

Purificação de Proteínas

Funções das proteínas

- **Catálise:**
 - Hexoquinase (via glicolítica), DNA polimerase (replicação de DNA)
- **Transporte:**
 - hemoglobina (O_2), lactose permease (lactose através da membrana)
- **Estrutura:**
 - colágeno (tecido conectivo), queratina (cabelos, unhas, penas, cornos)
- **Motilidade:**
 - miosina e actina (músculo), flagelos de bactérias
- **Transdução de sinal e regulação:**
 - Hormônios, receptores, quinases, fatores de transcrição

• ...

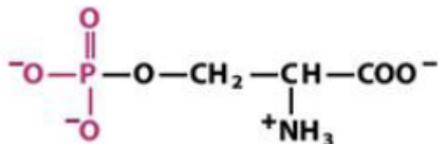
Proteínas podem ser conjugadas a outras moléculas

TABLE 3-4		Conjugated Proteins
Class	Grupos prostéticos	Example
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase
Metalloproteins	Iron	Ferritin
	Zinc	Alcohol dehydrogenase
	Calcium	Calmodulin
	Molybdenum	Dinitrogenase
	Copper	Plastocyanin

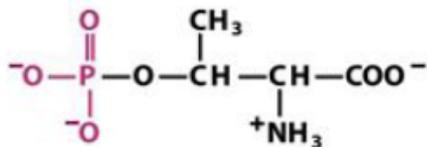
Table 3-4
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W.H. Freeman and Company

Aminoácidos podem sofrer modificação pós-tradução

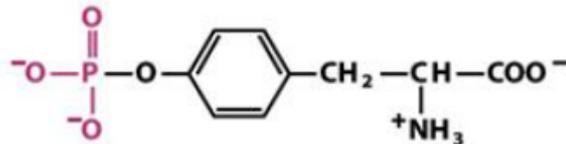
Exemplos:



Phosphoserine

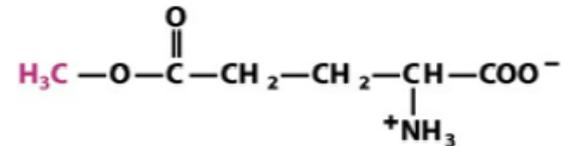


Phosphothreonine

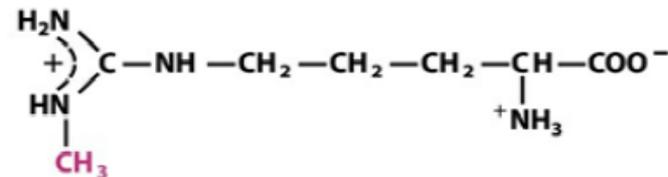


Phosphotyrosine

fosforilação

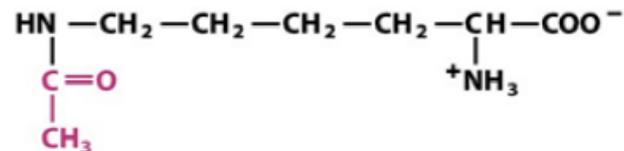


Glutamate methyl ester



σ -N-Methylarginine

metilação



6-N-Acetyllysine

acetilação

Proteínas podem ser separadas por suas propriedades físico-químicas

- **Carga** (eletroforese isoelétrica, cromatografia de troca iônica)
- **Tamanho (peso molecular)** (eletroforese, cromatografia de exclusão por tamanho)
- **Afinidade por um ligante** (cromatografia de afinidade)
- **Solubilidade** (precipitação por sulfato de amônia+centrifugação)
- **Hidrofobicidade** (cromatografia de hidrofobicidade)
- **Estabilidade térmica** (choque térmica+centrifugação)

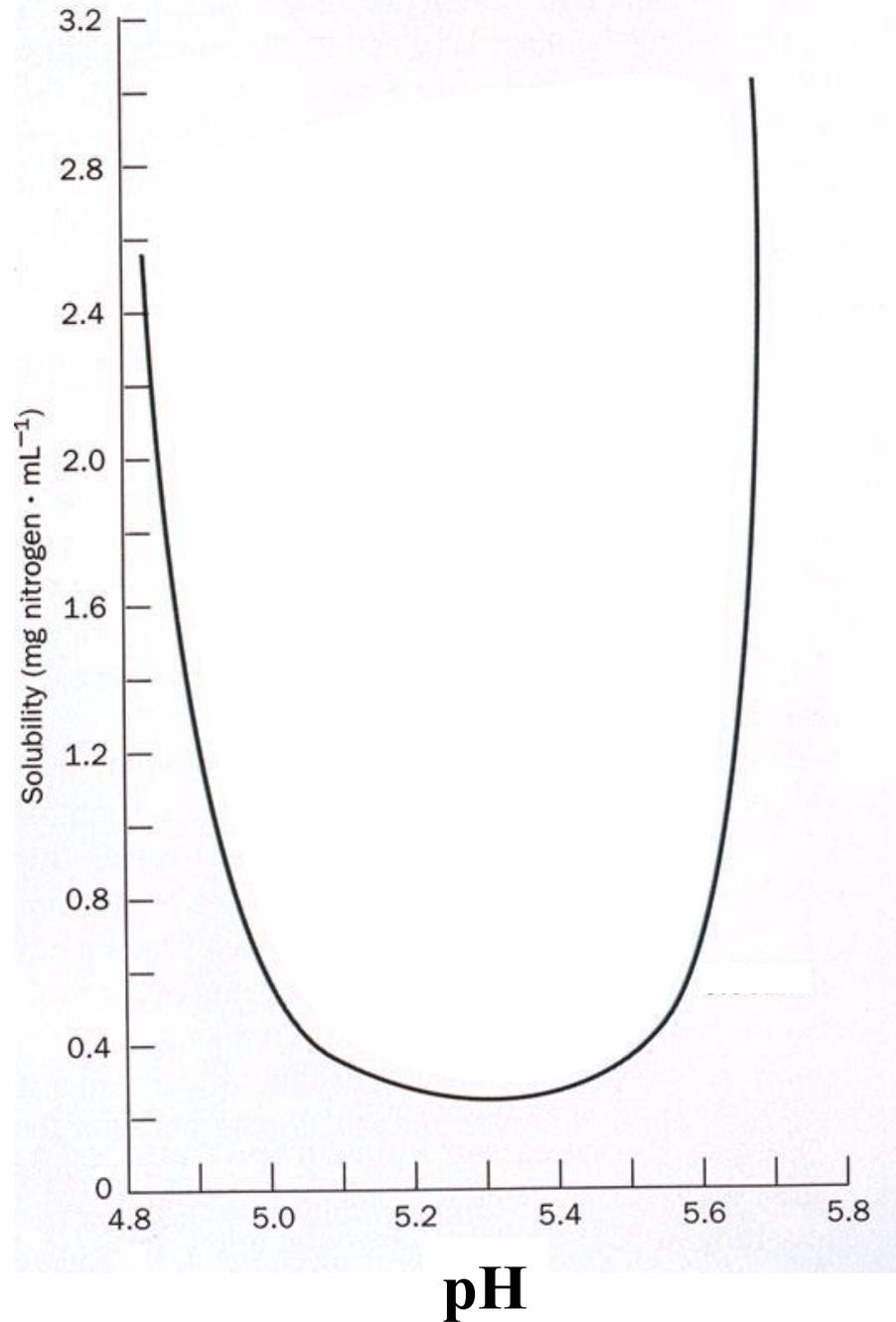
Ponto isoelétrico de uma molécula (ie aminoácido, proteína)
é o pH no qual a sua carga líquida é zero

Ponto isoelétrico de algumas proteínas

Protein	pI
Pepsin	~1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome <i>c</i>	10.7
Lysozyme	11.0

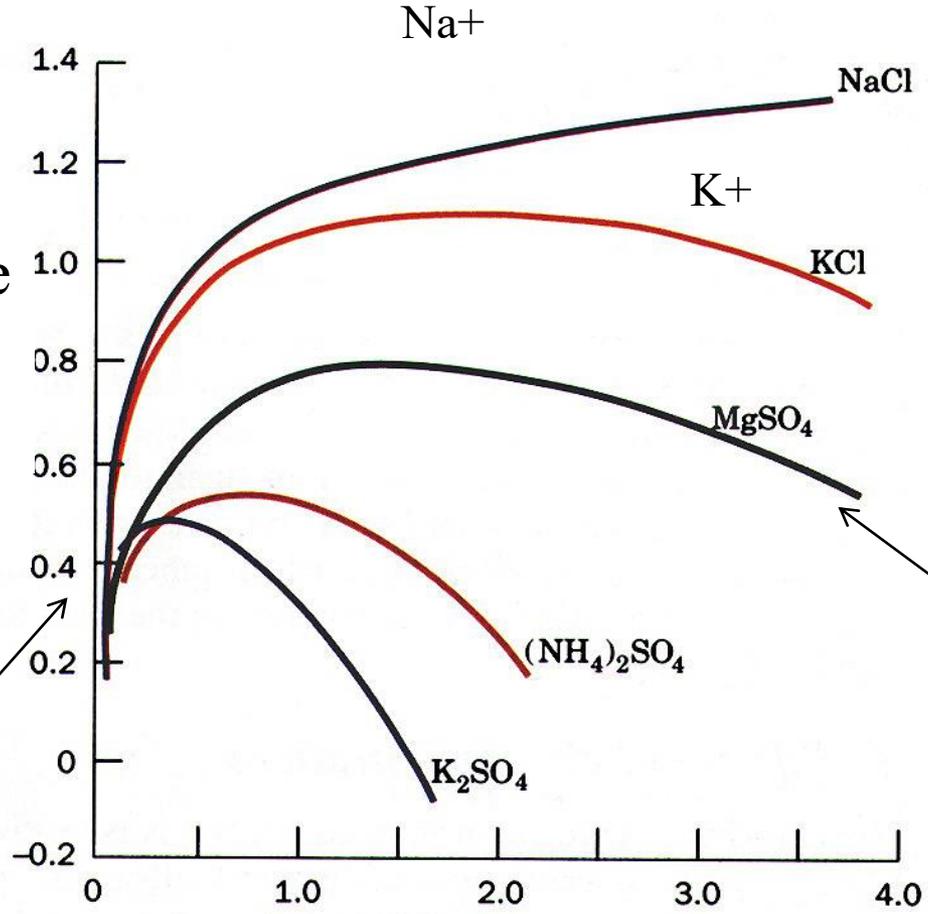
Solubilidade é dependente do pH

Menos solúvel quando $\text{pH} = \text{pI}$



A solubilidade de uma proteína é dependente da “força iônica” da solução

Log solubilidade da proteína (g/L)



Em baixa força iônica as repulsões eletrostáticas entre grupos carregados deestabilizam a proteína, expondo grupos hidrofóbicos, resultando em agregação e precipitação. “Salting in”

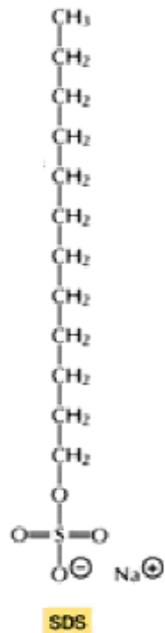
Em alta força iônica os grupos carregados na superfície da proteína são blindados por contra-ions, neutralizando a carga líquida da partícula. Isso facilita agregação e precipitação. “Salting out”

Força iônica da solução (mol/L)

