

# Bioquímica Metabólica

Notas de aula

Roberto K. Salinas – roberto@iq.usp.br  
Instituto de Química - USP  
versão 12/08/2016

## 1. Aminoácidos

1. Desenhe a estrutura da metionina. Indique qual carbono é quiral. Qual é a geometria do carbono- $\alpha$ ? Indique qual ligação é o eixo de rotação dos ângulos  $\Phi$ ,  $\chi_1$  e  $\chi_3$ ?
2. Quantos ângulos de rotação internos existem em uma cadeia lateral de lisina?
3. Considere uma proteína hipotética que contém uma cadeia lateral de histidina na sua superfície. Esta histidina não faz interações específicas com nenhum outro resíduo. Qual a fração das histidinas nessa posição na amostra é carregada em pH 7.04?
4. Derive a equação abaixo para um ácido monoamino e monocarboxílico. Use a equação de Henderson-Hasselbach.

$$pI = (pK_{NH_3} + pK_{COOH})/2$$

## 2. Peptídeos

1. A curva de titulação da alanina mostra a ionização de dois grupos funcionais com pKa1 2.34 e pKa2 9.69, correspondendo à ionização dos grupos carboxila e amino protonado, respectivamente. A titulação de di- e tri- e oligopeptídeos maiores de alanina também demonstra a ionização de dois grupos funcionais, embora os pKas experimentais sejam diferentes. A tendência dos valores de pKa está mostrada na tabela abaixo.

Amino acid or peptide	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
Ala	2.34	9.69
Ala-Ala	3.12	8.30
Ala-Ala-Ala	3.39	8.03
Ala-(Ala) <sub>n</sub> -Ala, n ≥ 4	3.42	7.94

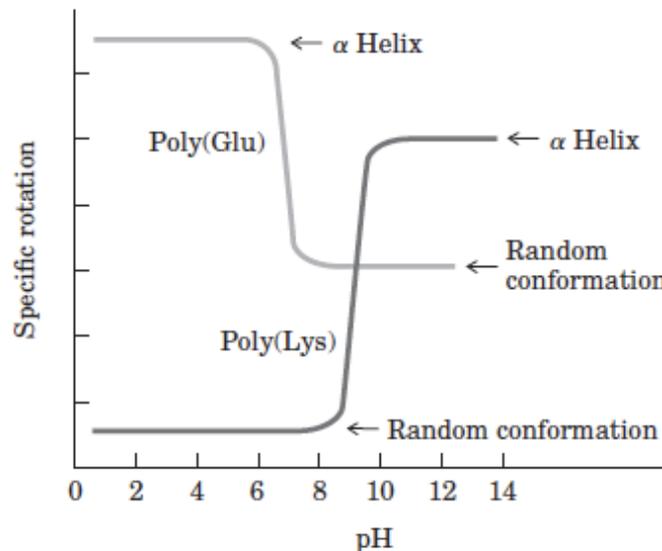
- a) Desenhe a estrutura da Ala-Ala-Ala. Identifique os grupos funcionais associados com os pKa1 e pKa2
  - b) Por que o valor do pKa1 aumenta com a adição de Ala no oligopeptídeo?
  - c) Por que o valor de pKa2 diminui com a adição de Ala?
2. Um método para separação de polipeptídeos faz uso das diferentes solubilidades. A solubilidade de polipeptídeos grandes em água depende da polaridade relativa dos grupos R, e particularmente do número de grupos ionizáveis: quanto mais grupos ionizáveis mais solúvel será o peptídeo. Qual destes peptídeos será mais solúvel no pH indicado?
    - a) (Gly)<sub>20</sub> ou (Glu)<sub>20</sub> a pH 7.0
    - b) (Lys-Ala)<sub>3</sub> ou (Phe-Met)<sub>3</sub> a pH 7.0
    - c) (Ala-Ser-Gly)<sub>5</sub> ou (Asn-Ser-His)<sub>5</sub> e pH 6.0

d) (Ala-Asp-Gly)<sub>5</sub> ou (Asn-Ser-His)<sub>5</sub> a pH 3.0

3. Em estudos de difração de raios-X de peptídeos, Linus Pauling e Robert Corey encontraram que a ligação C-N da ligação peptídica possui uma distância intermediária (1.32 Å) entre uma ligação C-N simples (tipicamente 1.49 Å) e uma ligação C-N dupla (1.27 Å). Eles também encontraram que a ligação peptídica é planar (todos os 4 átomos ligados ao grupo C-N estão no mesmo plano), e que os dois átomos C $\alpha$  ligados ao grupo C-N são sempre *trans* um em relação ao outro (em lados opostos da ligação peptídica):

- O que a distância entre os átomos C-N na ligação peptídica indica sobre a energia da ligação e a ordem (ou seja, se é uma ligação simples, dupla, ou tripla)?
- O que as observações de Pauling e Corey nos dizem sobre a facilidade de rotação ao redor da ligação peptídica C-N?

