

Gabarito dos Exercícios do Módulo 5

1) Distinga estrutura secundária e terciária de uma proteína. Dê exemplos.

O termo “estrutura secundária” se refere ao arranjo espacial local dos principais átomos – ou resíduos de aminoácidos adjacentes – de um dado seguimento da cadeia polipeptídica sem, no entanto, considerar os seus posicionamentos e interatividades em relação às cadeias laterais. Uma estrutura secundária regular ocorre quando cada ângulo diédrico permanece aproximadamente o mesmo dentro de todo segmento estabelecido. Exemplos de estruturas secundárias incluem a α -hélice e a folha β pregueada. Ligações de hidrogênio são importantes para a manutenção das estruturas secundárias (ex.: C=O e N-H).

A estrutura terciária, por sua vez, se refere ao arranjo tri-dimensional global de todos os átomos de uma proteína. A estrutura terciária inclui aspectos de longa distância, tais como as interações entre os segmentos da cadeia polipeptídica, os quais podem, ou não, apresentar distintas estruturas secundárias. As interações são mantidas por meio de interações fracas (ex.: interações de van der Waals, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio) ou até mesmo ligações covalentes, tal como ocorre nos “*disulfide cross-links*” (ligação dissulfeto). Em resumo, a estrutura terciária se refere ao enovelamento (*fold*) completo de uma proteína. Exemplos de estruturas terciárias incluem proteínas globulares e proteínas fibrosas.

2) Descreva α -hélice e folha β pregueada. Aponte as diferenças essenciais entre estas formas de estruturas secundárias encontradas em peptídeos.

A α -hélice é uma estrutura secundária regular que se repete a cada 5.15-5.2 angstrom. Um angstrom é igual a 0.1 nm. Esta medida é utilizada na medida das distâncias atômicas. Um angstrom é aproximadamente o comprimento de uma ligação C-H típica. A medida de 5.4 angstrom se refere a 3.6 resíduos de aminoácidos. Nesta estrutura, a cadeia polipeptídica é firmemente enrolada em torno de um eixo imaginário desenhado longitudinalmente através do meio da hélice, e os grupos R dos resíduos de aminoácidos se projetam para fora da estrutura helicoidal. A unidade de repetição é uma única volta da hélice, que se estende por cerca de 5,4 angstroms. Os átomos do esqueleto polipeptídico referentes aos aminoácidos da α -hélice prototípica têm um conjunto característico de ângulos diédricos que definem a conformação da hélice α . A α -hélice mantém sua conformação por meio das ligações de hidrogênio. A estabilização ocorre por meio das ligações de hidrogênio entre os grupos NH e CO da cadeia principal. O grupo CO de cada aminoácido forma uma ligação de hidrogênio com o grupo NH do aminoácido que está situado a quatro unidades adiante na sequência linear, no sentido amino-terminal. Além disso, no centro da α -hélice ocorrem as interações de van der Waals que determinam o raio interno da α -hélice. O sentido de giro de uma α -hélice pode ser para a direita (hélice dextrorsa) ou para a esquerda (hélice sinistrorsa). As α -hélices encontradas em proteínas são dextrorsas. Exemplo de α -hélice: α -keratin.

A estrutura secundária folha β pregueada, por sua vez, é uma estrutura mais extensa de conformação da cadeia polipeptídica. Da mesma forma que para a α -hélice, as folhas, ou conformações, β são definidas segundo um determinado conjunto de ângulos diédricos. Na

conformação β , o esqueleto da cadeia polipeptídica se estende num formato de “zig-zag”, ao invés de uma estrutura helicoidal. O arranjo de vários segmentos, lado a lado, os quais todos estão nas conformações β , é denominado folha β . Na folha β , as ligações de hidrogênio se formam entre segmentos polipeptídicos adjacentes. Os grupos R dos aminoácidos adjacentes se protuberam (*protrude*) em posições opostas a partir da folha β de modo a realizar um padrão alternado, ou seja, um “zig-zag”. Em uma folha β , as cadeias polipeptídicas adjacentes podem ser paralelas ou antiparalelas (tendo orientações amino a carboxila iguais ou opostas, respectivamente). Elas apresentam diferentes padrões de formação das ligações de hidrogênio. As ligações de hidrogênio intercadeia são essencialmente em linha nas folhas β antiparalelas, e distorcidas nas folhas β paralelas.

3) Discuta os dois diagramas de Ramachandran apresentados na Figura 6 e relacione-os com as estruturas apresentadas nas Figuras 7 e 8.

Os diagramas de Ramachandran apresentados na Figura 6 se referem aos ângulos diedros phi e psi de uma proteína. O gráfico da esquerda se refere às estruturas secundárias correspondentes às combinações estereo-químicas permitidas para ângulos phi e psi. O gráfico da direita representa (ponto) os ângulos observados a partir de proteínas submetidas à cristalografia.