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

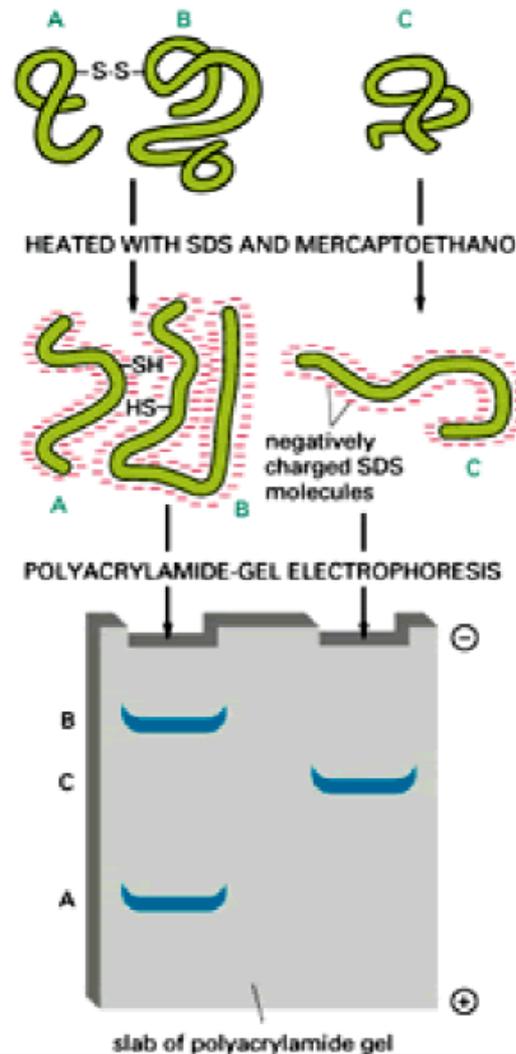
C = concentração do íon
Z = carga do íon

Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

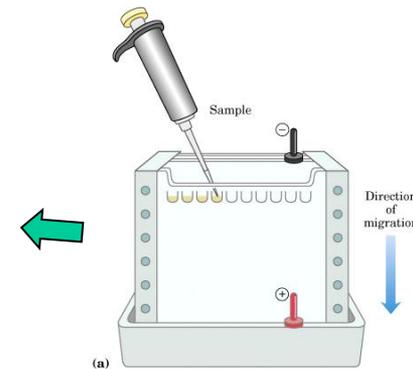


dodecil-sulfato de sódio (detergente)

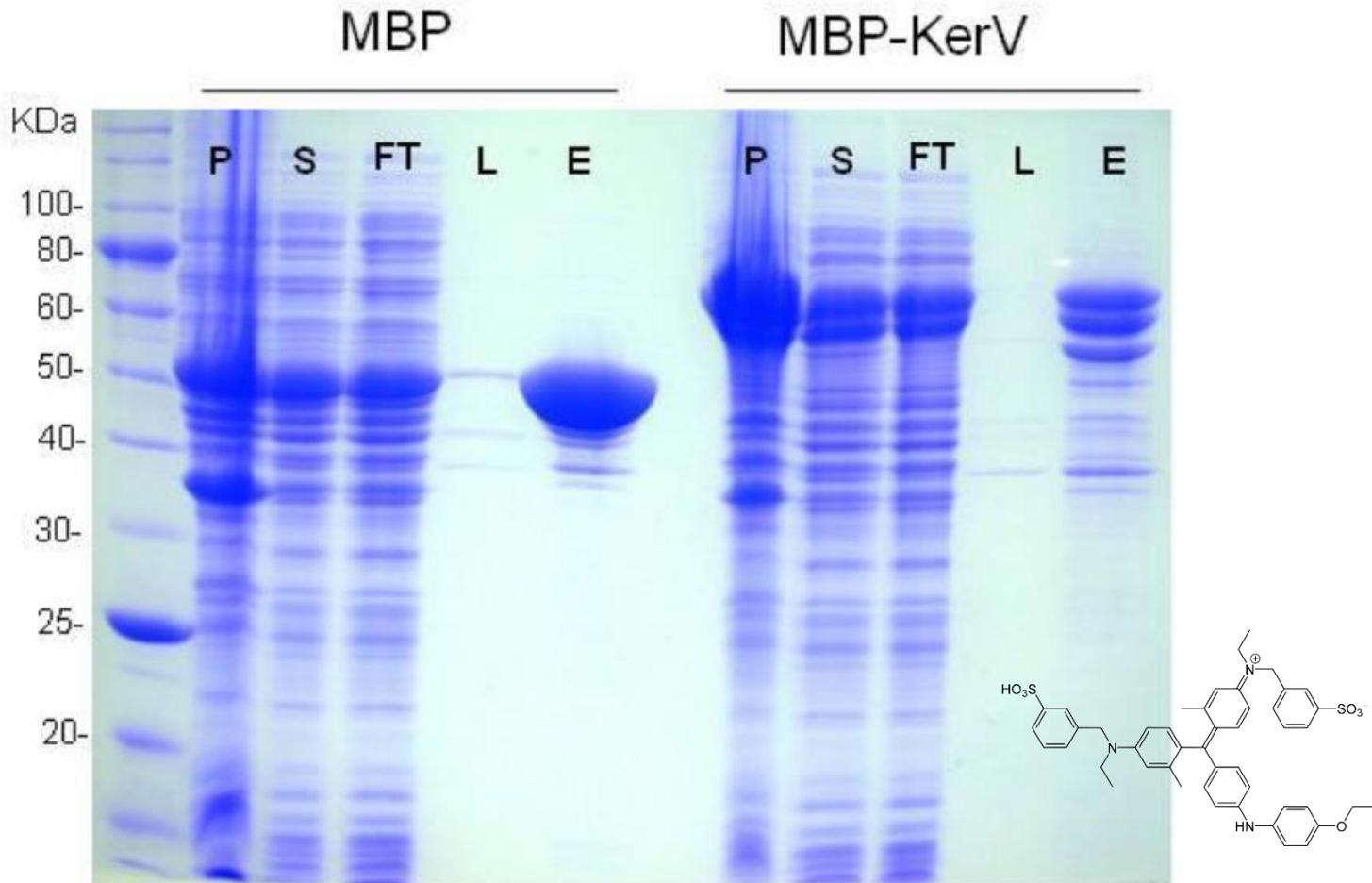
SDS



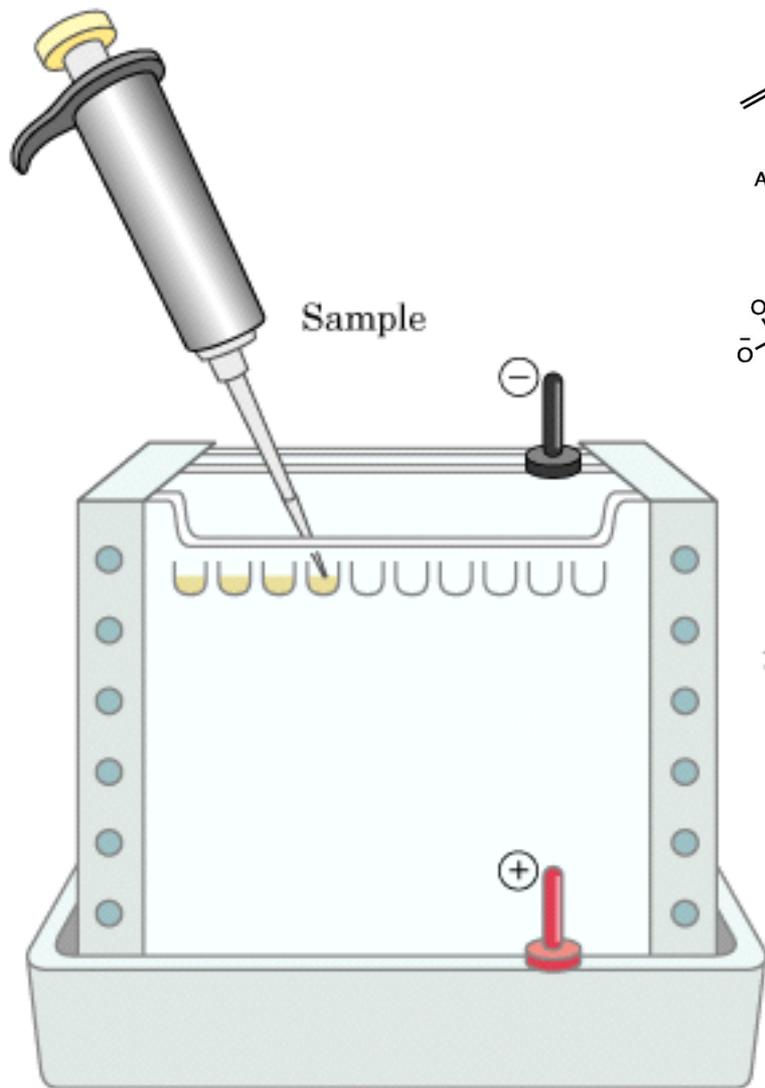
Todas negativas, separação apenas por tamanho



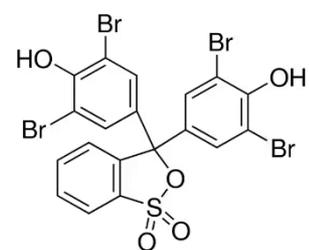
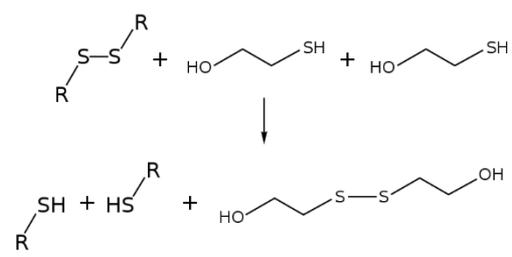
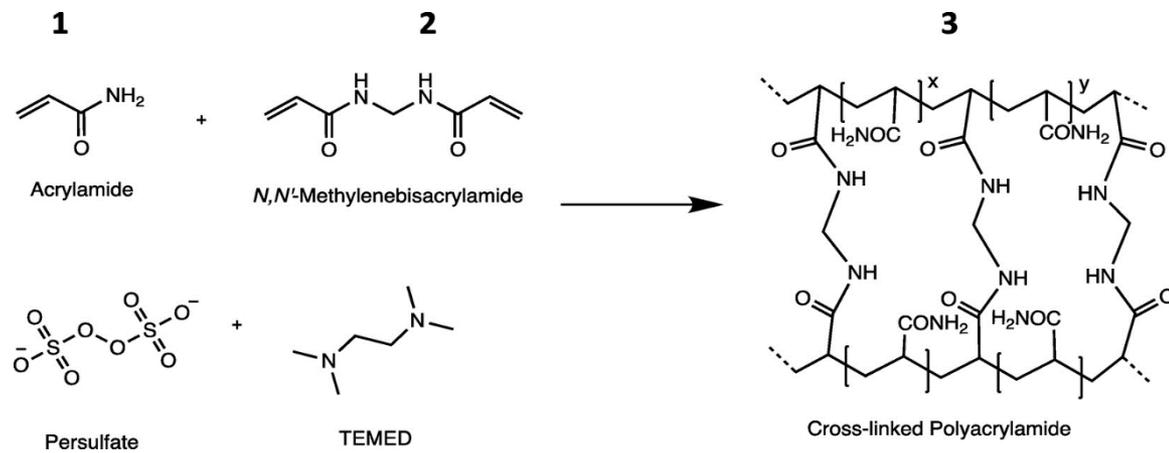
Gel de proteína corado com coomassie blue