4. A desnaturação de uma alfa-hélice formando um polipeptídeo sem estrutura definida (*random coil*) é acompanhada da diminuição de uma propriedade chamada rotação específica (a capacidade de uma solução de alterar o plano da luz plano-polarizada). Poli-Glu, um polipeptídeo constituído apenas por resíduos de L-Glu, assume conformação em alfa-hélice a pH 3.0. Quando o pH é aumentado para 7.0, ocorre uma grande diminuição da rotação específica da solução. De forma análoga, a poli-Lys (resíduos de L-Lys) forma uma alfa-hélice em pH 10.0, mas quando o pH é diminuído para 7.0 a rotação específica da solução diminui conforme mostrado no gráfico abaixo:



Qual é a explicação para o efeito do pH sobre a conformação de poli-Glu e poli-Lys? Por que essa transição ocorre em uma faixa tão estreita de pH?

5. Algumas proteínas são ricas em pontes dissulfeto. As suas propriedades mecânicas (viscosidade, dureza, resistência, etc) estão correlacionadas com o número de pontes dissulfeto presentes.

- Glutenina, uma proteína do trigo rica em pontes dissulfeto, é responsável pelo caráter coesivo e elástico da massa feita com farinha de trigo. A dureza do casco da tartaruga deve-se ao grande número de pontes dissulfeto formadas pela alfa-queratina. Qual é a base molecular para a correlação entre o conteúdo de pontes dissulfeto e as propriedades mecânicas dessas proteínas?
- A maior parte das proteínas globulares são desnaturadas (perdem a sua estrutura) e perdem a sua atividade se aquecidas até 65 C. No entanto, proteínas globulares contendo múltiplas pontes dissulfeto precisam ser aquecidas a temperaturas mais altas e por mais tempo para perder a estrutura e a atividade. Um exemplo é a proteína BPTI (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*) que possui 58 aminoácidos, é formada por uma única cadeia polipeptídica, e contém três pontes dissulfeto. Qual é a base molecular para essa elevada resistência à desnaturação térmica?

6. Atualmente, é possível fazer boas previsões sobre a estrutura secundária de uma proteína com base na estrutura primária (ou seja, com base na sequência de aminoácidos). Considere a seguinte sequência de aminoácidos:

Ile 1 – Ala 2 – His 3 – Thr 4- Tyr 5- Gly 6- Pro 7 – Phe 8 – Glu 9 – Ala 10 – Ala 11- Met 12 – Cys 13 – Lys 14 – Trp 15 – Glu 16 – Ala 17 – Gln 18 – Pro 19 – Asp 20 – Gly 21 – Met 22 – Glu 23 – Cys 24 – Ala 25 – Phe 26 – His 27 – Arg 28

- onde devem ocorrer dobras-beta?
- onde pontes dissulfeto intra-moleculares podem ocorrer?
- assumindo que essa sequência é parte de uma proteína globular, indique a provável localização (superfície ou meio interior) dos seguintes aminoácidos: Asp, Ile, Thr, Ala, Gln, Lys. Fundamente a sua resposta. Dica, observe a estrutura dos aminoácidos, a ausência ou presença de carga em pH fisiológico. Note que o interior de proteínas é altamente apolar.

7. Qual é o comprimento de uma alfa-hélice que corresponde a uma cadeia polipeptídica de 20 aminoácidos? Qual seria o comprimento da cadeia se ela estivesse completamente estendida?

