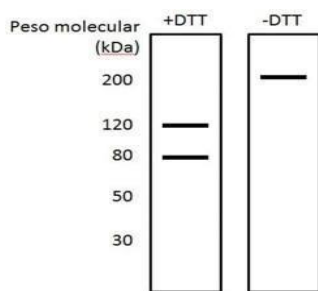


## G2 - Provinha 2 - Gabarito

- 1) Discuta a seguinte afirmação: a estrutura primária de uma proteína explica a sua estrutura terciária

A estrutura primária de uma proteína, que é a sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, é um fator crítico para a determinação da sua estrutura tridimensional, ou estrutura terciária. As propriedades químicas únicas de cada aminoácido e as interações entre os grupos laterais desses aminoácidos ao longo da sequência primária desempenham um papel fundamental no dobramento da proteína e na formação das ligações que mantêm sua estrutura tridimensional. No entanto, a estrutura terciária também é influenciada por outros fatores, como temperatura, pH e interações com íons metálicos, tornando-a um processo complexo e multifatorial. Além disso, a função da proteína não é determinada apenas pela sua estrutura tridimensional, mas também pela sua estrutura quaternária (em proteínas com 2 ou mais subunidades) e pelas interações com ligantes específicos, exigindo uma compreensão abrangente de todas essas dimensões para uma descrição completa da proteína.

- 2) A figura abaixo mostra o resultado de dois SDS-PAGE no qual foram adicionadas amostras de uma proteína purificada. Em um SDS-PAGE foi adicionado DTT, um agente redutor, no outro, o DTT não foi adicionado. Explique o resultado sob a perspectiva da estrutura da proteína.



O resultado dos dois SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com e sem a adição de DTT (ditiotreitól), um agente redutor, fornece informações importantes sobre a estrutura da proteína.

**SDS-PAGE sem DTT:** O SDS (dodecil sulfato de sódio) é usado para desnaturar a proteína, desenrolando suas estruturas secundárias e terciárias. Sem DTT, as pontes dissulfeto presentes na proteína não são quebradas. As pontes dissulfeto (pontes de enxofre) são ligações covalentes entre grupos sulfidrilas (-SH) de cisteínas adjacentes na estrutura da proteína. Como resultado, a proteína mantém suas pontes dissulfeto. No gel, essa proteína permanece com uma única banda, indicando que suas pontes dissulfeto estão intactas.

**SDS-PAGE com DTT:** O DTT é um agente redutor que quebra as pontes dissulfeto presentes na proteína. Quando as pontes dissulfeto são quebradas pelo DTT, as subunidades da proteína podem se separar umas das outras. No gel, a proteína aparece como duas bandas, indicando que a proteína foi desmontada em duas subunidades individuais. A interpretação desses resultados sob a perspectiva da estrutura da proteína sugere que a presença das duas bandas

no gel com a adição de DTT consiste em duas subunidades de estrutura terciária unidas por pontes dissulfeto formando uma estrutura quaternária. A quebra dessas pontes dissulfeto pelo DTT separa as subunidades, resultando em duas bandas cuja soma das massa é igual da banda sem DTT..

3) Discuta a diferença entre estruturas secundárias, domínios e motivos.

As estruturas secundárias referem-se ao enovelamento da estrutura primária em uma cadeia polipeptídica, como hélices alfa e folhas beta. Domínios são regiões tridimensionais independentes de uma proteína que desempenham uma função específica e podem conter várias estruturas secundárias. Motivos são padrões estruturais menores dentro de uma proteína que podem se repetir em várias proteínas e contribuir para funções específicas, muitas vezes associadas a interações com outras moléculas. Em resumo, estruturas secundárias são formadas pela interação entre as ligações peptídicas, domínios são regiões funcionais maiores e motivos são padrões estruturais menores em proteínas.

4) Utilizando-se um gel bidimensional, determinou-se que uma amostra com quatro proteínas possui as características resumidas na tabela abaixo:

a) O que é o pI de uma proteína? Como este parâmetro pode ajudar no planejamento da separação de proteínas?

O pI (ponto isoelétrico) de uma proteína é o pH no qual a proteína possui carga líquida zero, ou seja, não é nem positivamente nem negativamente carregada. O pI é importante no planejamento da separação de proteínas, pois indica em que pH as proteínas se moverão mais lentamente ou mais rapidamente em um campo elétrico, como em uma eletroforese bidimensional. O pI ajuda a determinar as condições ideais de pH para separar as proteínas com base em suas cargas, uma vez que proteínas migrarão para os polos de acordo com sua carga relativa em relação ao pH da solução.

b) Em uma cromatografia de exclusão de tamanho (também conhecida como cromatografia de filtração por gel), qual das proteínas sairia primeiro? Justifique.

Na cromatografia de exclusão de tamanho, as proteínas são separadas com base em seus tamanhos moleculares, com proteínas maiores sendo eluídas primeiro, pois não penetram nos poros da resina de gel e, portanto, passam rapidamente pela coluna. Com base nas informações fornecidas, a proteína A com um tamanho molecular (M) de 300 KDa seria a primeira a ser eluída, seguida pela proteína D (200 KDa), depois pelas proteínas B (120 KDa) e C (120 KDa).

c) Utilizando-se as informações da tabela acima, proponha uma série de separações de proteínas que te permita ter as quatro proteínas separadas. Dê o máximo de detalhes possível (não se preocupe com o nome da resina, mas sim com suas características principais, o mesmo vale para tampões).

Para separar as quatro proteínas, você pode realizar uma série de etapas de purificação:

**Eletroforese bidimensional:** Primeiro, faça uma eletroforese bidimensional com um gradiente de pH em uma dimensão (por exemplo, pH 3-10) e em outra dimensão de acordo com o tamanho molecular (por exemplo, SDS-PAGE). Isso separará as proteínas com base em seus pIs e tamanhos moleculares.

**Cromatografia de exclusão de tamanho:** Colete as frações correspondentes a cada proteína da eletroforese bidimensional e aplique-as individualmente a uma coluna de cromatografia de exclusão de tamanho (filtração por gel). Isso permitirá a separação das proteínas com base em seus tamanhos moleculares, eluindo-as na ordem: A, D, B e C.

**Cromatografia de troca iônica:** Se necessário, faça uma cromatografia de troca iônica usando uma coluna de troca iônica com um gradiente de sal. Isso ajudará a separar a proteína B da proteína C, já que elas têm pIs diferentes.

Com essas etapas, você pode obter as quatro proteínas separadas com sucesso. Certifique-se de ajustar as condições de cada etapa de acordo com as propriedades das proteínas, como pI e tamanho molecular.

	pI	M (kDa)
Proteína A	4.0	300
Proteína B	4.0	120
Proteína C	7.0	120
Proteína D	9.0	200