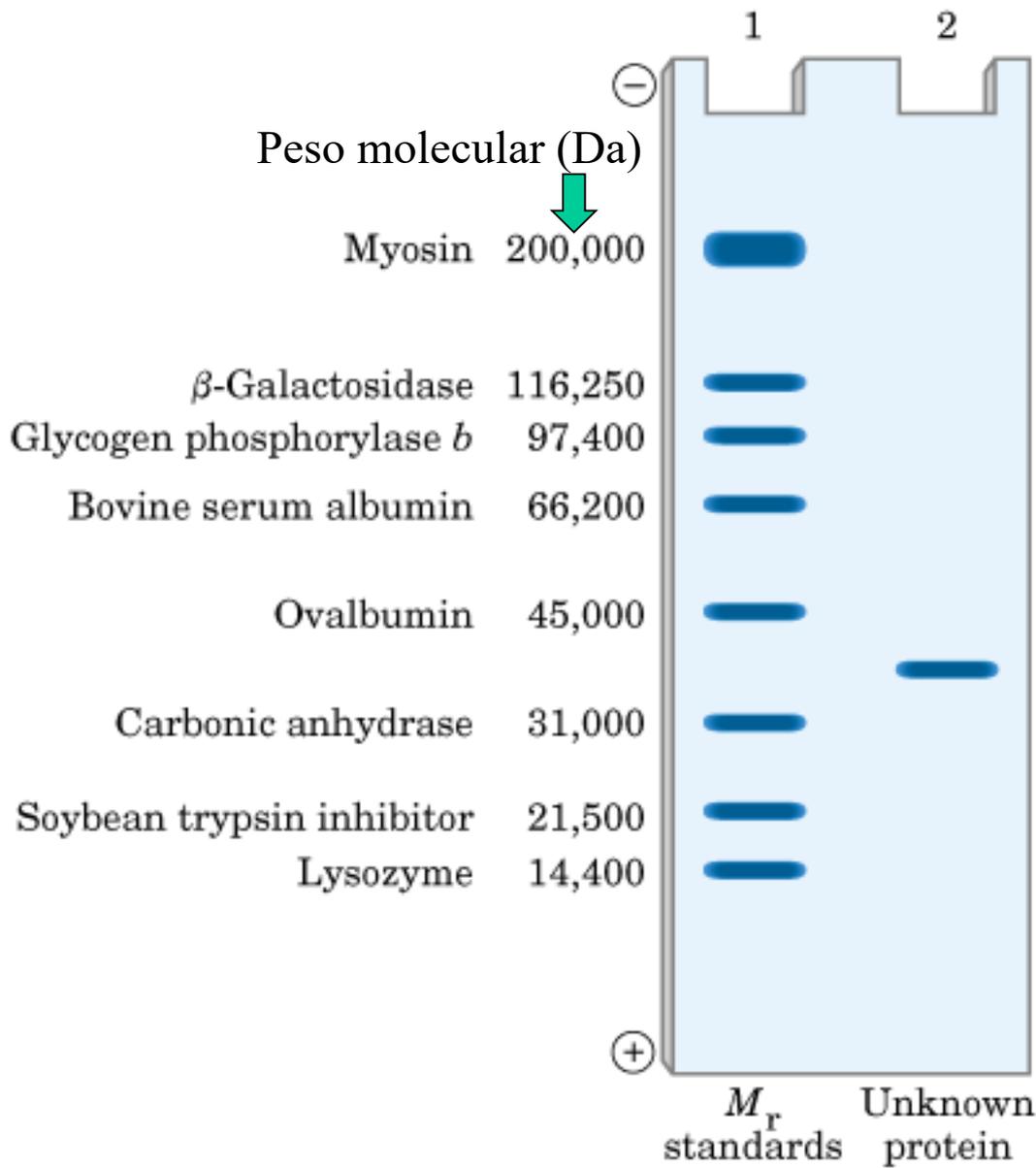
Separação de proteínas por eletroforese



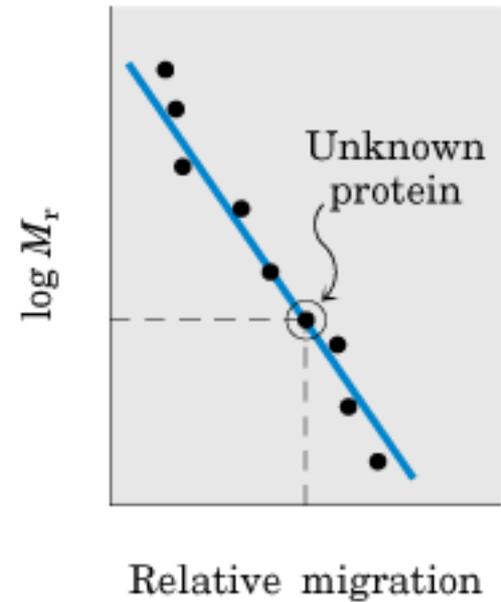
SDS-PAGE =
 “sodium dodecyl sulphate
 polyacrilamide gel electrophoresis”



Azul de bromofenol



(a)



(b)

- **Assistir estes vídeos em casa:**

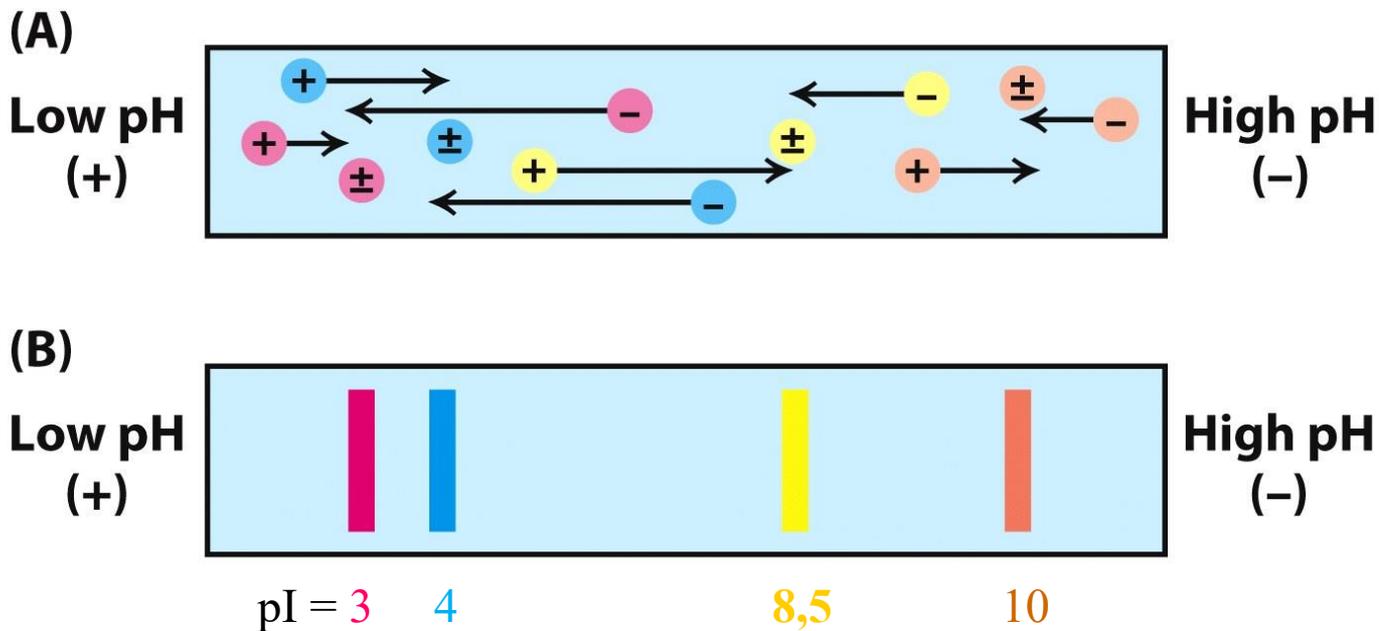
<https://eaulas.usp.br/portal/video?idItem=18557>

https://www.youtube.com/watch?v=i_6y6Z5UvwE

<https://www.youtube.com/watch?v=nsL55BiI3Go>

Eletroforese isoeétrica: se baseia no fato que a carga líquida de uma proteína depende do pH do seu ambiente

A) Solução de mistura de proteínas é aplicada a uma fita de gel com um gradiente de pH immobilizada (IPG) (https://en.wikipedia.org/wiki/Immobilized_pH_gradient
https://en.wikipedia.org/wiki/Isoelectric_focusing)

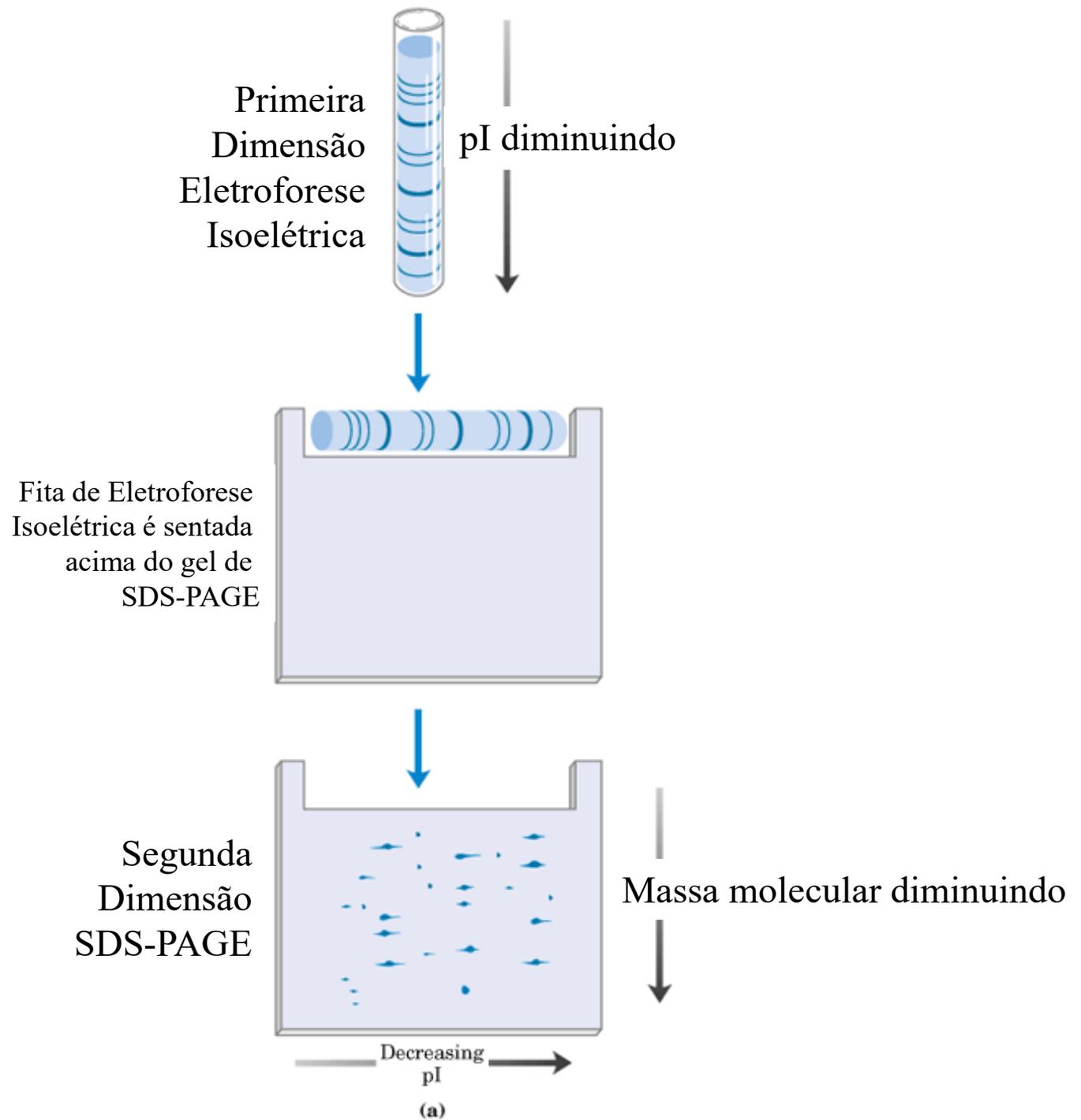


B) Quando um campo elétrico é aplicado, as proteínas se distribuem segundo seus valores de pI (ponto isoeletrico)