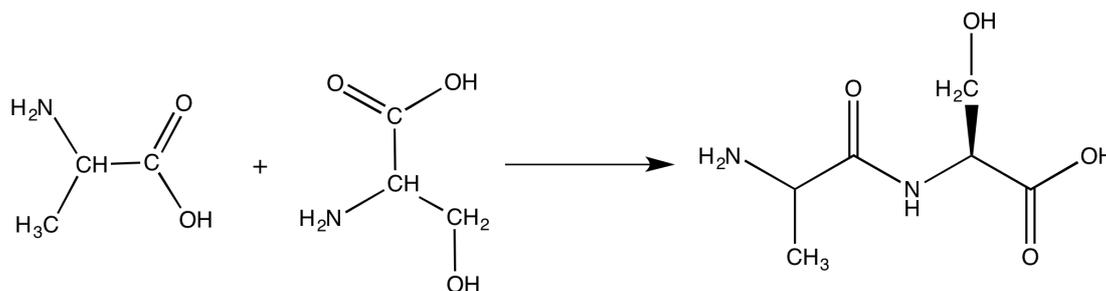
8. Um peptídeo possui a seguinte sequência de aminoácidos:

Glu-His-Trp-Ser-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly

- Qual é a carga líquida do peptídeo em pH 3.8, e em pH 11? (use os valores de pKa da tabela abaixo)
- Faça uma estimativa do pI deste peptídeo. Dados fornecidos: pKa(NH<sub>3</sub>) = 9.67; pKa(His) = 6.0; pKa(Arg) = 12.48; pKa(COOH) = 2.17; pKa(Glu) = 4.25.

### 3. Estrutura de proteínas

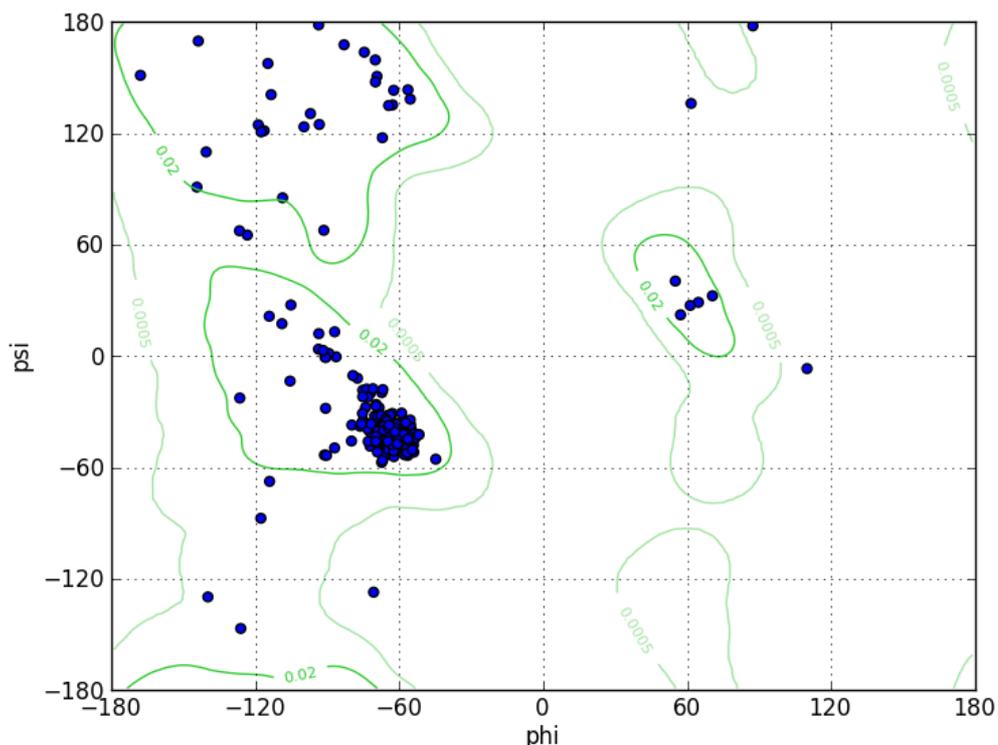
Proteínas são polímeros de aminoácidos conectados por ligações peptídicas. A ligação peptídica ocorre devido a uma reação de condensação entre o grupo amino do primeiro aminoácido e a extremidade carboxila do segundo aminoácido (**Figura 1**):



**Figura 1:** Reação de condensação entre Alanina e Serina formando um dipeptídeo Ala-Ser com eliminação de uma molécula de H<sub>2</sub>O. As cargas líquidas do peptídeo e dos aminoácidos não estão mostradas.

A ligação peptídica é planar devido à existência de delocalização de elétrons do nitrogênio e do oxigênio da ligação amida. A planaridade da ligação peptídica possui enormes consequências conformacionais. A primeira delas é que a conformação do esqueleto polipeptídico pode ser descrita por apenas três ângulos diedrais: o ângulo  $\omega$  ao redor da ligação peptídica, e os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  do carbono alfa. Os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  são correlacionados e nem todas as combinações são permitidas devido ao impedimento estérico gerado entre a carbonila e o N-H da ligação peptídica, e entre as

cadeias laterais de aminoácidos vizinhos. O gráfico de correlação entre  $\phi$  e  $\Psi$  é chamado de Diagrama de Ramachandran em homenagem ao biofísico indiano que o desenvolveu, e ainda é a principal ferramenta utilizada para avaliar a qualidade estereoquímica das estruturas de proteínas (**Figura 2**).



