORGANELAS

- Lisossomos
- Mitocôndria
- Golgi
- Núcleo

Precipitação com Sal/Solvente

F₁ **F₂** F₃ F₄

Precipitação com Sal/Solvente

F_{2.1} **F_{2.2}** F_{2.3}

Cromatografia Troca Iônica

F_{2.3.1} F_{2.3.2} ● F_{2.3.N}

**Cromatografia Troca Iônica
(pH ou resina diferente)**

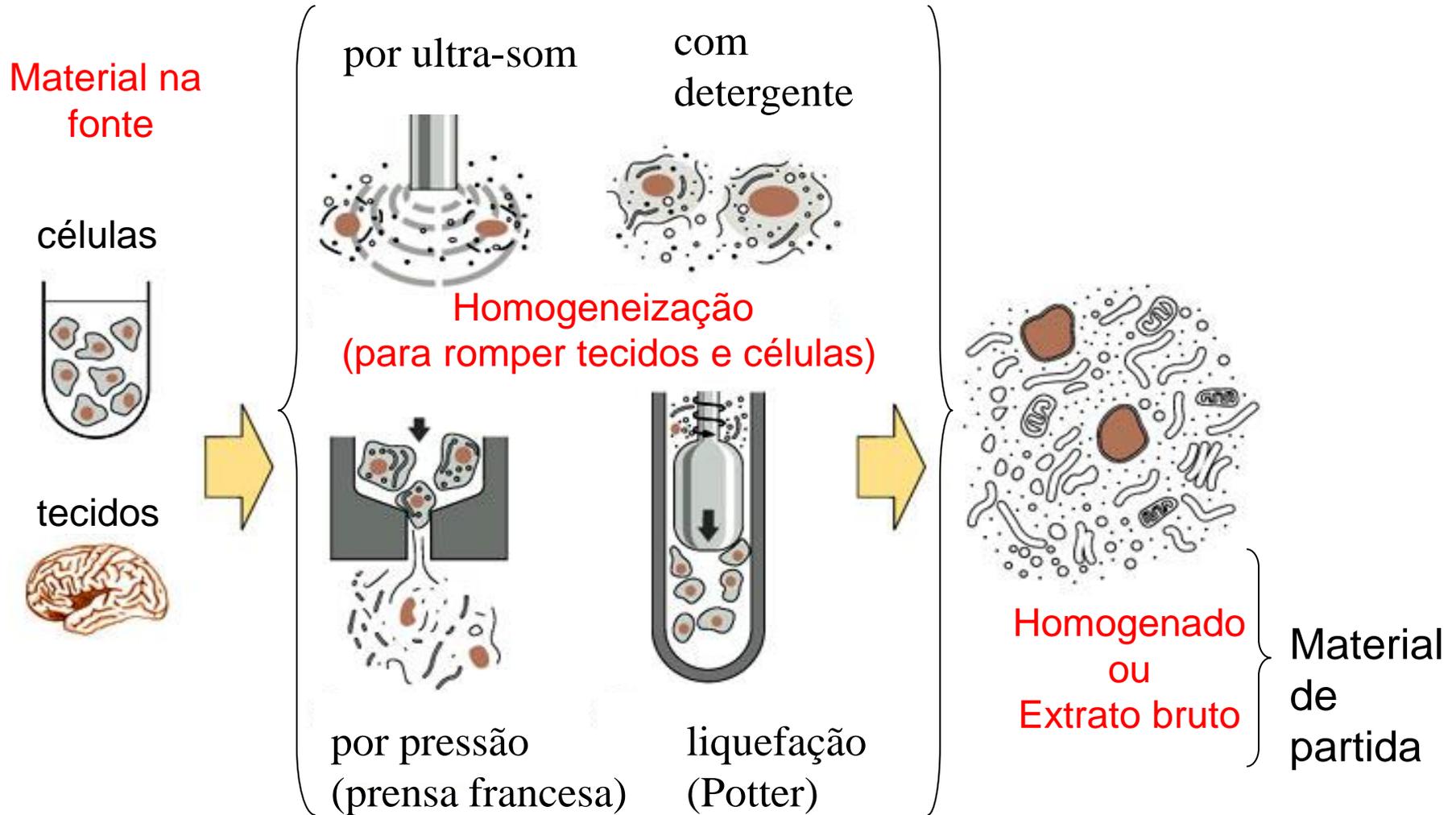
F_{2.3.N.X}

Gel Filtração

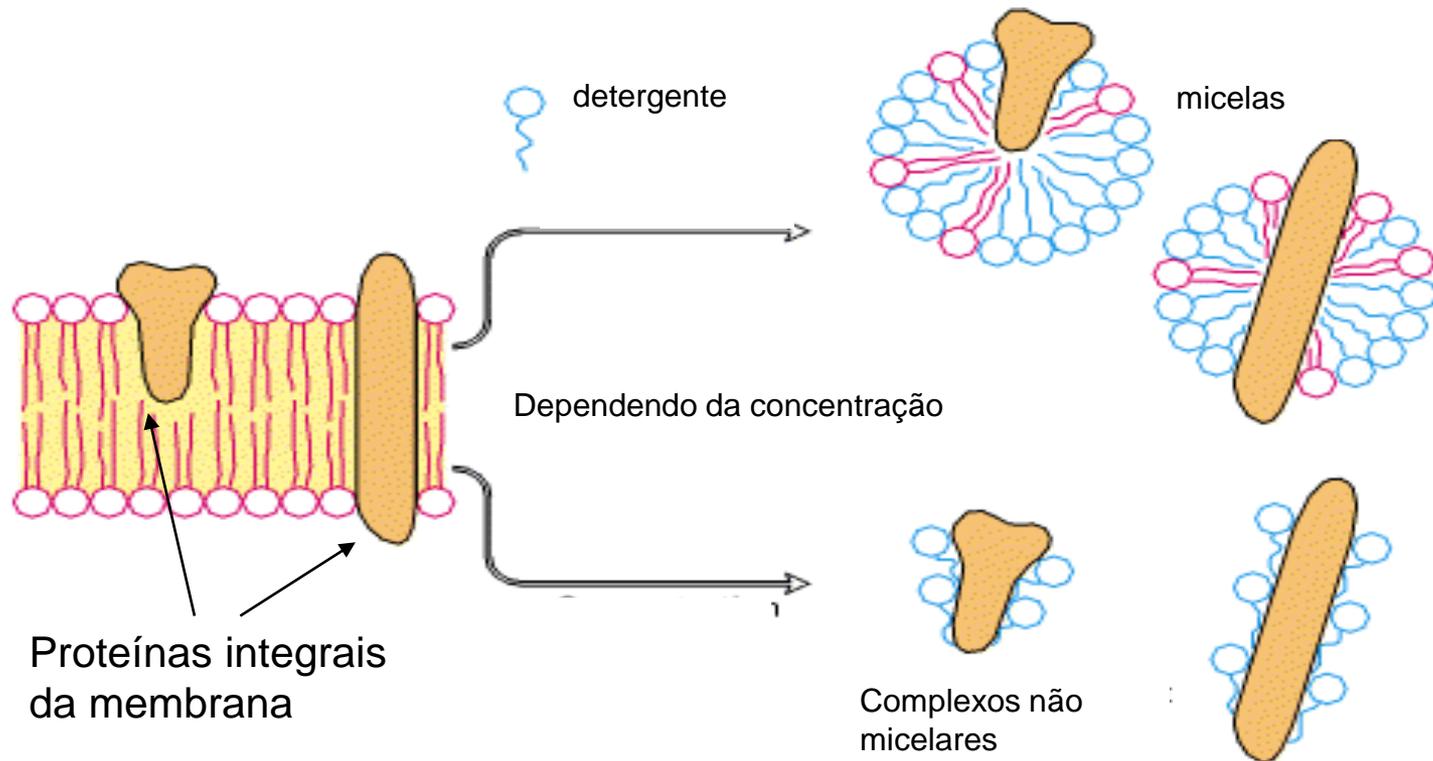
1 Proteína apenas

(0.001g) - 0.1 a 0.5% total

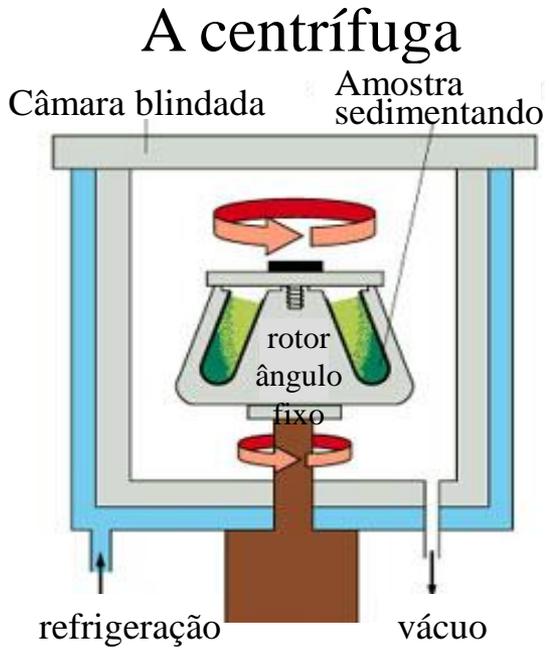
Para iniciar a purificação, inicialmente é necessário **extrair** a proteína de interesse para um meio líquido, exceto se ela já estiver naturalmente presente em um meio líquido (sangue, suor, água do mar, meio de cultura, seiva de planta, etc).



Sendo a proteína de interesse uma proteína de membrana, é necessário solubilizá-la. Para esse fim são utilizados detergentes, que dissolvem a membrana plasmática e formando complexos solúveis com as proteínas.

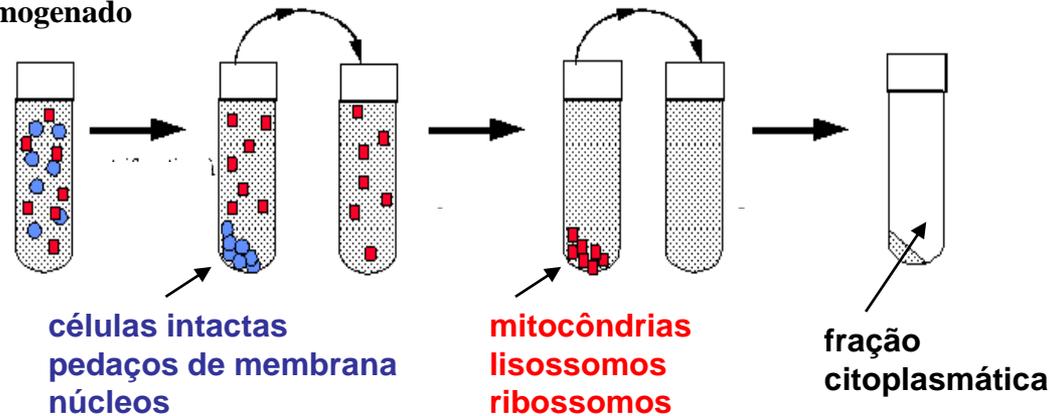


CENTRIFUGAÇÃO



centrifugação diferencial

homogenizado



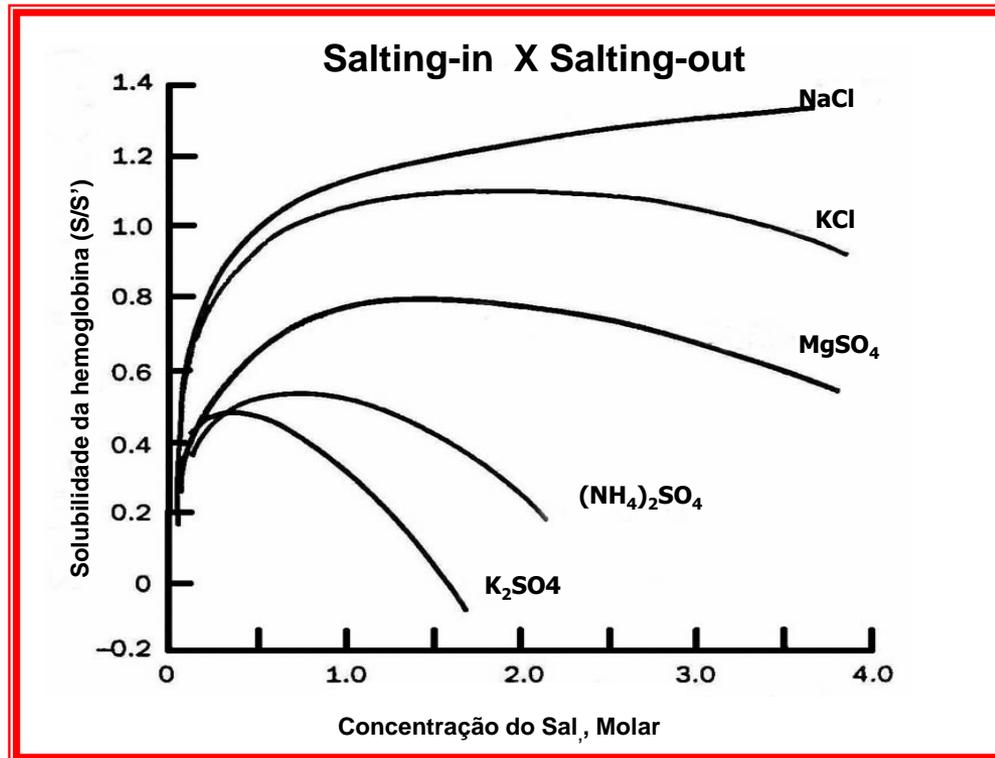
sangue centrifugado: separação de plasma e células

A precipitação de proteínas pode ser induzida por:

- adição de sais (Precipitação salina)
- adição de solventes
- variação de pH (Precipitação isoeletrica)

Em baixa concentração salina, a solubilidade das proteínas aumenta, pois os íons do sal ajudam a reforçar a camada de solvatação.

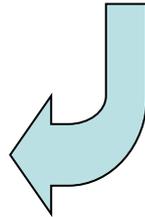
Em alta concentração salina, a solubilidade das proteínas diminui, pois os íons do sal competem pelas moléculas de água disponíveis para formar a sua própria camada de solvatação.



Proteínas também podem ser precipitadas quando colocadas em meio com pH próximo ao seu ponto isoelétrico.

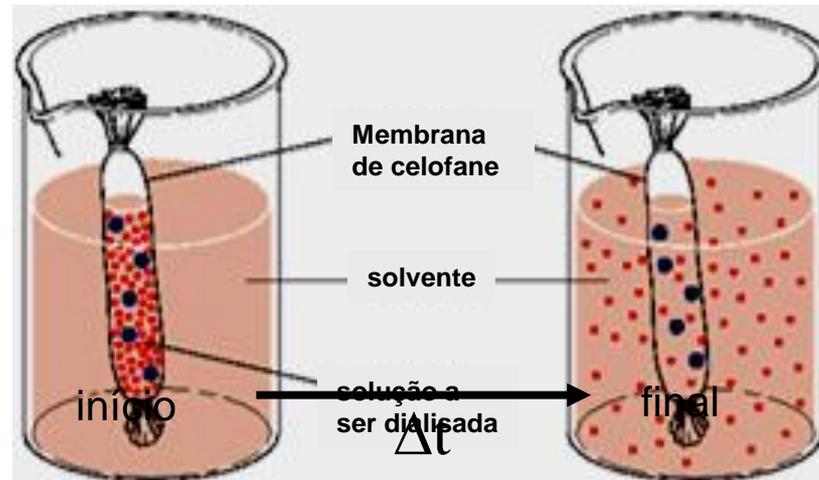
Proteína	P.I.
Pepsina	<1,0
Ovalbumina galinha	4,6
Albumina sérica humana	4,9
Tropomiosina	5,1
Insulina bovina	5,4
Fibrinogênio humano	5,8
Gama-globulina	6,6
Colágeno	6,6
Mioglobina equina	7,0
Hemoglobina humana	7,1
Ribonuclease A bovina	7,8
Citocromo C equino	10,6
Histona bovina	10,8
Lisozima, galinha	11,0
Salmina, salmão	12,1

Proteínas colocadas em meio com pH igual ao seu PI tendem a precipitar, pois tendo carga neutra, apresentam a camada de solvatação menos organizada e menos capacidade de competir pelas moléculas de água disponíveis para formar a sua própria camada de solvatação.