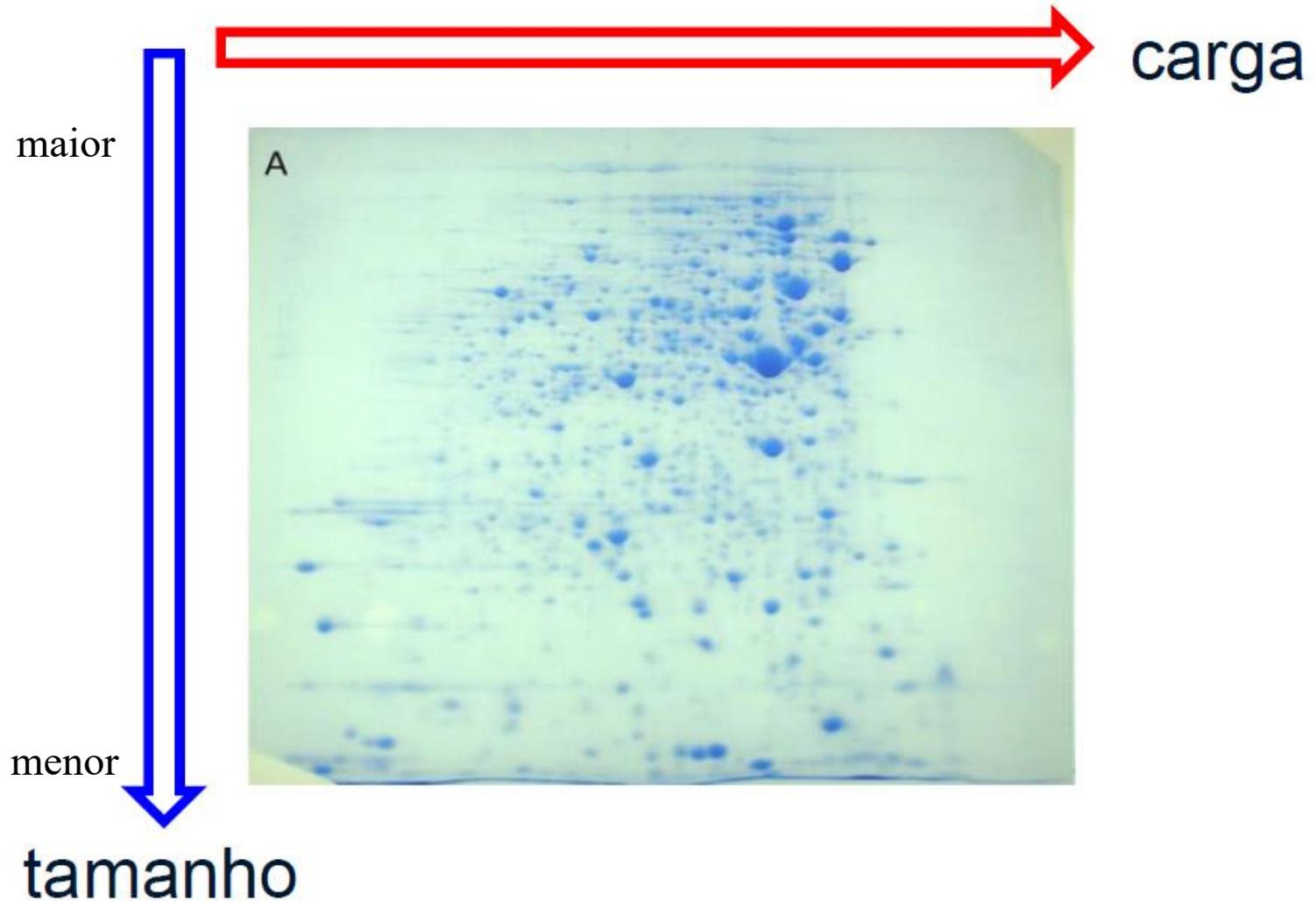
Todas as proteínas que se encontram em uma região com $\text{pH} < \text{pI}$ tem carga + e migram para o catodo (a direita)

Todas as proteínas que se encontram em uma região com $\text{pH} > \text{pI}$ tem carga - e migram para o anodo (a esquerda)

Eletoforese Bidimensional



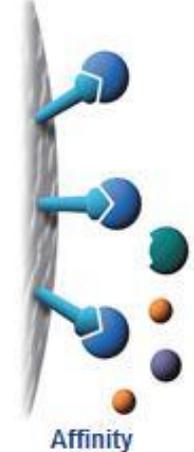
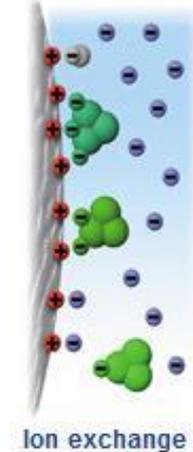
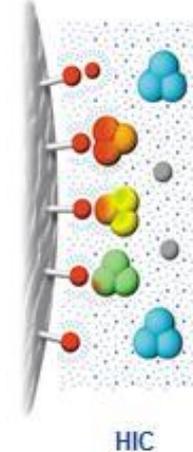
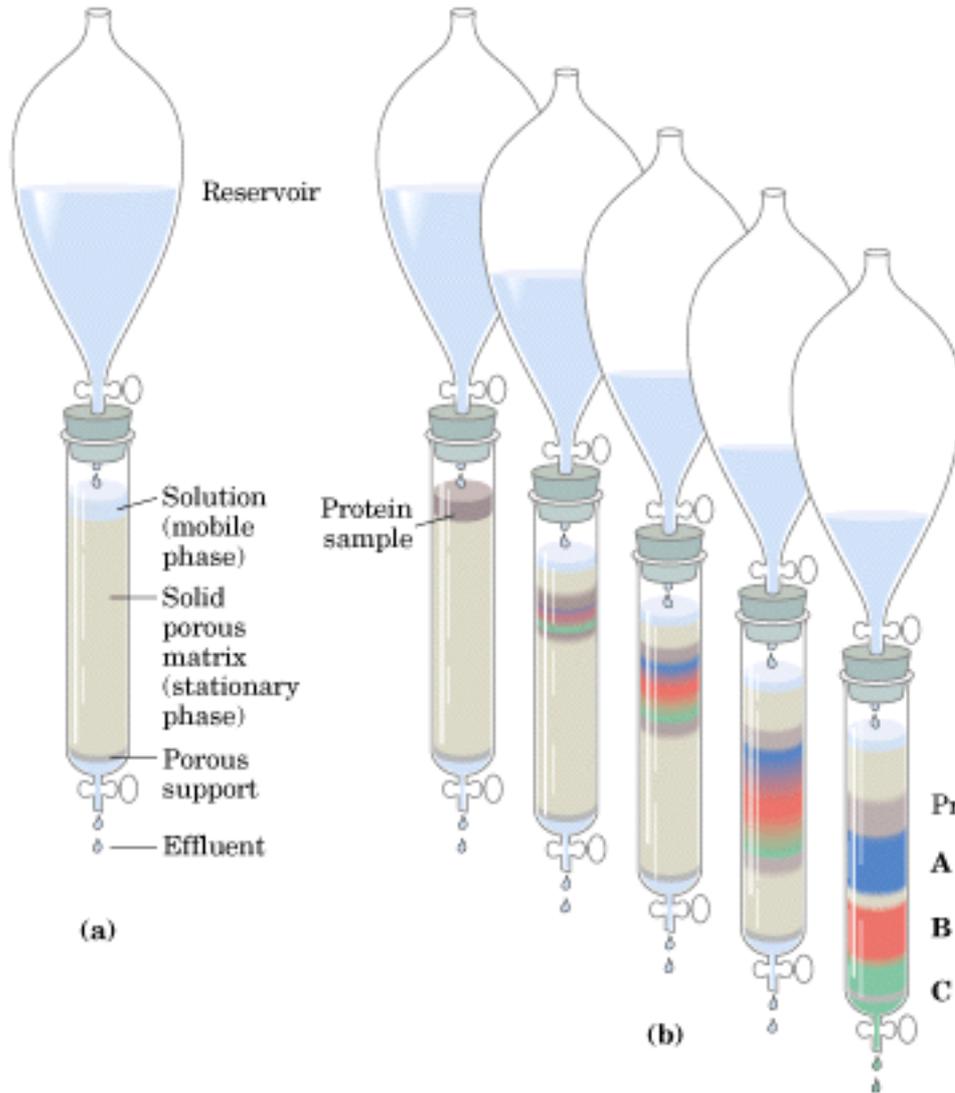
Eletroforese bidimensional



Cromatografia líquida

vários tipos

Todos tem uma fase móvel (líquida) e uma fase estacionária (sólida)



HIC=Hydrophobic Exchange Chromatography



Soluções para a fase móvel (líquida)

A coluna contendo a fase imóvel (sólida)