**Figura 2.** Diagrama de Ramachandran. As regiões delimitadas pelas linhas verdes demarcam combinações permitidas de  $\Psi$  e  $\Phi$ . Pontos fora das regiões delimitadas pelas linhas verdes indicam um aminoácido com algum problema, ou são glicinas. A glicina não possui cadeia lateral, e por isso pode assumir uma distribuição mais ampla de ângulos diedrais.

Estruturas tridimensionais de proteínas com resolução atômica podem ser obtidas experimentalmente através de cristalização e Difração de Raios-X, Ressonância Magnética Nuclear em solução, e mais recentemente Crio-Microscopia Eletrônica.

### **Estrutura primária**

A sequência de aminoácidos de uma proteína é chamada estrutura primária. De acordo com a “hipótese termodinâmica de Anfinsen”, a estrutura tridimensional de uma proteína é determinada pela sequência de aminoácidos.

Um conceito fundamental em biologia é que a função de uma macromolécula de interesse biológico (ácidos nucleicos, açúcares, proteínas) está intimamente relacionada com a sua estrutura tridimensional. Ou seja, se conhecermos a estrutura, compreenderemos a função.

A predição da estrutura tridimensional de uma proteína a partir da sequência de aminoácidos não é tarefa simples, especialmente para moléculas com mais de 100 aa. No entanto, a análise da estrutura primária pode oferecer pistas importantes sobre

topologia (presença de hélices transmembranares), estrutura secundária e grau de desordem.

A relação evolutiva entre proteínas de diferentes organismos pode ser inferida a partir de comparações entre sequências de aminoácidos. Famílias de proteínas que compartilham a mesma estrutura e a mesma função podem ser facilmente identificadas com base em similaridades entre sequências de aminoácidos. Membros de uma mesma família são chamados de *proteínas homólogas*. A função de uma proteína desconhecida pode eventualmente ser deduzida a partir da comparação de sua sequência de aminoácidos com milhares de sequências de proteínas contidas nos bancos de dados (por exemplo UNIPROT). Duas proteínas contendo ao menos 30% de identidade de sequência geralmente compartilham a mesma estrutura e função.

Aminoácidos conservados são geralmente importantes para a função. Geralmente, quando estes aminoácidos são alterados no decorrer da evolução as propriedades físico-químicas são mantidas. Este fenômeno é chamado de mutação conservativa. Por exemplo, a mutação de uma Ile por uma Val na mesma posição pode ser tolerável pois trata-se de dois aminoácidos hidrofóbicos. Ou a mutação de um aspartato por um um ácido glutâmico também pode ser tolerável pois trata-se de dois aminoácidos com carga negativa na cadeia lateral. As alterações Ile – Val e Asp - Glu seriam duas mutações conservativas (**Figura 3**).

```

Proteína A  GVDEQRFRIEVIDDDVFEEDFCFYIRLFN-----PSEGVK-----LAVPMIAT
Consenso   G  ++  R+ +IDDD+FEEDF  F + L N          EG+          L P AT
Proteína B  GETQKEIRVGIIDDDIFEEDENFLVHLSNIRVSTEASDEGILEASRVSTLACLGSPSTAT
  
```

**Figura 3.** Exemplo de alinhamento de sequências de duas proteínas “A” e “B” de organismos diferentes mas com a mesma função, detectar a concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Note que “gaps” foram introduzidos na sequência da proteína “A” para otimizar o alinhamento com a proteína “B”.

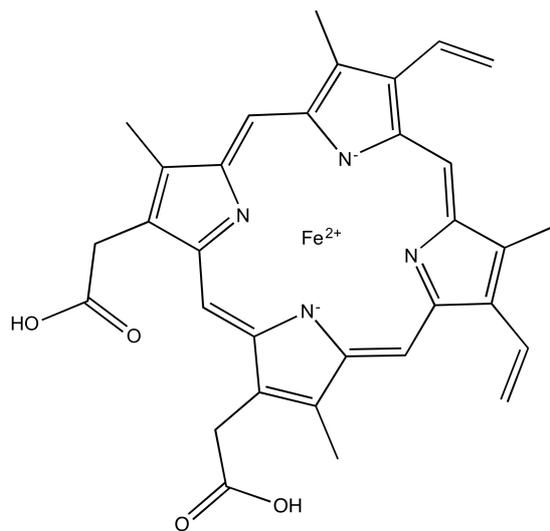
### Função: proteínas que ligam Oxigênio (O<sub>2</sub>)