As Figuras 7 e 8 representam as estruturas secundárias alpha-hélice e folha β -pregueada. Estas estruturas podem ser determinadas a partir das análises dos diagramas de Ramachandra; sendo, então, observadas em regiões distintas relativas às intersecções no plano cartesiano que se referem aos valores de phi e psi previsto nos eixos x e y, respectivamente.

4) Descreva a experiência clássica de Anfinsen com a enzima ribonuclease A, indicando sua conclusão principal.

Qual o papel das pontes de dissulfeto na manutenção da estrutura nativa (terciária) da ribonuclease?

Conceitue estrutura nativa e desnaturação de proteínas, mostrando o que isso tem a ver com a atividade enzimática da ribonuclease A.

Que função termodinâmica promove espontaneamente a transição da ribonuclease desnaturada para nativa?

A experiência de Anfinsen com a enzima ribonuclease A concluiu que a sequência dos aminoácidos determina a estrutura tridimensional da proteína. Anfinsen investigou a natureza do processo que controla o enovelamento das cadeias polipeptídicas para as estruturas tri-dimensionais únicas das proteínas. Ele notou por meio da reação de desnaturação redutiva da ribonuclease A em uma solução de ureia 8mM contendo 2-mercaptoetanol. A conversão da forma estendida (desnaturada) para a “*randomly cross-linked*”. A redução dos grupos sulfidríla responsáveis pela formação das ligações dissulfeto resulta na desnaturação da proteína ribonuclease A.

A ribonuclease A purificada se desnatura completamente em uma solução concentrada de ureia contendo um agente redutor. O agente redutor cliva as quatro ligações dissulfeto,

produzindo oito resíduos cisteína (Cys); e a ureia interrompe o efeito hidrofóbico estabilizador, liberando assim todo o polipeptídeo de sua conformação enovelada. A desnaturação da ribonuclease é acompanhada por uma perda completa da atividade catalítica. Quando a uréia e o agente redutor são removidos, a ribonuclease desnaturada se enovela aleatoriamente, e se re-enovela espontaneamente em sua estrutura terciária correta, restaurando completamente sua atividade catalítica. O enovelamento refaz as quatro ligações dissulfeto intercadeia nas mesmas posições observadas na conformação nativa da ribonuclease A. As ligações dissulfeto determinam a estrutura terciária da conformação nativa da ribonuclease A.

As ligações dissulfeto determinam a estrutura terciária da conformação nativa da ribonuclease A. A conformação nativa de uma proteína denomina a estrutura tridimensional na qual a molécula é biologicamente ativa e apresenta propriedades biológicas naturais. A desnaturação da proteína é, portanto, a perda da estrutura tridimensional relativa à conformação nativa da proteína. Consequentemente, a desnaturação da proteína resulta em perda da função. As ligações dissulfeto são ligações covalentes formadas entre dois aminoácidos cisteína em uma proteína, as quais ajudam a manter as cadeias polipeptídicas da proteína unidas em um arranjo espacial específico.

Anfinsen formula a “hipótese termodinâmica”, a qual afirma que a estrutura tridimensional de uma proteína nativa em meio fisiológico é aquela que possui o menor valor de energia livre de Gibbs (ΔG). A conformação nativa de uma proteína é determinada por meio da totalidade das interações inter-atômicas; e, portanto, depende da sequência de aminoácidos e do ambiente. Assim, a função termodinâmica que promove a transição espontânea da ribonuclease A desnaturada para a conformação nativa é a da energia livre de Gibbs.

5.) Duas proteínas, apesar de terem diferenças quanto a alguns de seus aminoácidos, são capazes desempenhar a mesma função. Explique como isto é possível.

Duas proteínas que apresentam diferenças quanto a alguns de seus aminoácidos podem desempenhar a mesma função, pois, embora diferentes, alguns aminoácidos apresentam propriedades estruturais e bioquímicas similares. As relações entre estrutura, função e sequência de aminoácidos das proteínas revelam os processos evolutivos de divergência e convergência. Uma hipótese é que existe um pequeno número de estruturas terciárias de conformações preferenciais, as quais dependem da quiralidade invariante das estruturas super-secundárias dentre todas as possibilidades conformacionais das estruturas proteicas. A convergência de função das proteínas, na ausência de homologia das sequências de aminoácidos, deve ser analisada em termos da química e de suas relações adaptativas com o ambiente, ao invés de compará-las apenas em termos da estrutura

6.) Pesquisar informações sobre a estrutura de hemoglobina. Descrever a sua estrutura terciária e quaternária.

Descrever as mudanças na estrutura quaternária que acontecem devido à ligação de oxigênio.

.