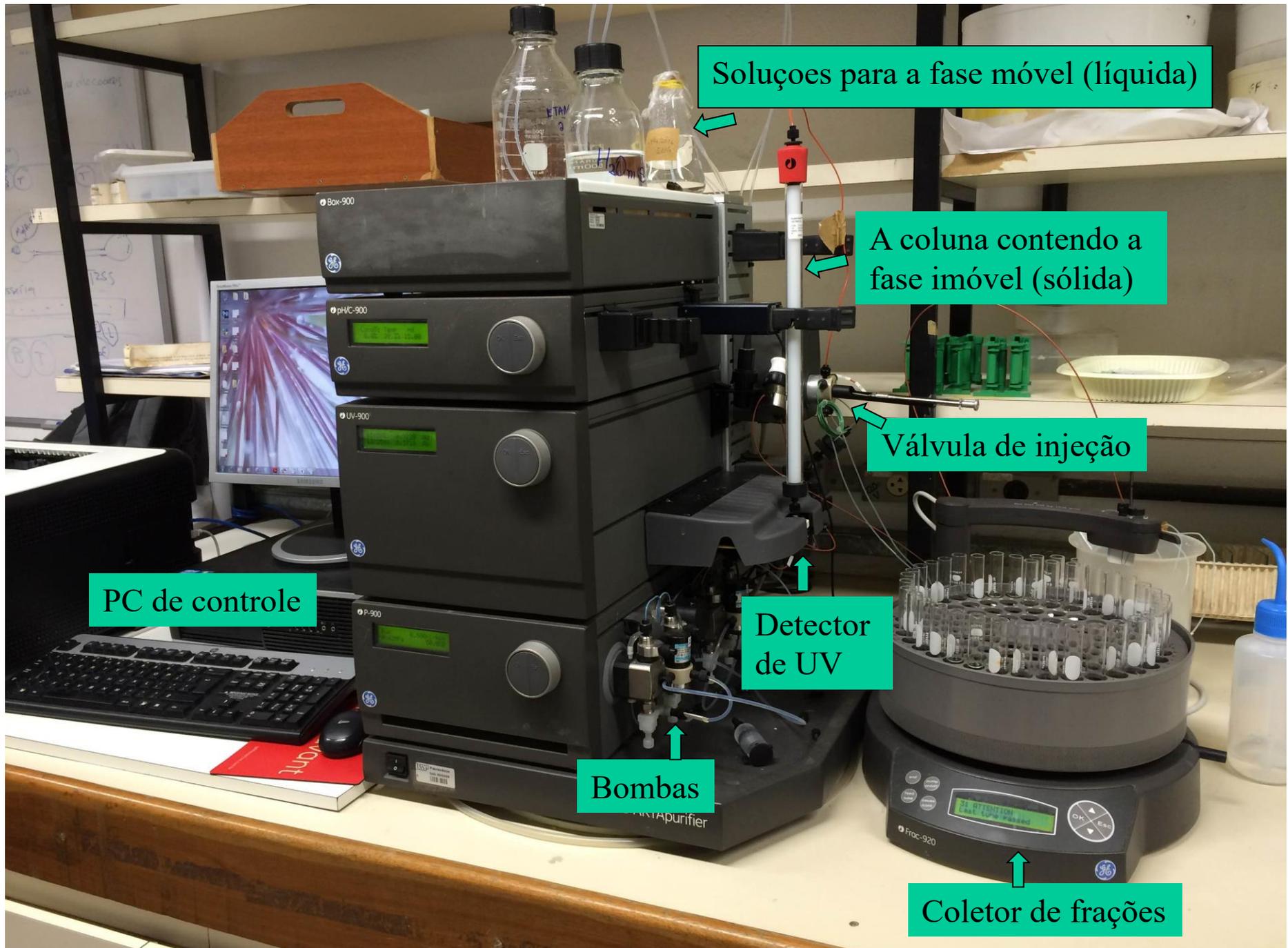
Válvula de injeção

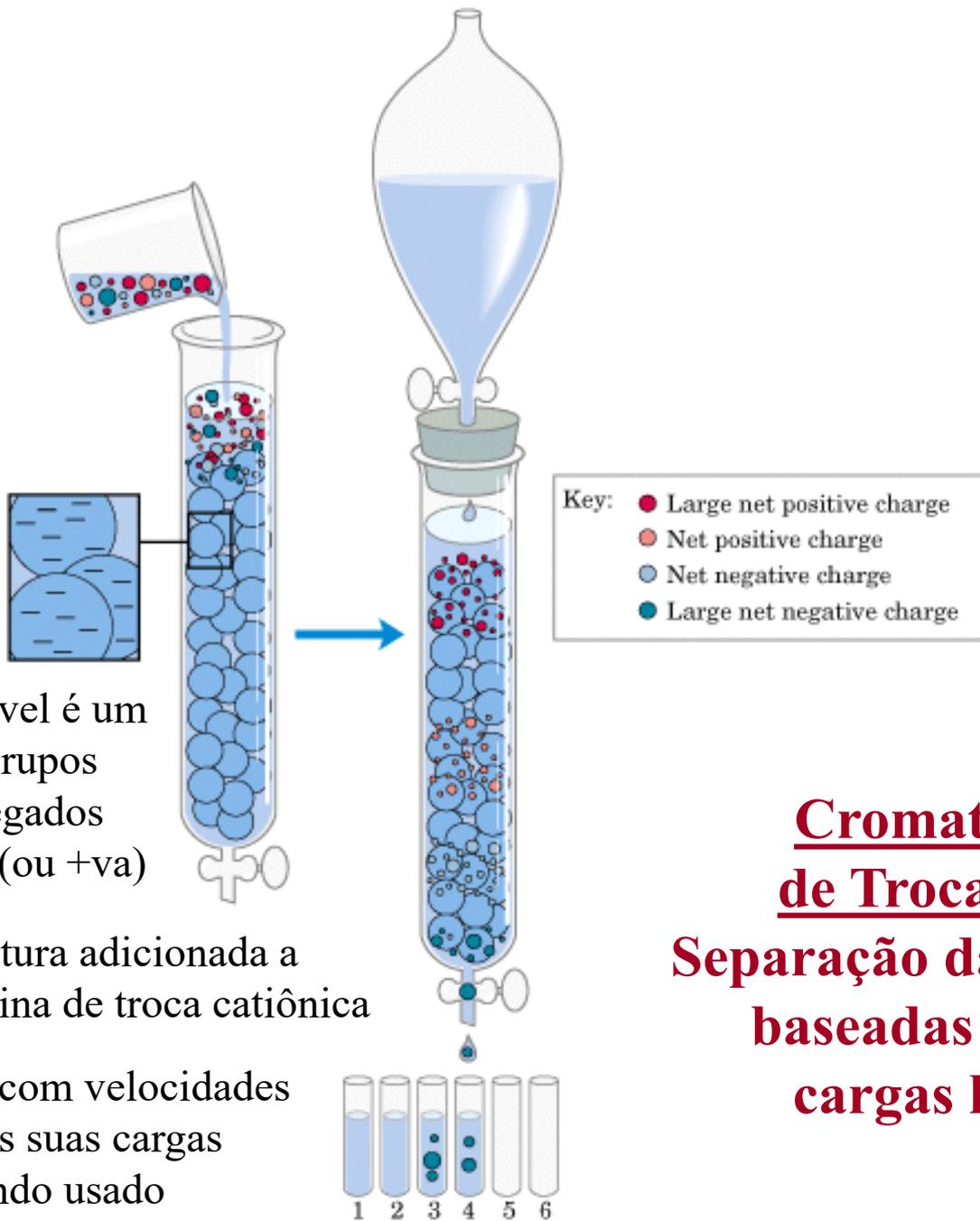
PC de controle

Detector de UV

Bombas

Coletor de frações





Fase sólida/imóvel é um Polímero com grupos funcionais carregados Negativamente (ou +va)

Mistura adicionada a Resina de troca catiônica

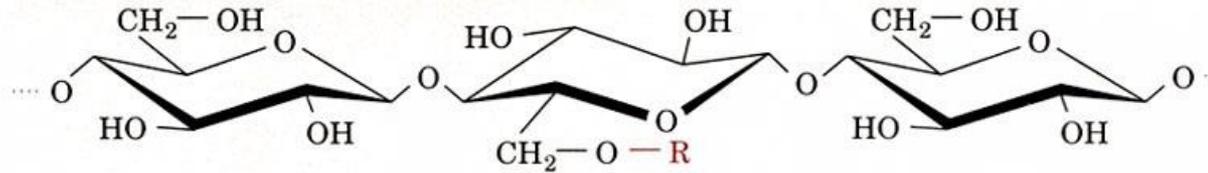
Proteínas movem com velocidades Que dependem das suas cargas líquidas no pH sendo usado

Cromatografia de Troca Iônica:
Separação das proteínas baseadas nas suas cargas líquidas

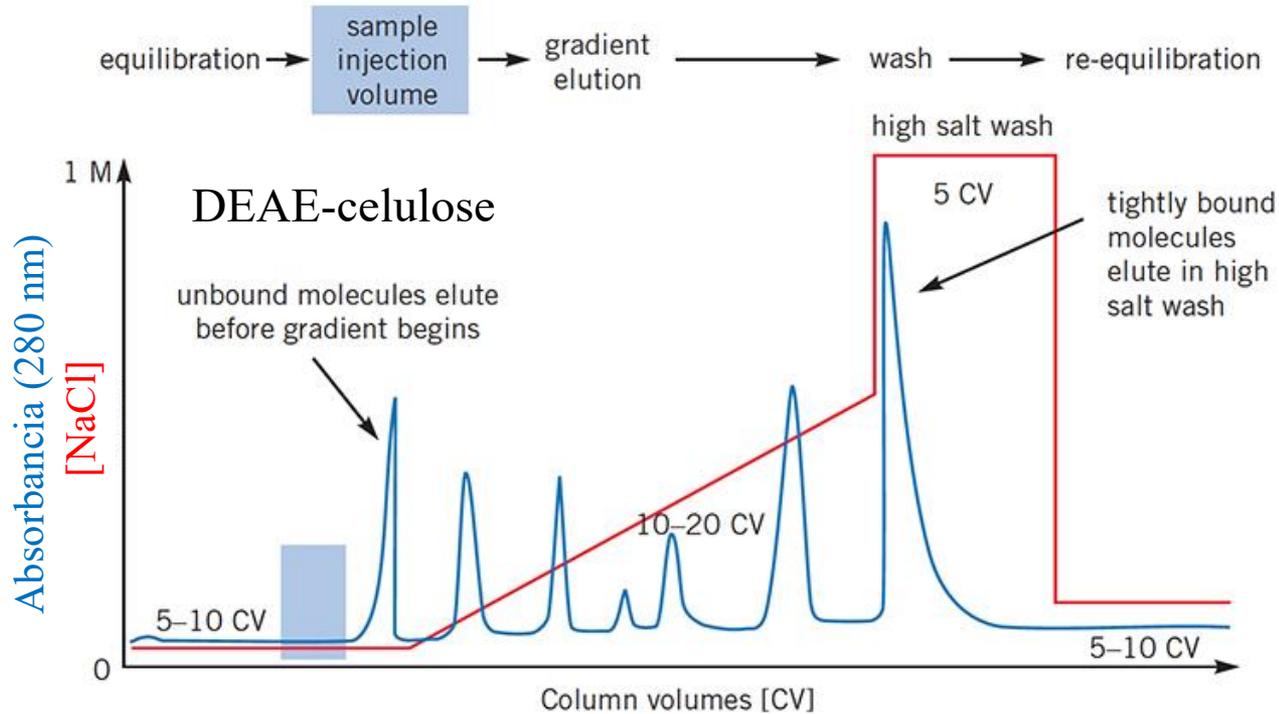
(a)

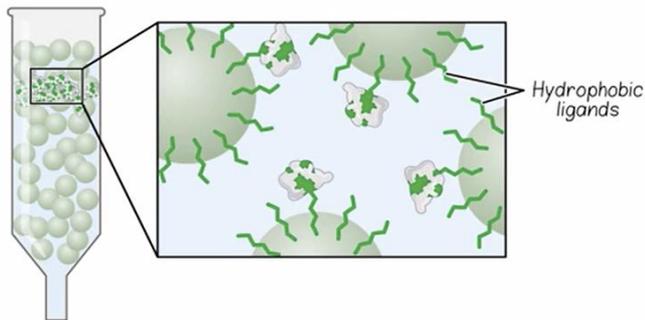
Fase sólida/imóvel

Exemplo: Matriz de celulose (ou outro polissacarídeo) modificado com grupos carregados negativamente ou positivamente