Ponto Isoelétrico de algumas Proteínas

Para obter as proteínas precipitadas em solução novamente, é necessário reverter as condições que levaram à precipitação.

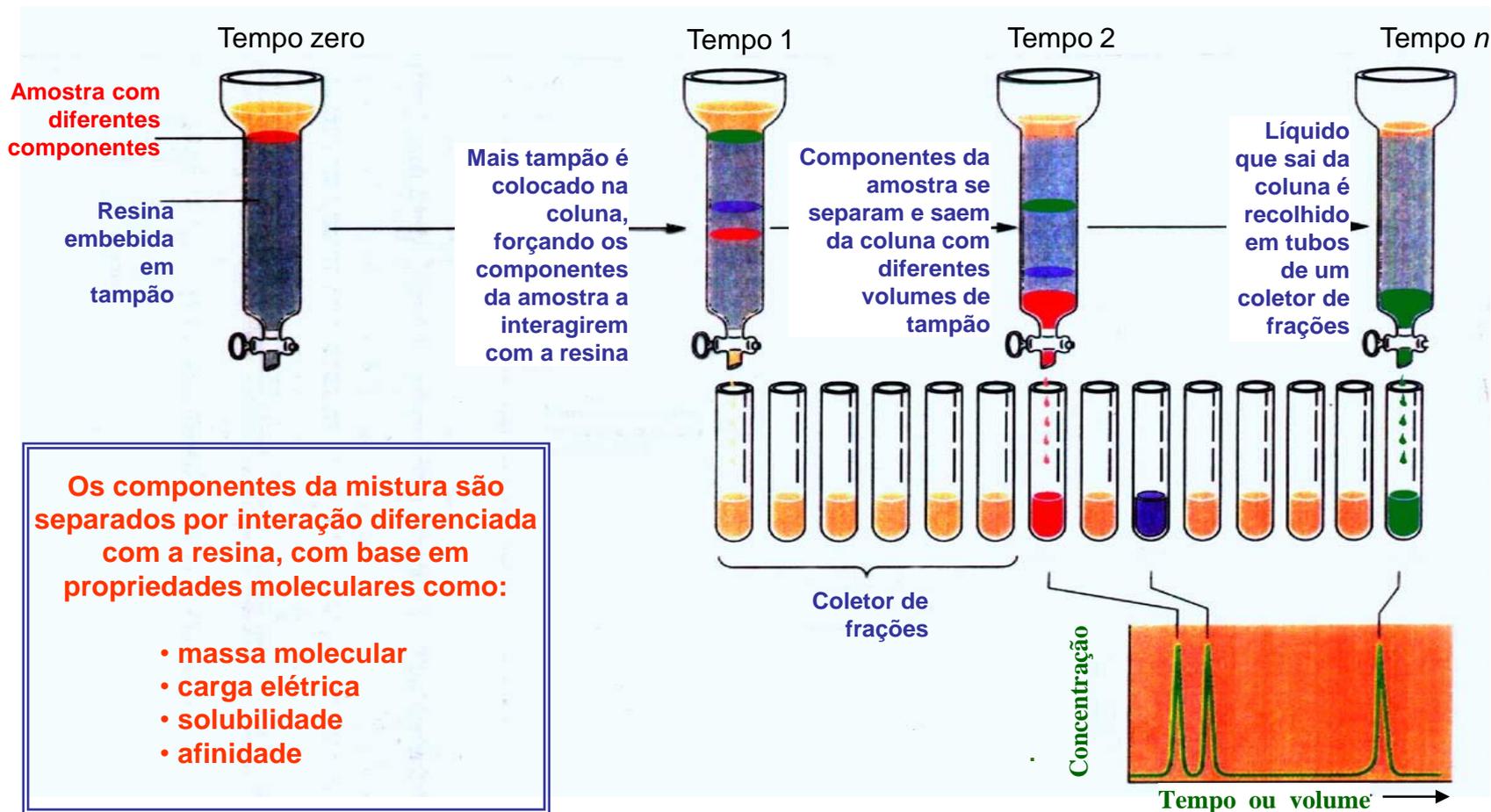


Para remover o excesso de sal ou do solvente no precipitado, utiliza-se a **diálise**.

CROMATOGRAFIA

Funcionamento Básico de uma Coluna Cromatográfica

Uma **coluna** é um tubo cilíndrico aberto nas duas extremidades e preenchido com a **resina** ou **matriz** ou **gel** cromatográfico.



Que características devem ter as resina cromatográficas para possibilitar separações de moléculas baseadas em diferentes propriedades ?

Cromatografia de permeação em gel ou gel-filtração:

↳ { separação de moléculas pela massa molecular
géis são porosos, funcionando como peneiras ou filtros

Cromatografia de troca iônica:

↳ { separação de moléculas pela carga elétrica
géis apresentam grupos carregados positiva- ou negativamente

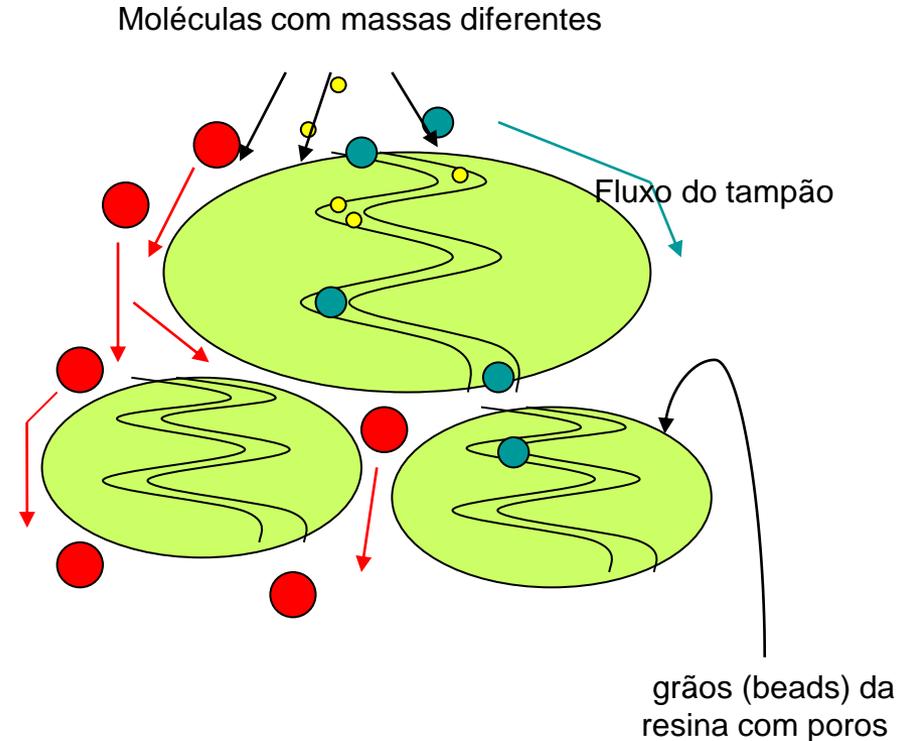
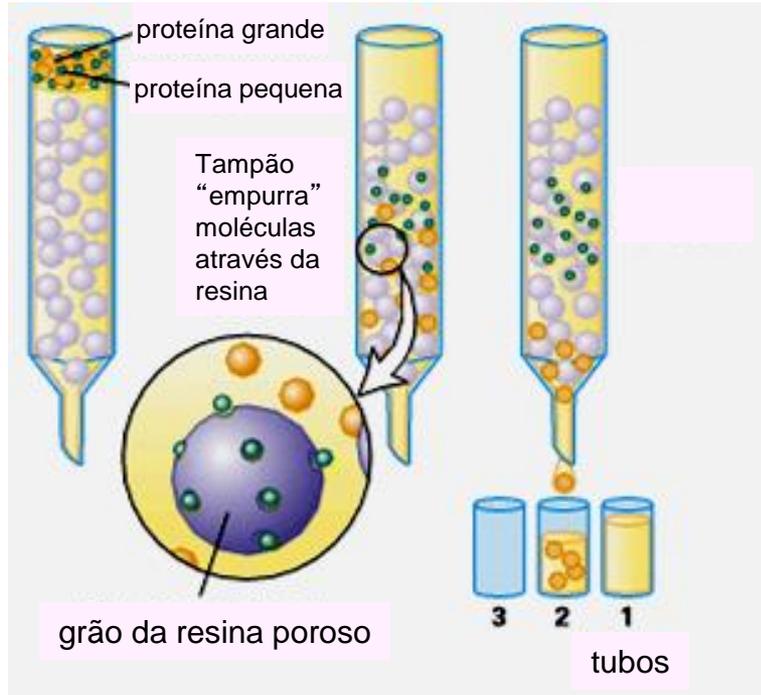
Cromatografia de partição (fase reversa ou hidrofóbica):