Proteínas assumem diversas funções, mas uma das funções mais comuns é a ligação específica e reversível de outras moléculas. A molécula que se liga à proteína é chamada de *ligante*. O ligante liga-se a um *sítio de ligação*, o qual deve ser complementar em forma, tamanho, carga e hidrofobicidade ou hidrofobicidade ao ligante (modelo chave-fechadura). A interação entre o ligante e a proteína é *específica*, de forma que a proteína pode distinguir o ligante entre milhares de outras moléculas parecidas. Exemplo: **enzimas reconhecem especificamente o substrato**. No caso das enzimas, o sítio de ligação ao ligante é conhecido como **sítio catalítico**. Enzimas frequentemente reconhecem um substrato de acordo com um modelo de complementariedade espacial, chave-fechadura.

Proteínas são *flexíveis*, isto é, experimentam conformações distintas que se interconvertem em diferentes escalas de tempo. A interação com um ligante frequentemente induz uma mudança conformacional na proteína de forma a tornar o sítio de ligação o mais complementar possível ao ligante, um processo conhecido como “induced fit”. Alternativamente, a proteína em solução está em equilíbrio entre distintas conformações sendo que apenas uma delas é espacialmente complementar ao ligante. A interação com o ligante desloca o equilíbrio conformacional no sentido da

conformação complementar, um processo conhecido como “seleção de confôrmeros” ou “modelo sequencial”.

A *hemoglobina* e a *mioglobina* foram as duas primeiras proteínas cuja estrutura tridimensional foi determinada experimentalmente. Elas transportam oxigênio. Proteínas não são capazes de coordenar oxigênio, para isso elas utilizam íons metálicos como Fe(II). O Fe(II) normalmente liga-se à proteína na forma complexada a um grupo prostético chamado *Heme*. O heme é uma protoporfirina que liga um íon  $\text{Fe}^{2+}$  (**Figura 4**). O grupo Heme está ligado não covalentemente à proteína (veja PDB 1MBO).



**Figura 4.** Grupo Heme encontrado na mioglobina e na hemoglobina. O íon  $\text{Fe}^{2+}$  faz ligações de coordenação com os quatro átomos de nitrogênio do anel. O  $\text{Fe}^{2+}$  ainda pode formar duas outras ligações de coordenação que são formadas com as histidinas proximal e distal (veja PDB 1MBO).

### Equilíbrios de ligação e cooperatividade

A mioglobina consiste de um único polipeptídeo de 153 aminoácidos. O equilíbrio de associação entre a mioglobina e uma molécula de  $\text{O}_2$  é descrito como:

$$Ka = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (1)$$

onde **P** é a proteína, **L** é o ligante, e  $k_a$  e  $k_d$  são as constantes de velocidade de associação (segunda ordem) e de dissociação (primeira ordem) do complexo. A fração de sítios ocupados pelo ligante é dada por  $\theta$ :

$$\theta = \frac{\text{fração de proteínas ligadas}}{\text{Proteína total}} = \frac{[PL]}{[PL]+[P]} = \frac{Ka[P][L]}{Ka[P][L]+[P]} = \frac{Ka[L]}{Ka[L]+1} = \frac{[L]}{[L]+K_d}, \quad (2)$$

em que  $[L]$  é a concentração de ligante total. O comportamento de  $\theta$  em função de  $[L]$  é uma hipérbole (**Figura 5**). É fácil observar que quando a proteína possui menor afinidade (maior  $K_d$ ) é necessário adicionar maior quantidade de ligante para atingir saturação (**Figura 5**). Note que  $K_d$  (constante de dissociação) é equivalente à