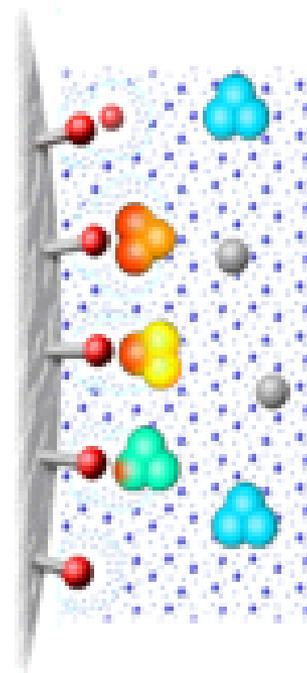
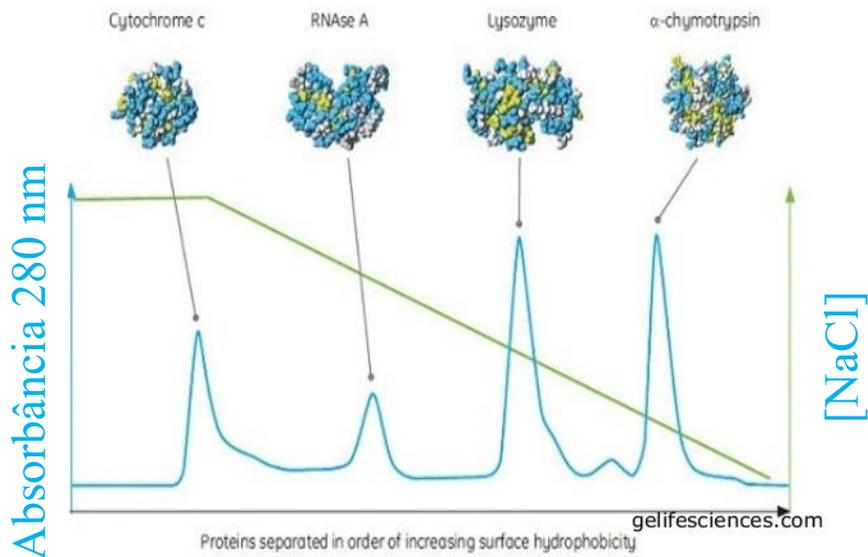
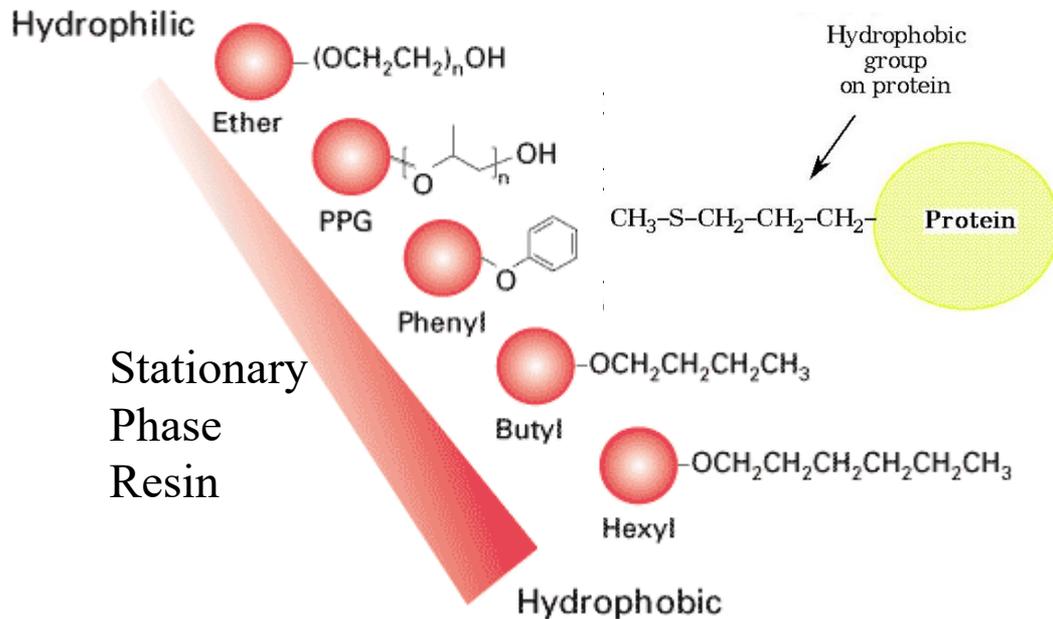
DEAE: $R = -CH_2-CH_2-NH^+(CH_2CH_3)_2$ Trocaador de aníons
CM: $R = -CH_2-COO^-$ Trocaador de catíons





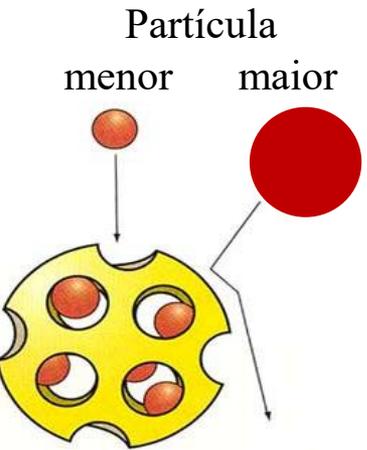
Cromatografia Hidrofóbica: Separação das proteínas baseadas nas suas hidrofobicidades

HIC ligand candidates

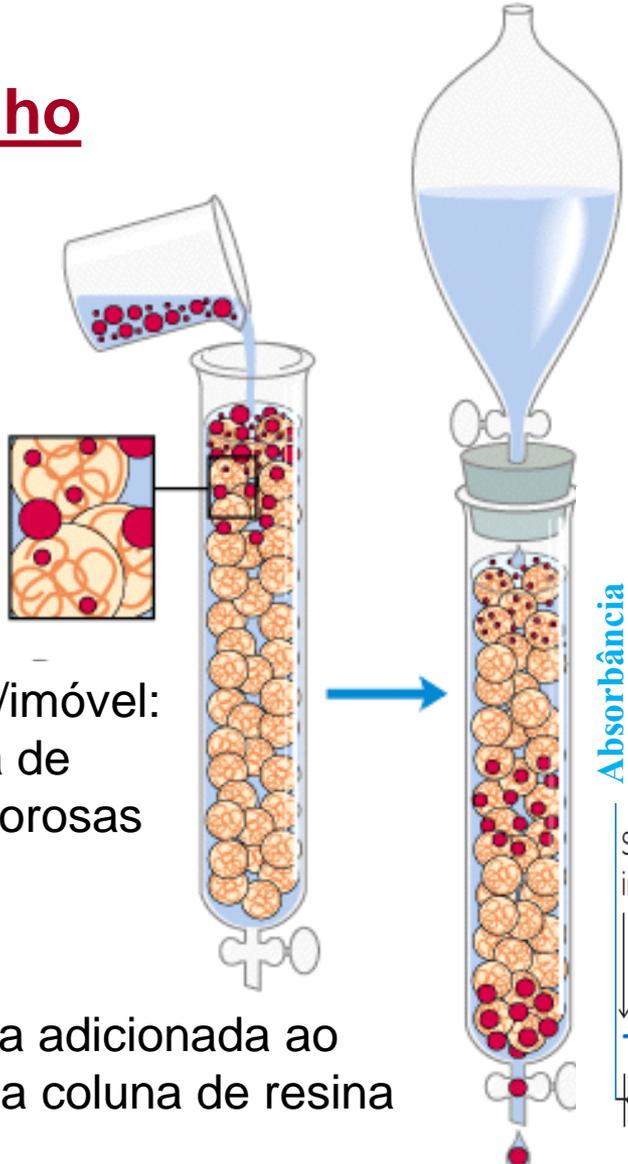


Cromatografia de exclusão por tamanho

(filtração em gel):
Separação das proteínas baseadas nos seus tamanhos (pesos moleculares)

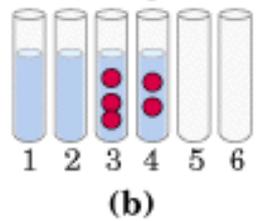


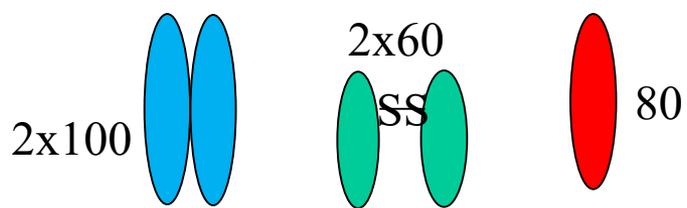
Fase sólida/imóvel:
Resina feita de partículas porosas



Mistura adicionada ao topo da coluna de resina

Moléculas maiores não entram nos poros e portanto são transportadas mais rapidamente do que moléculas menores.

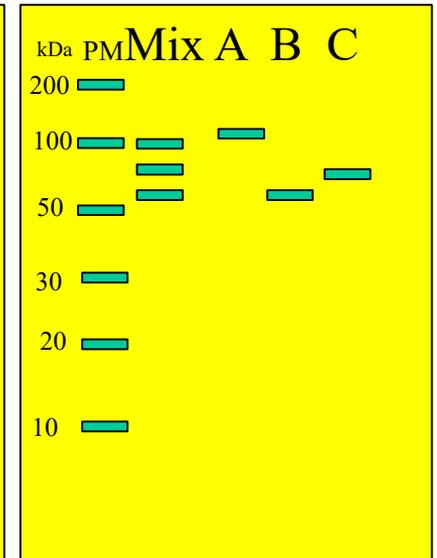
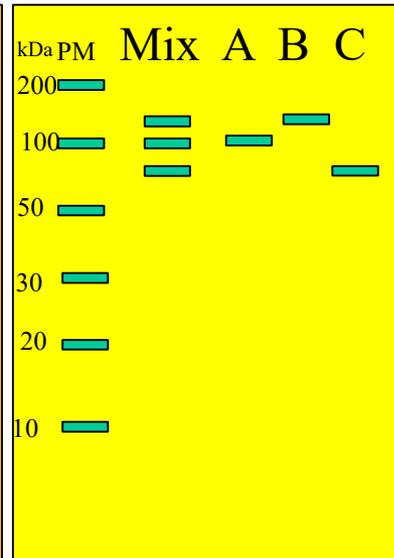
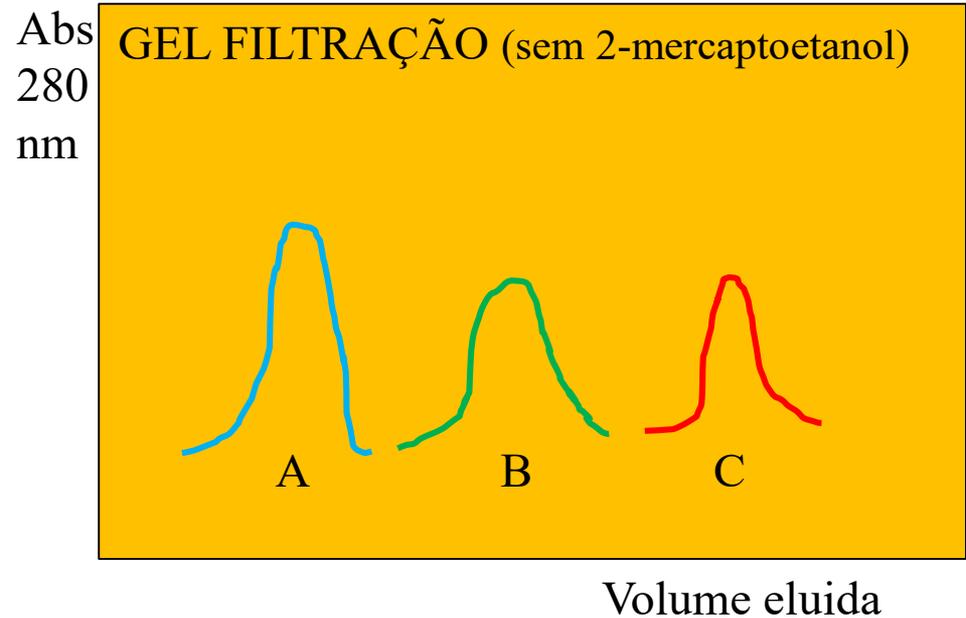