↳ { separação de moléculas pela solubilidade relativa em meio aquoso
géis possuem carácter hidrofóbico

Cromatografia de afinidade:

↳ { separação de moléculas pela capacidade de interagir com um ligante
géis possuem ligante específico ligado covalente à resina

Cromatografia de gel filtração ou peneira molecular

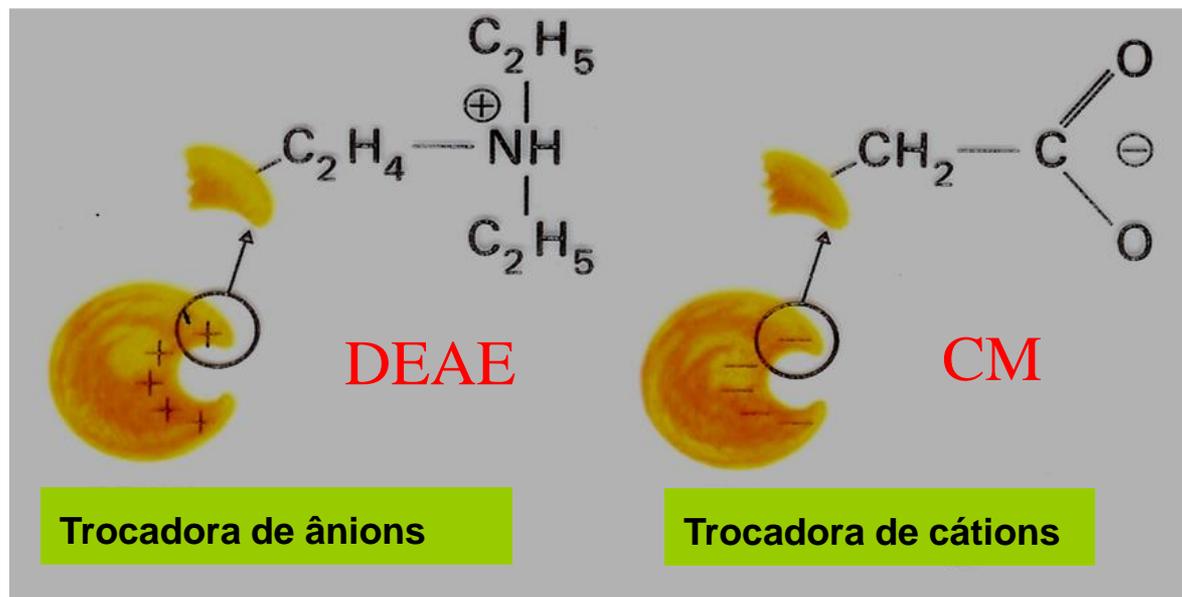


Proteínas maiores que o diâmetro dos poros **não são separadas** e saem da coluna com pouco tampão, correspondente apenas ao volume da coluna externo aos grãos, também chamado de volume morto (V_0).

Proteínas menores que o diâmetro dos poros **não são separadas** e saem da coluna com um volume de tampão correspondente ao volume interno (V_i , volume total menos o volume do próprio gel).

Cromatografia de troca iônica

A resina para cromatografia de troca iônica apresenta carga elétrica, positiva ou negativa, em uma ampla faixa de pH.



Existem dois tipos básicos: resinas trocadoras de ânions (possuem carga positiva), como o dietilaminoetil (DEAE)-celulose e resinas trocadoras de cátions (possuem carga negativa), como o carboxi-metil (CM)-celulose

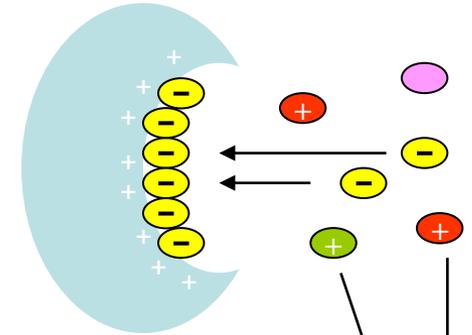
Como funciona a Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica compreende duas etapas:

- 1) adsorção das proteínas com carga contrária à resina, e saída da coluna das proteínas com a mesma carga;
- 2) eluição das proteínas adsorvidas.

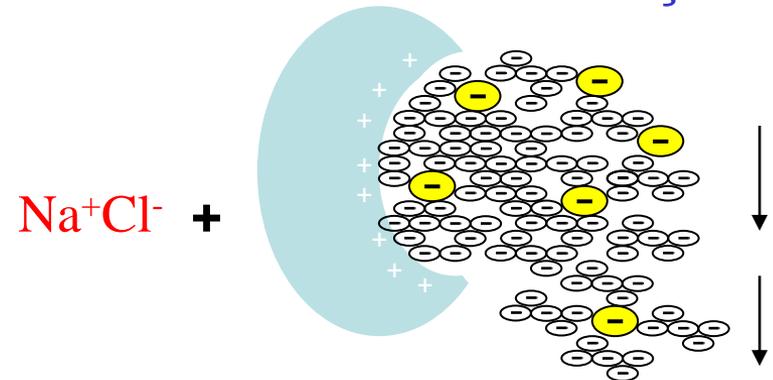
Utiliza-se um aumento da concentração do sal no tampão

Adsorção



Moléculas com a mesma carga, ou sem carga, não interagem com a resina, sendo as primeiras a sair da coluna

Eluição

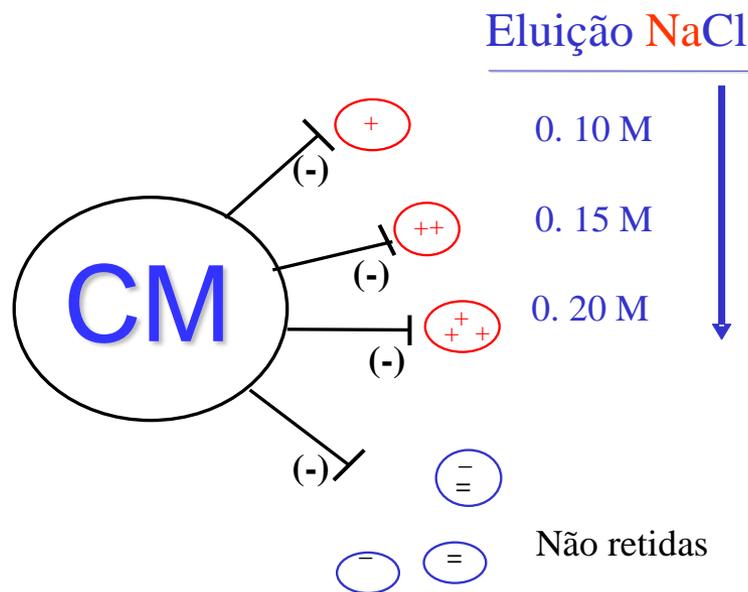


Adição de sal ao tampão resulta em competição entre os íons em solução e as moléculas adsorvidas na resina.