A hemoglobina é uma proteína tetramérica formada por quatro unidades de globinas. As globinas são polipeptídeo típicos constituídos por oito segmentos de α -hélice conectado por meio das estruturas secundárias denominadas “*bends*”. A hemoglobina é aproximadamente esférica. Por ser uma proteína tetramérica, a hemoglobina contém quatro grupos prostéticos heme, cada um associado a uma das cadeias polipeptídicas. A hemoglobina de adultos contém dois tipos de globinas, duas α (141 resíduos) e duas β (146 resíduos). Apesar de um pouco menos da metade dos aminoácidos sejam idênticos na sequência polipeptídica, as estruturas tri-dimensionais são similares – sendo também estruturalmente similares à mioglobina, a qual, no entanto, apresenta apenas 27 posições idênticas em sua sequência de aminoácidos. A estrutura quaternária da hemoglobina é mantida por interações fortes intercadeia. As interações hidrofóbicas desempenham um papel predominante; entretanto, também existem várias ligações de hidrogênio, e alguns poucos pares iônicos.

A hemoglobina altera sua afinidade de ligação ao oxigênio por meio do mecanismo de cooperatividade. Isto se deve à transição do estado de baixa-afinidade (estado T) para o estado de alta-afinidade (estado R) quando mais moléculas de oxigênio se ligam à hemoglobina. A ligação de uma molécula de oxigênio a uma das subunidades da hemoglobina afeta a afinidade de ligação do oxigênio às demais subunidades. Quando o oxigênio se liga à desoxi-hemoglobina, esta transita do estado T para o estado R. A transição do estado T para R ocorre de modo facilitado conforme mais moléculas se ligam à hemoglobina. Desta forma, a ligação do oxigênio à hemoglobina estabiliza o estado de maior afinidade (R) em detrimento daquele de menor afinidade (T). Este mecanismo reflete o comportamento de uma proteína alostérica. Assim, a ligação de uma molécula de oxigênio a uma das subunidades da hemoglobina altera alostericamente a conformação tridimensional das demais subunidades.

7) O que é efeito hidrofóbico e qual o seu papel na manutenção da estrutura terciária das proteínas? Qual o fator preponderante no efeito hidrofóbico: o entálpico ou o entrópico? Explique qualitativamente sua resposta.

O efeito hidrofóbico trata-se da propriedade das moléculas hidrofóbicas evitarem o contato com a água se organizando em regiões hidrofóbicas. Estas regiões não-polares se aglomeram a fim de apresentarem a menor fração possível à superfície do solvente polar (hidrofílico), enquanto as regiões polares se organizam de forma a maximizarem as interações com o solvente polar. Este efeito é importante na manutenção das estruturas terciárias das proteínas, pois preservam seus núcleos hidrofóbicos – agregação das regiões não-polares. Este efeito permite estabilizar a estrutura tri-dimensional das proteínas.

O fator preponderante no efeito hidrofóbico é o entrópico. A adição de um soluto hidrofóbico à água resulta em um pequeno ganho de entalpia, pois a quebra das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água promove uma absorção de energia pelo sistema, o que requer a entrada de energia advinda do meio circundante. Desta forma, a dissolução de um soluto hidrofóbico em água resulta na diminuição da entropia. Isto pois, moléculas de água dispostas nas vizinhanças dos solutos hidrofóbicos restringem suas possíveis orientações devido à exigência de se organizarem ao redor do soluto hidrofóbico. Ou seja, o ordenamento das moléculas de água reduz a entropia. Portanto, a magnitude da entropia diminui de modo proporcional à área superficial do soluto hidrofóbico circundado pelas moléculas de água.

8) Mostre porque uréia desorganiza a α -hélice.

A ureia é um solvente orgânico que pode ser utilizado como agente desnaturante, o qual promove a destruição da estrutura nativa das proteínas. O mecanismo de desnaturação das proteínas na presença de ureia se fundamenta na propriedade da ureia de desestabilizar as interações hidrofóbicas presentes no núcleo das proteínas globulares. As interações entre as moléculas de ureia e os grupos constituintes das proteínas são mais favoráveis do que as interações entre estes grupos e as moléculas de água. As interações entre as moléculas ureia e as proteínas demonstram a dependência da energia livre de enovelamento, sendo esta relação linear, ao menos em altas concentrações do agente desnaturante, onde a transição (desnaturação ou perda da estabilidade conformacional da proteína) ocorre. A relação entre energia livre e concentração de agente desnaturante pode ser observada a partir do intercepto (concentração zero de agente desnaturante proporcional à energia livre) e da inclinação da reta (*slope*). A ureia interage de modo mais favorável com grupos aromáticos, quando comparado com outros grupos. Deste modo, a ureia aumenta a solubilidade dos grupos aromáticos e, portanto, a acessibilidade destes grupos às moléculas de água. A solubilização contribui para a desnaturação. Além disso, a ureia diminui as forças de van der Waals, as quais determinam o raio interno da α -hélice; e pode afetar as α -hélice por meio da redução das possibilidades (mesmo que baixas) dos grupos de um polipeptídeo cooperarem (cooperatividade) no estabelecimento da conformação nativa da proteína.