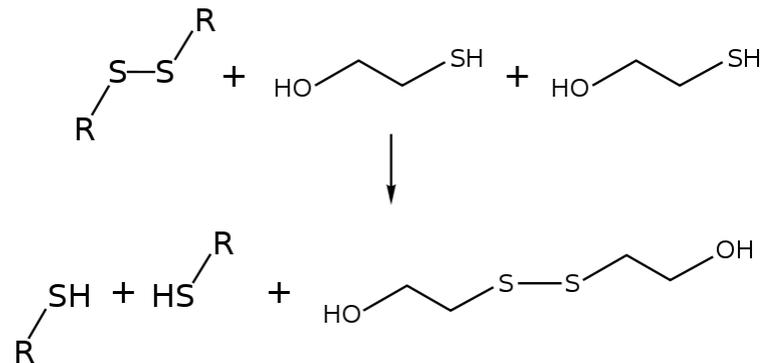
SDS-PAGE

- 2-mercaptoetanol

+ 2-mercaptoetanol



PM = marcadores de peso molecular

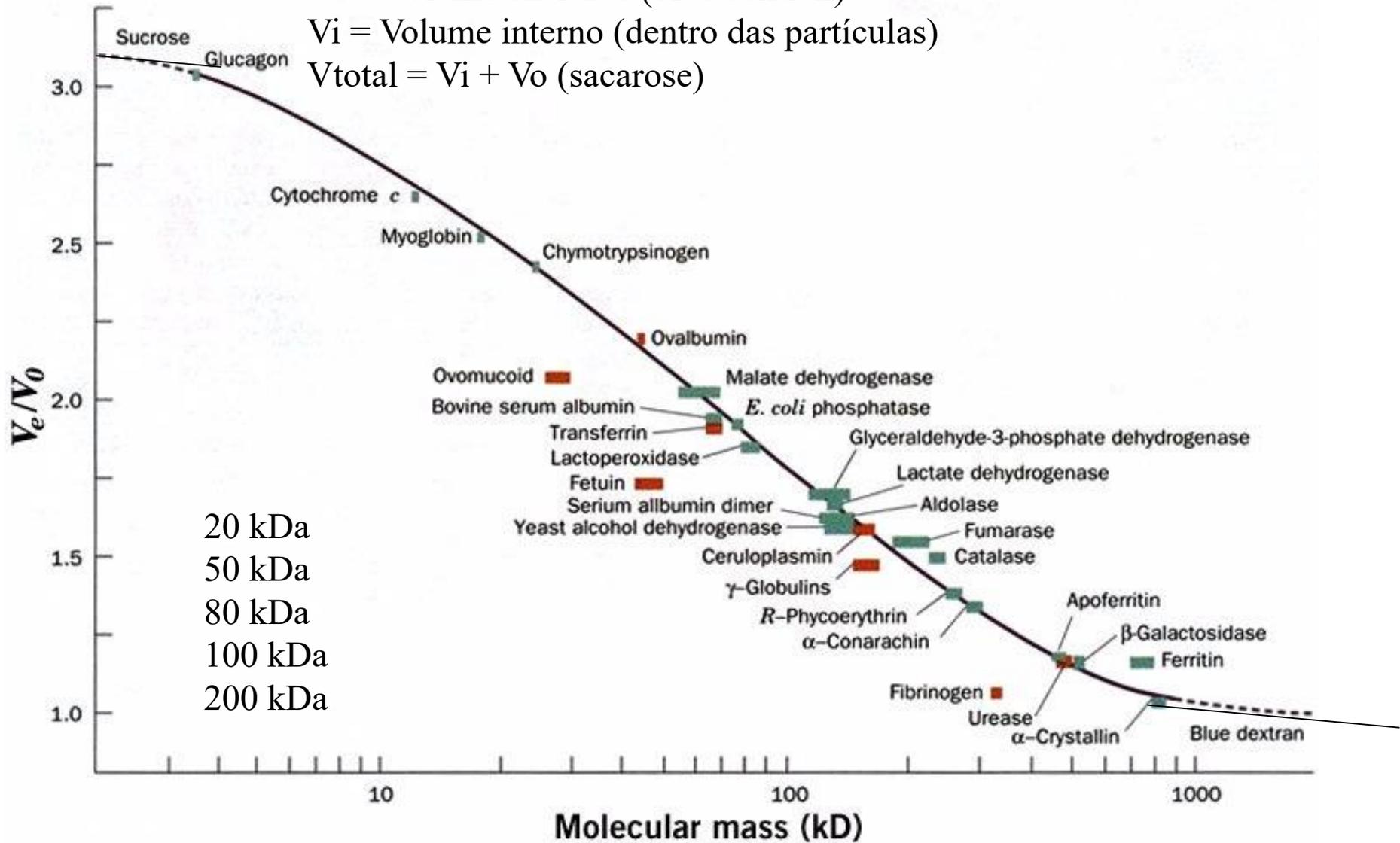


V_e = volume de eluição

V_o = Volume excluído (blue dextran)

V_i = Volume interno (dentro das partículas)

$V_{total} = V_i + V_o$ (sacarose)

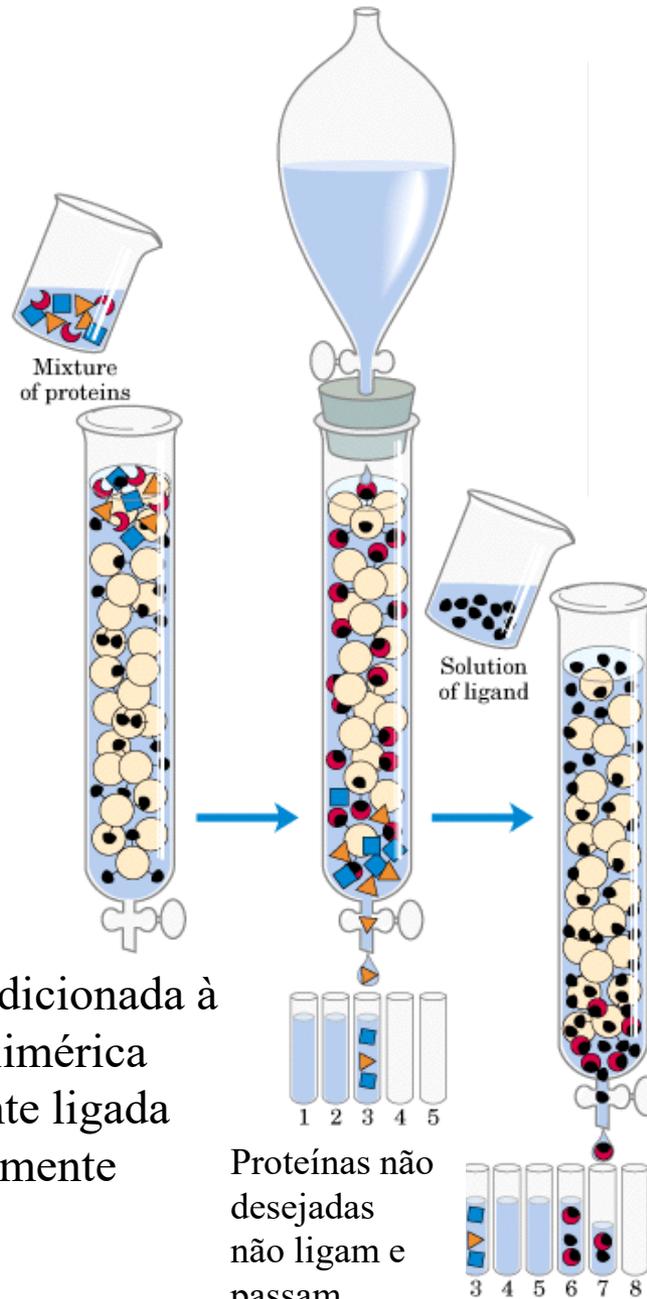


Cromatografia
de Afinidade:
Separação das proteínas
baseadas nas suas
afinidades específicas
para outras moléculas
ou proteínas.

Mistura adicionada à
resina polimérica
com ligante ligada
covalentemente

Proteínas não
desejadas
não ligam e
passam
livremente
pela coluna

Eluir a proteína de interesse
passando uma solução do ligante livre



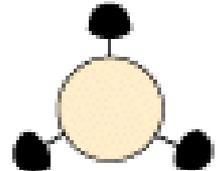
Key:



Protein of
interest



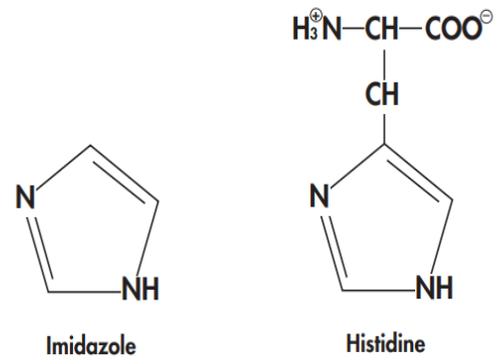
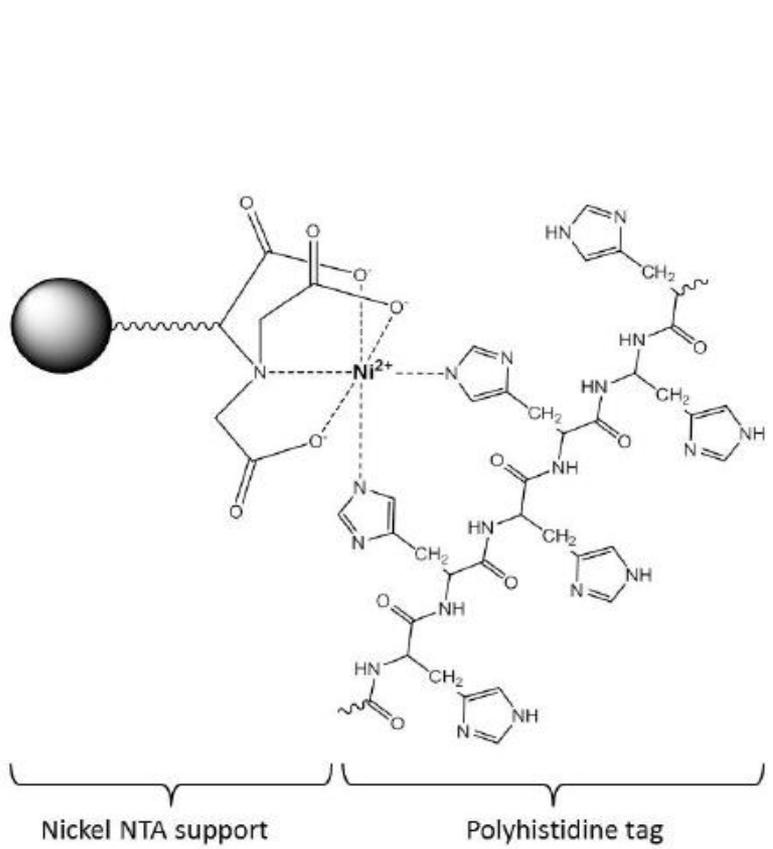
Ligand



Ligand
attached to
polymer bead

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

IMAC explora a capacidade do aminoácido histidina de se ligar a íons de metais de transição quelatados. A histidina é globalmente o marcador mais usado, frequentemente encontrado como seis resíduos de histidina em série, mas também está presente na superfície de muitas proteínas não modificadas. Dos íons metálicos usados nesta técnica, o níquel (Ni^{2+}) geralmente provou ser o mais bem-sucedido.