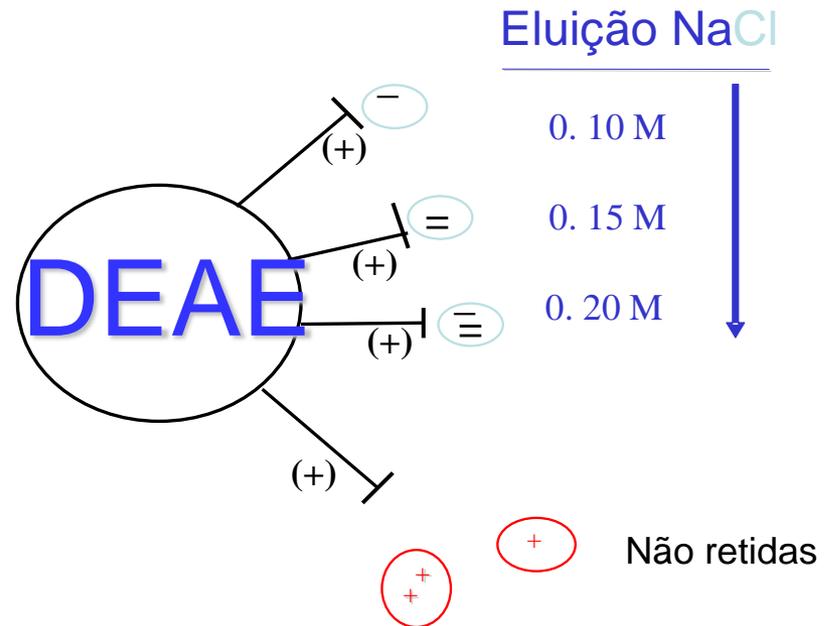
Duas Modalidades de Cromatografia de Troca Iônica

Gradientes de sal podem fracionar as proteínas adsorvidas na resina de acordo com a intensidade de suas cargas, que é dada pela diferença entre seus PIs e o pH do tampão de eluição.

As proteínas não retidas (com a mesma carga da resina) não são separadas, sendo simplesmente “arrastadas” pelo tampão (ou seja, não são repelidas pela resina).



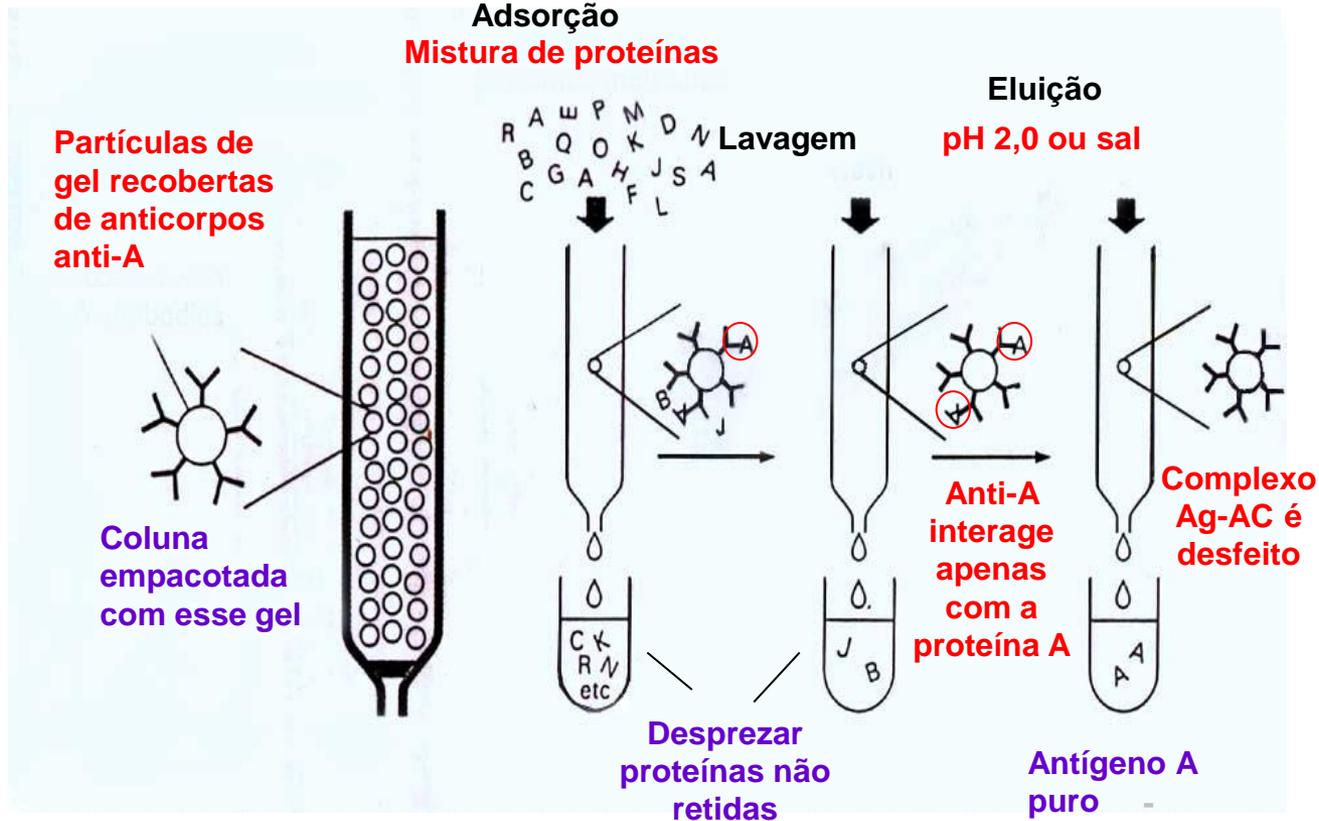
Carboximetil-celulose
(trocadora de cátions)



Dietilaminoetil-celulose
(trocadora de ânions)

Cromatografia de afinidade:

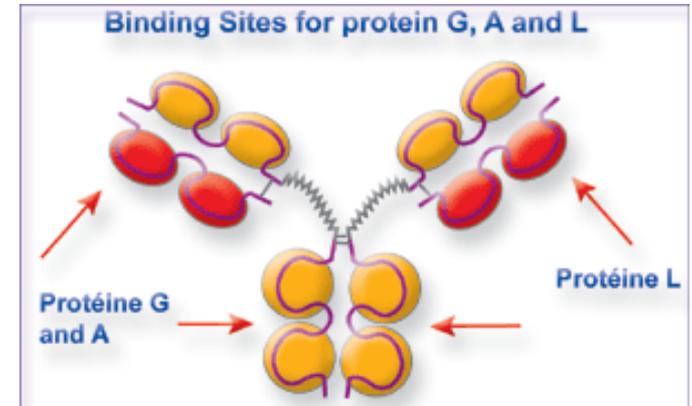
Ex: cromatografia de imunoafinidade



Eluição: condições que interferem na ligação da proteína ao ligante, como mudanças no pH e/ou força iônica, ou por competição com o ligante livre

Tipo de ligantes em cromatografia de afinidade

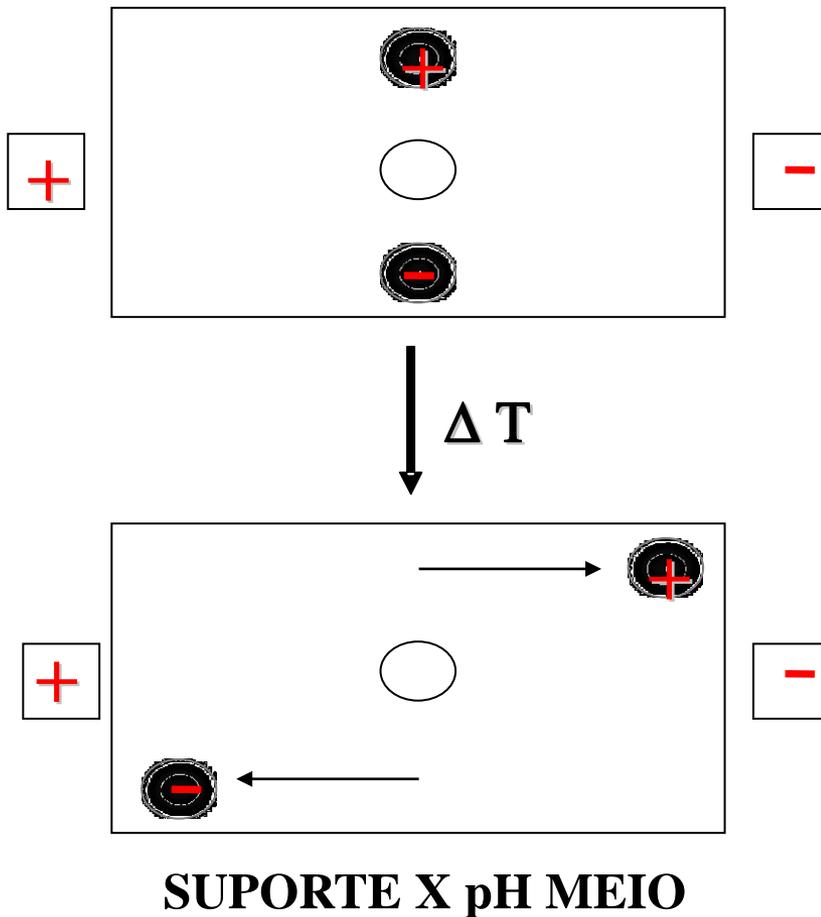
Ligante grupo-específico	Especificidade
Proteína A	Região Fc de IgG
Proteína G	Região Fc de IgG
Concanavalina A	Grupos glicosil- ou manosil-
Cibacron Blue	Várias enzimas, albumina
lisina	Plasminogênio, RNA ribossomal
arginina	proteínases tipo tripsina
benzamida	proteínases tipo tripsina
calmodulina	Proteínas reguladas por calmodulina
heparina	Fatores de coagulação, lipases, hormônios, receptores esteróides, etc
Metais de transição	Proteínas e peptídeos com resíduos de His expostos