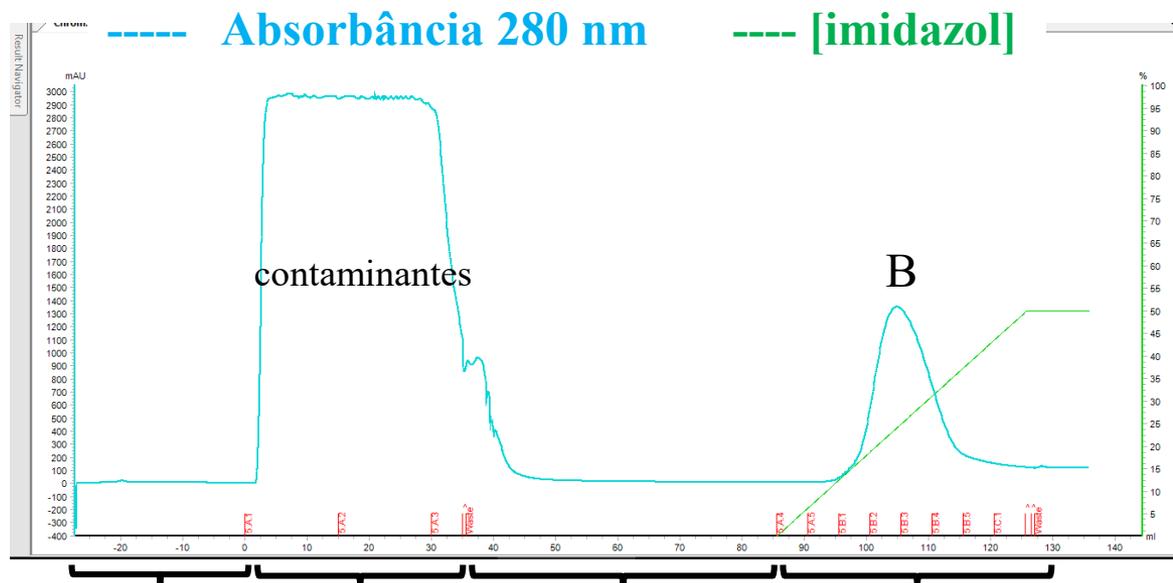


Ni^{2+} -NTA = Níquel-Ácido Nitrilotriacético).



Resultado esperado

6xHis- **B**



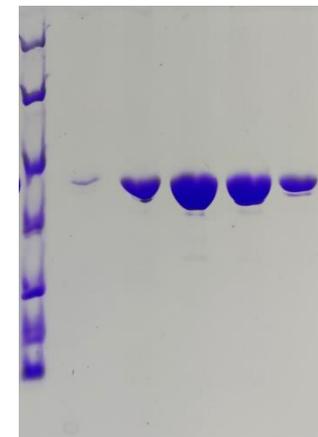
Column
Equilibrium

Sample
Application

Wash
unbound
and
weakly
bound
proteins

Elution
Gradient: 0-50%B

PM



SDS-PAGE

6xHis Protein

Cromatografia de Afinidade:

O ligante pode também ser um anticorpo específico para a proteína desejada.

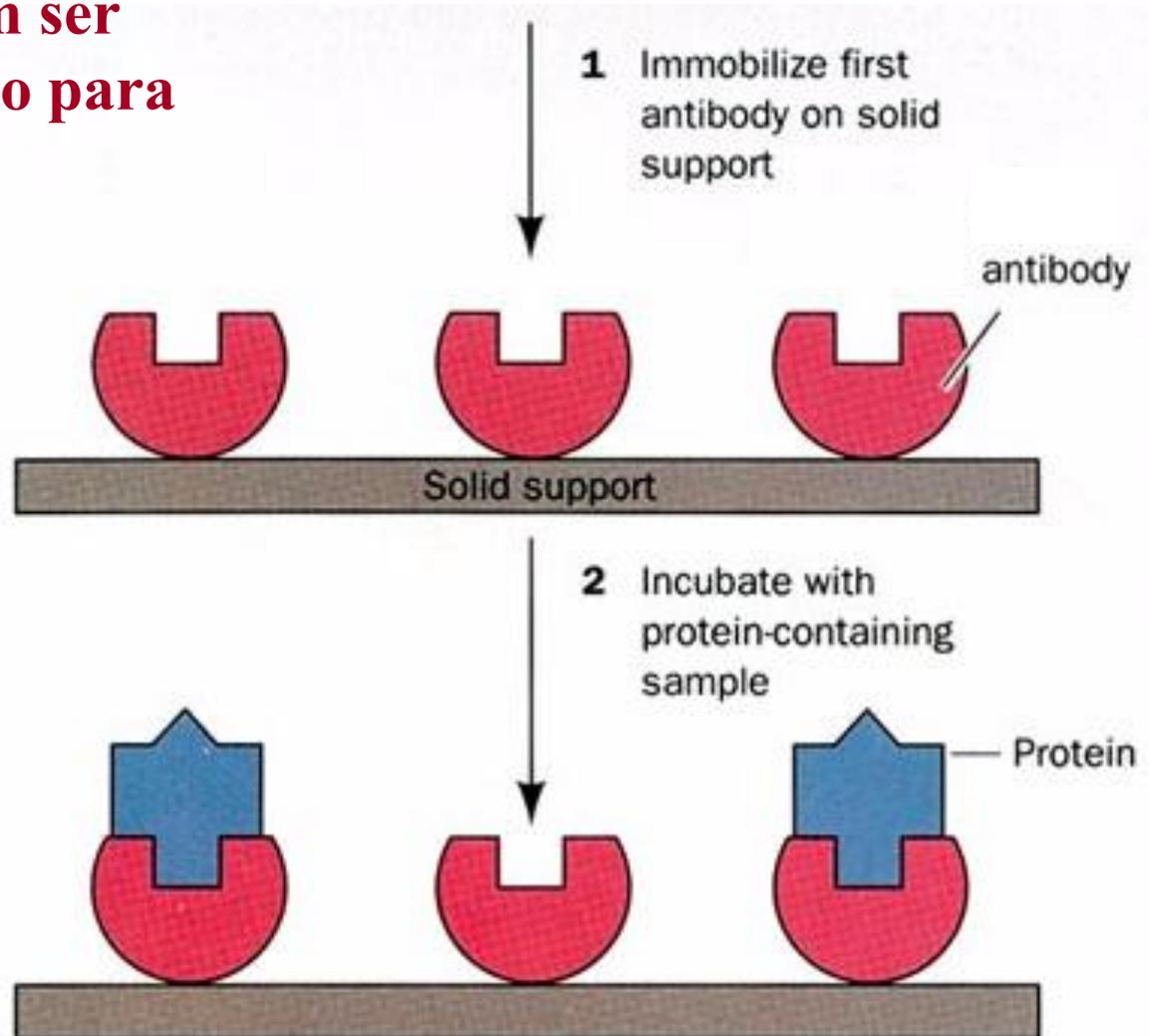


Tabela de purificação para uma enzima hipotética

Procedimento	Volume da fração (mL)	Proteína Total (mg)	Atividade (unidades)	Atividade específica (U/mg)
Extrato celular bruto	1,400	10,000	100,000	10
Precipitação com Sulfato de amônio	280	3,000	96,000	32
Cromatografia troca iônica	90	400	80,000	200
Cromatografia de gel filtração	80	100	60,000	600
Cromatografia por afinidade	6	3	45,000	15,000

Degradação de Edman – sequenciamento de proteínas (amino-terminal)

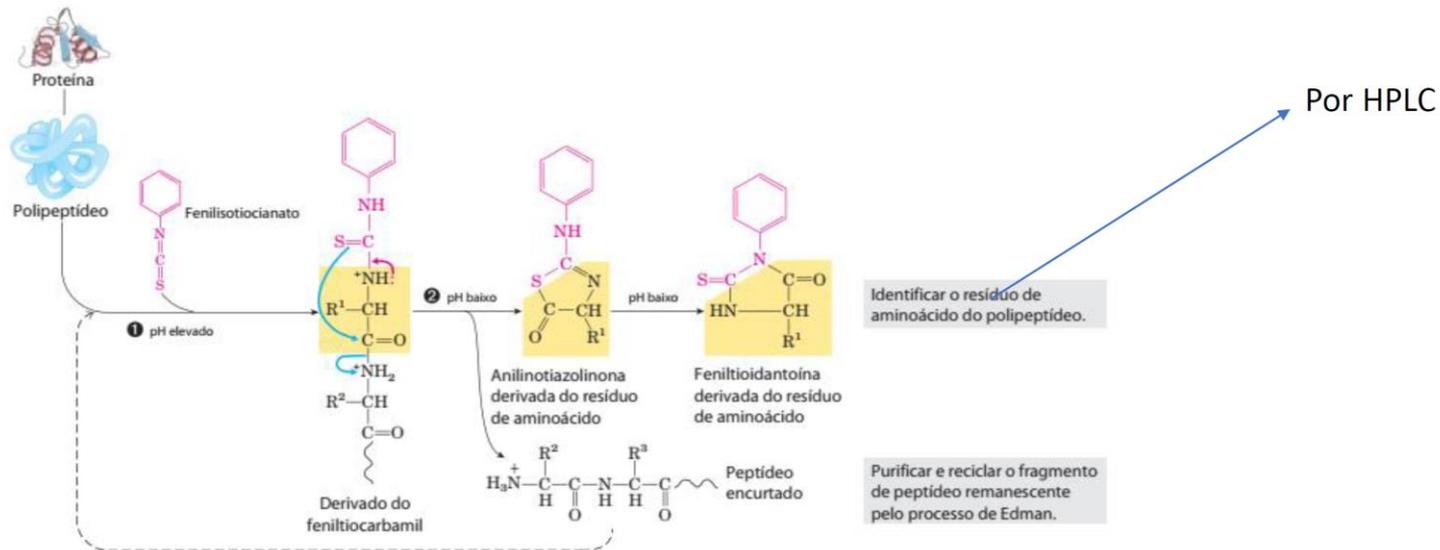
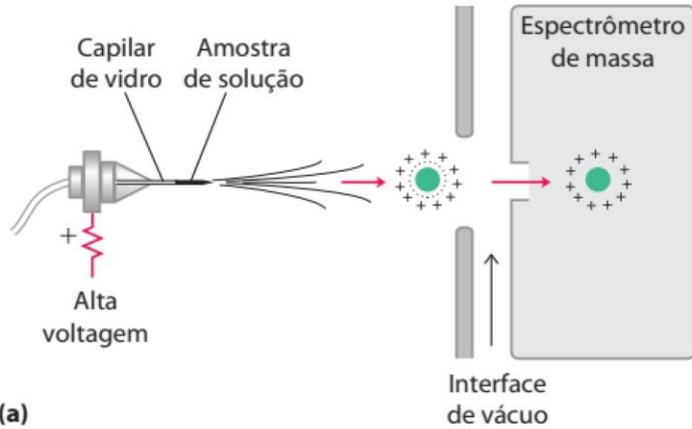


FIGURA 3-27 A química do sequenciamento de proteínas desenvolvida por Pehr Edman. A ligação peptídica mais próxima do aminoterminal da proteína ou polipeptídeo é clivada em duas etapas. As duas etapas são

levadas a cabo sob condições de reação muito diferentes (condições básicas na etapa 1 e ácidas na etapa 2, permitindo que uma etapa prossiga até sua conclusão antes que a segunda se inicie.

Pouco usada atualmente, o sequenciamento de proteínas em larga escala é feito majoritariamente por espectrometria de massas.

Sequenciamento de proteínas por espectrometria de massa



(a)