Sítios de ligação das proteínas A, G e L à imunoglobulina, que permitem a purificação de anticorpos por cromatografia de afinidade

ELETROFORESE

CONDIÇÕES QUE DETERMINAM A SEPARAÇÃO



1. pH / tampão

2. Suporte

- papel : corrente alta (calor)
uso para peptídeos e aminoácidos

- poliacrilamida: proteínas

ac. nucleicos

↳ não desnaturante ou nativa

↳ desnaturante e redutor

peso molecular

composição de subunidades

↳ focalização isoeétrica: PI

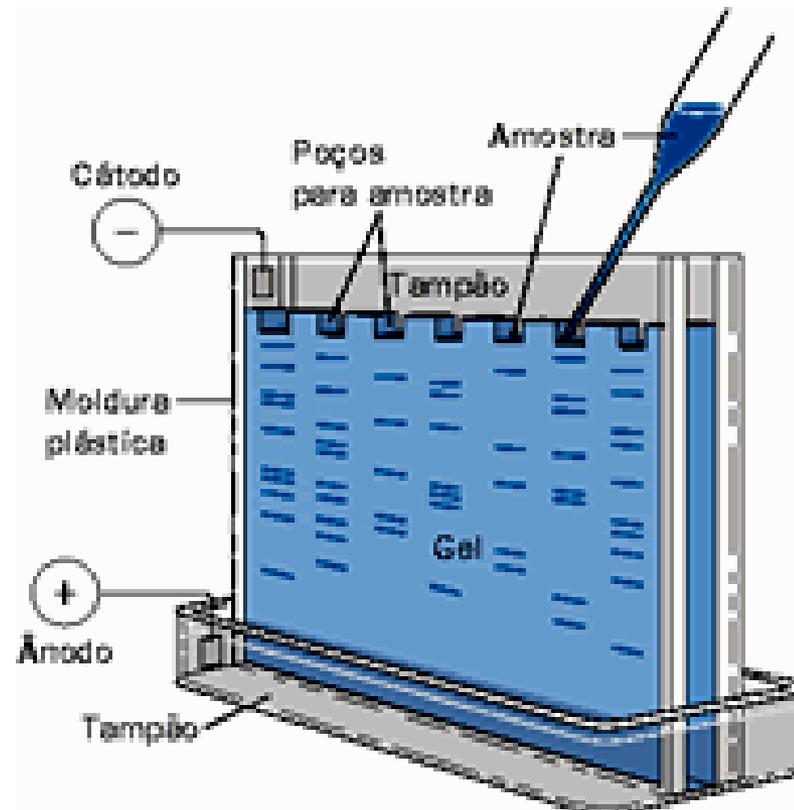
↳ bidimensional

- agarose: ácidos nucleicos

Imunoeletroforese

Proteínas nativas

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)



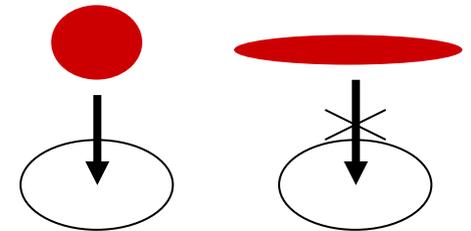
cuba vertical para mini-gel (10 X 8 cm)

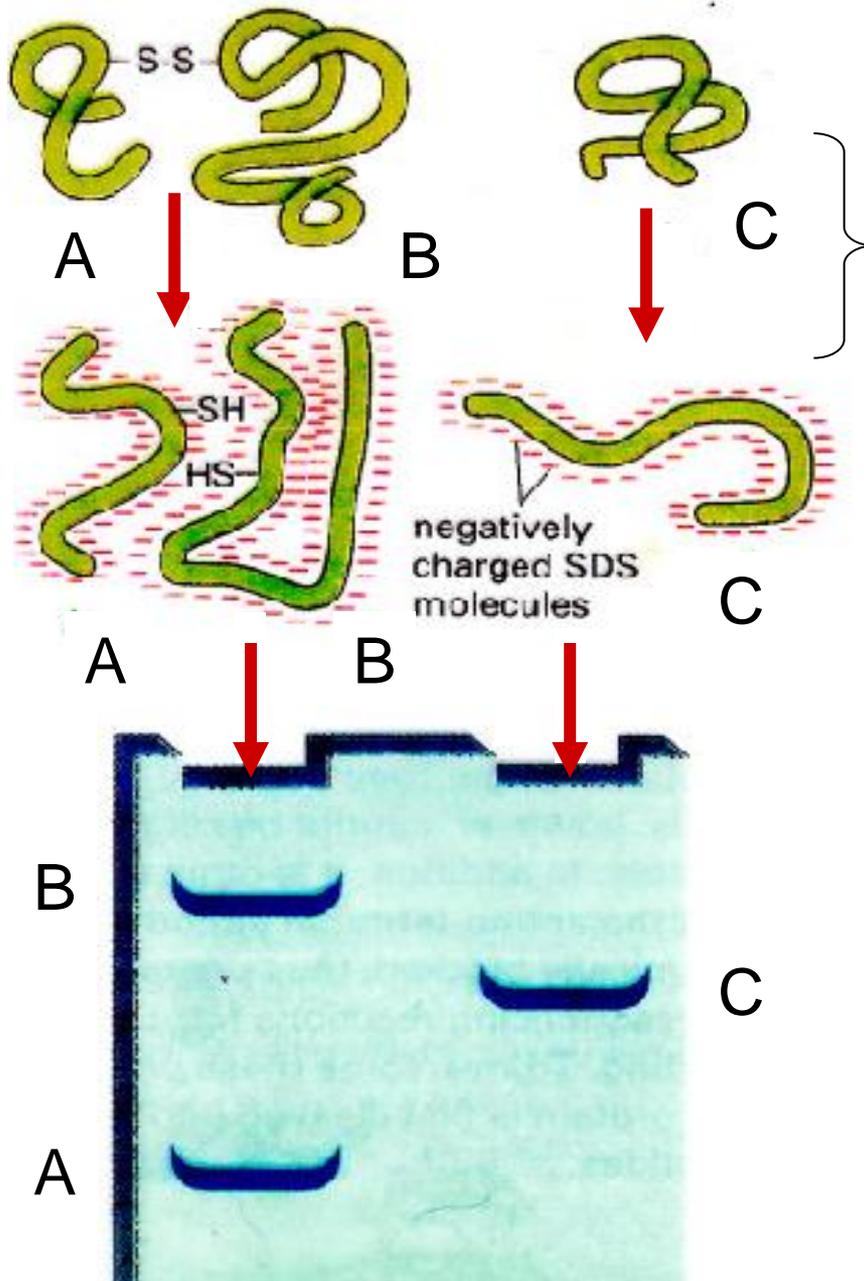
Proteína

Ponto Isoelétrico

Pepsina		< 1.0
Ovalbumina (galinha)		4.6
Albumina Sérica (humana)		4.9
Tropomiosina		5.1
Insulina (bovina)		5.4
Fibrinogênio (humano)		5.8
γ-Globulina	→ 155.000	6.6
Colágeno	→ 330.000	6.6
Mioglobina (cavalo)	→ 18.000	7.0
Hemoglobina (humana)	→ 64.000	7.1
Ribonuclease A (bovina)		7.8
Citocromoc(cavalo)		10.6
Histona (bovina)		10.8
Lisozima (galinha)		11.0
Salmina(salmon)		12.1

Separação na eletroforese nativa é influenciada pela carga, massa e forma da molécula





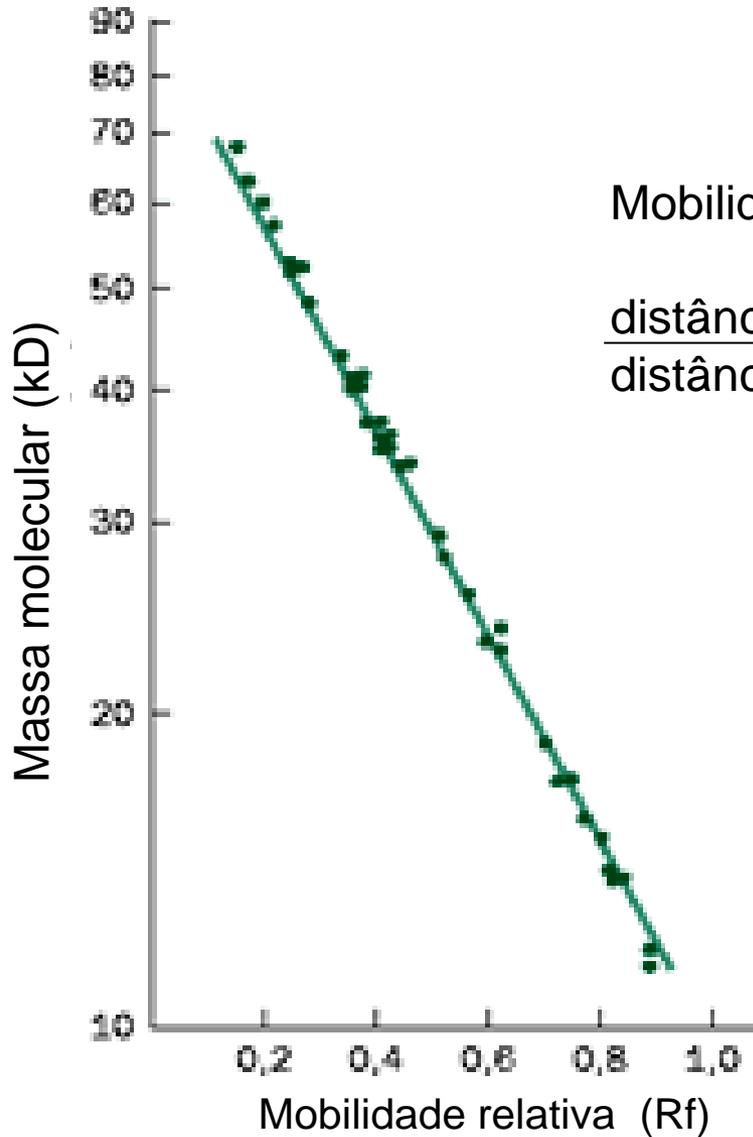
SDS (dodecil sulfato de sódio)
+
2-mercaptoetanol

Efeitos do SDS

- desnaturação uniformiza a forma das proteínas;
- mascara a carga natural das proteínas no pH da corrida, fazendo com que todas moléculas migrem para o anôdo;
- facilita o efeito de redutores

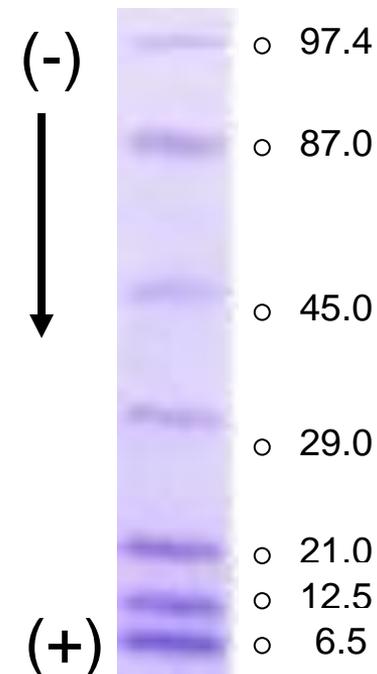
Determinação da massa molecular de proteínas

Curva de calibração de SDS-PAGE a 15%

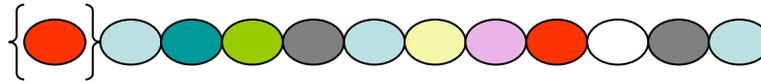
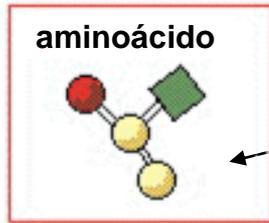


Mobilidade relativa =

$$\frac{\text{distância percorrida pela banda X}}{\text{distância percorrida pelo marcador da corrida}}$$



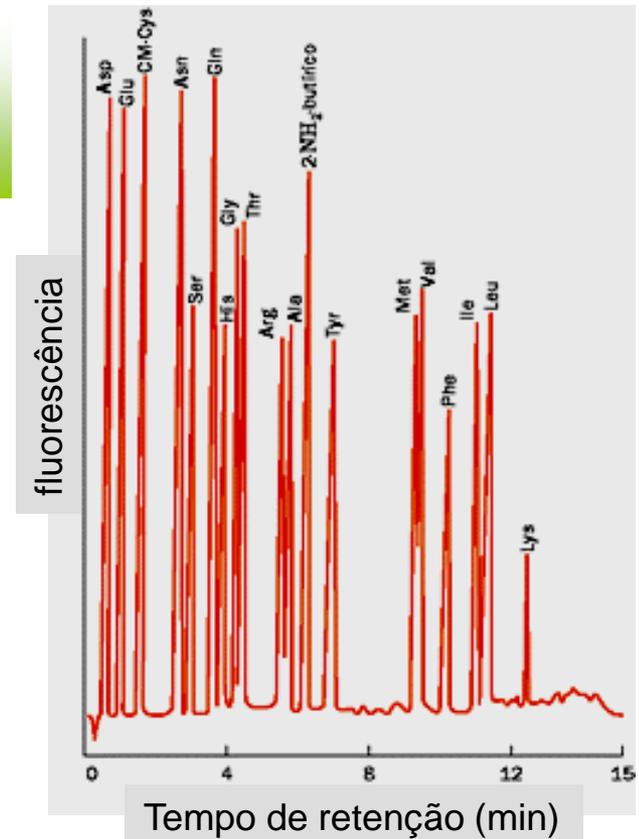
SEQUENCIAMENTO DE PROTEÍNAS



Para determinar a estrutura primária de uma proteína, é necessário primeiro conhecer a **composição** (número e tipos) de seus aminoácidos.

A proteína **pura** é tratada com HCl 6N fervente para quebrar (hidrólise) as ligações peptídicas.

A mistura resultante é submetida a métodos cromatográficos (fase reversa, troca iônica) para separar os diferentes aminoácidos.



Possível determinar o conteúdo de aminoácidos



Método de Edman - sequenciamento de proteínas com **PITC** (fenil-isotiocianato)

Cada ciclo de reação compreende 3 etapas:

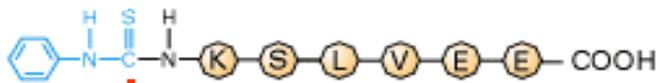
1. Reação da proteína com PITC, que se acopla ao grupo amino NH₂- livre do aminoácido 1 (no exemplo, uma lisina, K);
2. Hidrólise ácida da proteína conjugada com PITC libera a feniltiohidantoína (PTH) do aminoácido 1 e o restante da proteína, tornando o aminoácido 2 o novo resíduo N-terminal (no exemplo uma serina, S);
3. Análise cromatográfica do PTH-aminoácido e novo ciclo de reação com o novo N-terminal da proteína.

Sequenciadores automatizados fazem todas as etapas, com capacidade para realizar 30 ciclos por dia, a partir de 100-200 picomoles de proteína.

Libera aminoácido N-terminal

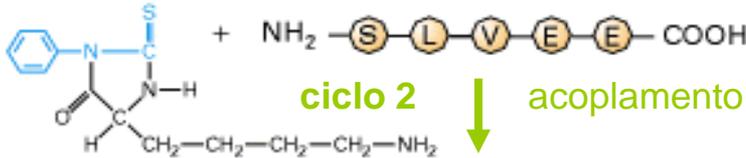


ciclo 1 (1) ↓ **acoplamento** ( PITC)

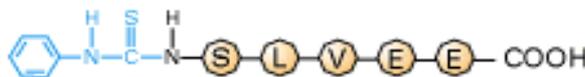


(2) ↓ **hidrólise com ácido trifluoroacético**

PTH lysine

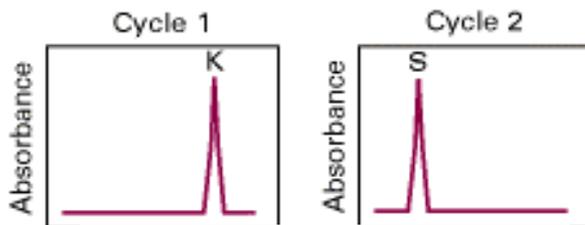
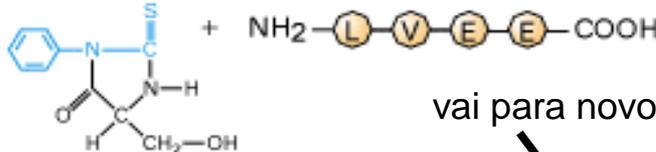


(3)



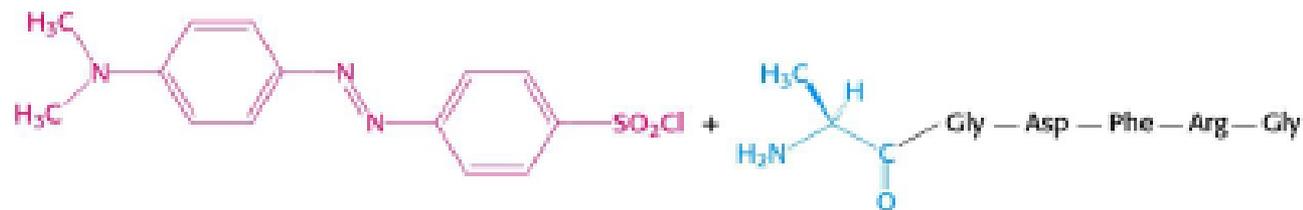
↓ **hidrólise ácida**

PTH serine



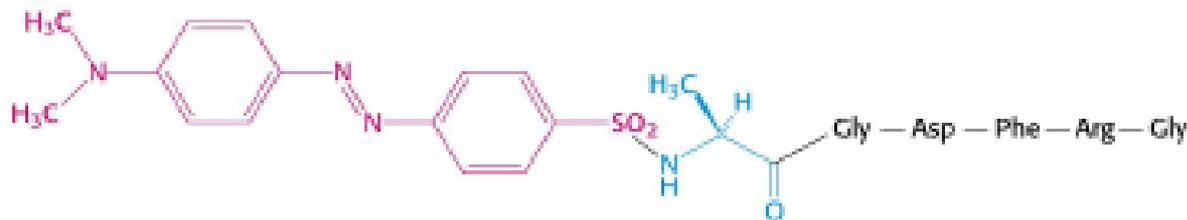
análise cromatográfica

Cloreto de Dansila pode ser usado para determinar o resíduo amino terminal de uma proteína ou peptídeo

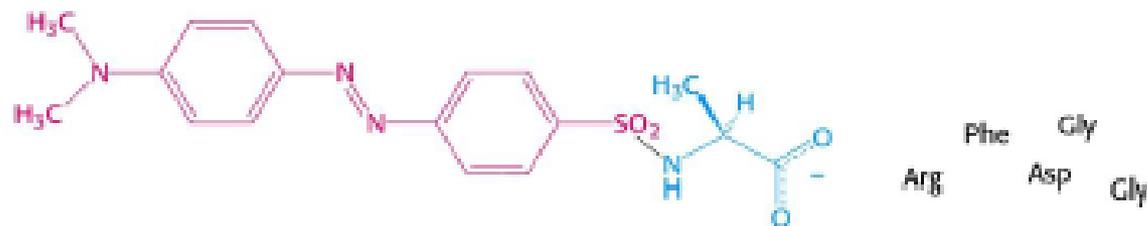


Dabsyl chloride

Labeling



Hydrolysis

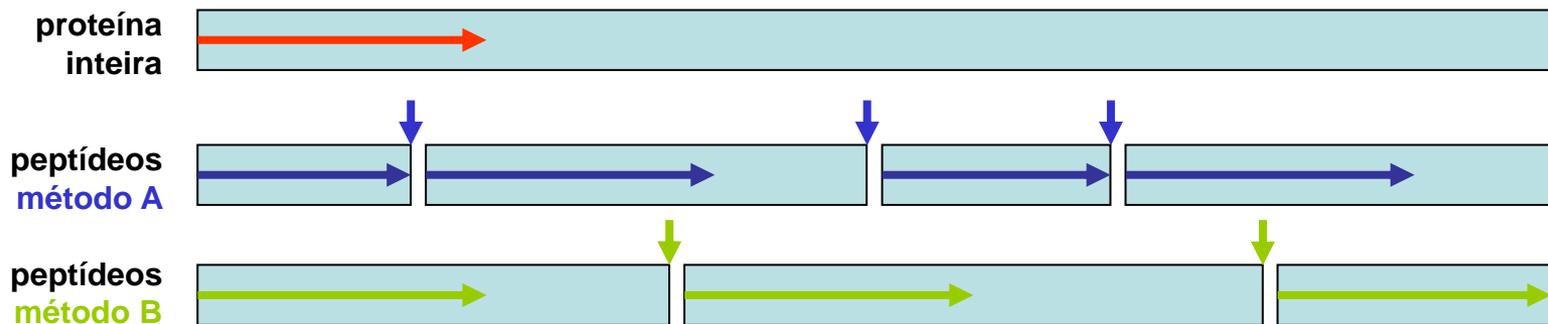


Dabsyl alanine

Quando uma proteína possui mais de 20-30 resíduos de aminoácidos, não é possível sequenciá-la diretamente pelo método de Edman.



Para obter a sequência completa de uma proteína, é necessário sequenciar vários peptídeos da mesma proteína, obtidos por diferentes tipos de quebra da cadeia, até haver sobreposição de suas sequências.



Diferentes métodos são utilizados para obter-se diferentes peptídeos da proteína: A) enzimas proteolíticas, como tripsina (quebra em resíduos de Lys ou Arg) e quimotripsina (quebra em resíduos de Phe); B) tratamento com brometo de cianogênio (quebra em Met); e outros.

Exopeptidases

Carboxipeptidase A - hidrólise de aromáticos e alifáticos de ácido amino terminal carboxila neutro. Por exemplo, tirosina, fenilalanina, alanina.

Carboxipeptidase B - hidrólise C-terminal: Lys ou Arg, exceto se o penúltimo aminoácido é Pro.

Endopeptidases:

Tripsina – hidrolise depois de Arg or Lys, exceto seguido por Pro.

Quimiotripsina – cliva depois de Phe, Trp, ou Tyr, exceto seguido por Pro.

Elastase – cliva depois de Ala, Gly, Ser ou Val, exceto seguido por Pro.

Termolisina – cliva antes de Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, ou Val, exceto precedido de Pro.

Pepsina – cliva antes de Leu, Phe, Trp ou Tyr, exceto precedido de Pro.

Endopeptidase V8 – cliva depois de Glu