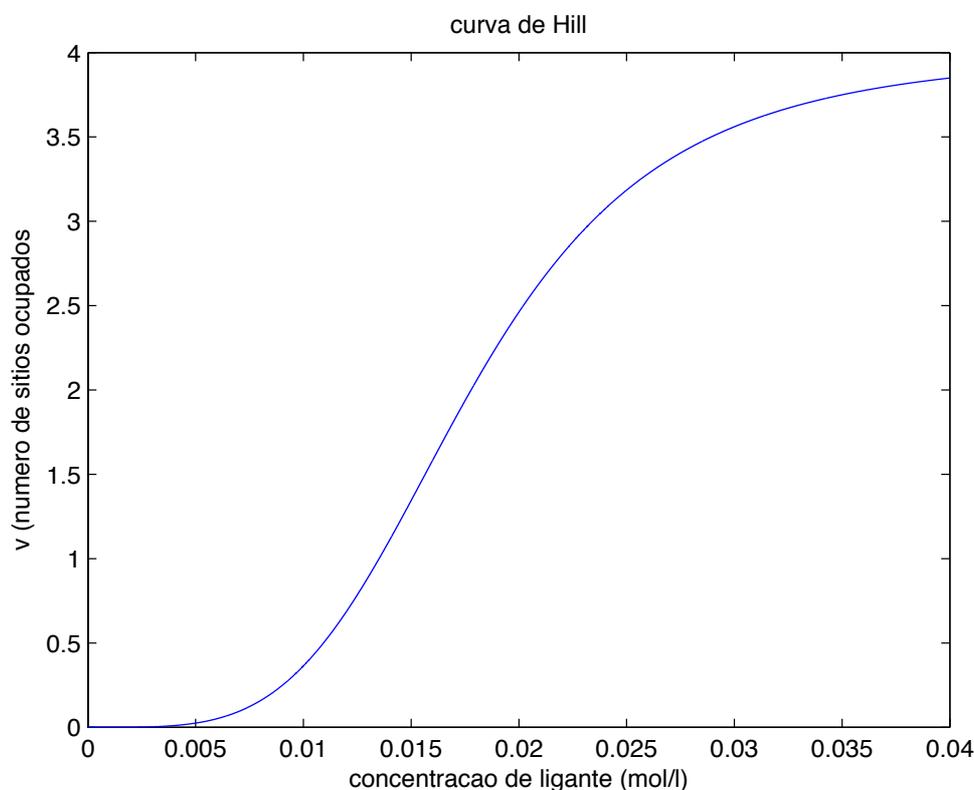


**Figura 6.** Alinhamento de sequência da mioglobina (PDB 1MBO) com as cadeias alfa e beta da hemoglobina (PDB 1HGA).

Apesar de diferenças na sequência de aminoácidos, as estruturas tridimensionais da mioglobina (PDB 1MBO) e da hemoglobina (PDB 1HGA) são muito parecidas. A hemoglobina possui quatro grupos heme, um em cada subunidade, podendo transportar até 4 moléculas de  $O_2$ .

A presença de quatro sítios de ligação e 4 subunidades afeta profundamente as características da hemoglobina como molécula carreadora de oxigênio. A curva de ligação do oxigênio na hemoglobina é sigmoide, indicando que oxigênio liga-se cooperativamente à proteína (**Figura 7**). Em um processo cooperativo, a interação do ligante com o primeiro sítio altera a afinidade do segundo sítio e assim por diante.

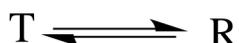
Como consequência da cooperatividade observada na curva de ligação a oxigênio, a porcentagem de saturação da hemoglobina varia muito mais rapidamente com a concentração de oxigênio do que no caso da mioglobina que não é cooperativa. Por exemplo, no equilíbrio de ligação mostrado na **Figura 7**, nota-se que para ir de 20% a 80% de saturação seria necessário aumentar a concentração de ligante apenas duas vezes, de 12.6 para 25.2 nM (**Figura 7**). Enquanto que no caso de um equilíbrio não cooperativo como exemplificado na **Figura 5**, a concentração de ligante deveria ser aumentada aproximadamente 10 vezes para aumentar a fração de sítios ocupados de 20 a 80%. Portanto, uma proteína cooperativa é muito mais sensível a pequenas alterações na concentração de ligante. Esta característica torna a hemoglobina capaz de captar oxigênio nos pulmões, onde a pressão de  $O_2$  é maior, e liberar nos tecidos onde a pressão de  $O_2$  é menor.



**Figura 7.** Curva de Hill para uma proteína com 4 sítios de ligação e  $K_d$  0.1  $\mu$ M. A concentração total de proteína é 1 mM.

A ligação cooperativa de um ligante com oxigênio em uma consequência da interação entre as subunidades. A estrutura quaternária da hemoglobina envolve um grande número de interações fracas (eletrostática, ligação de hidrogênio e van der Waals) entre as subunidades alfa e beta. Estas interações são cruciais para modular a afinidade dos diferentes sítios de ligação pelo oxigênio. Como ?

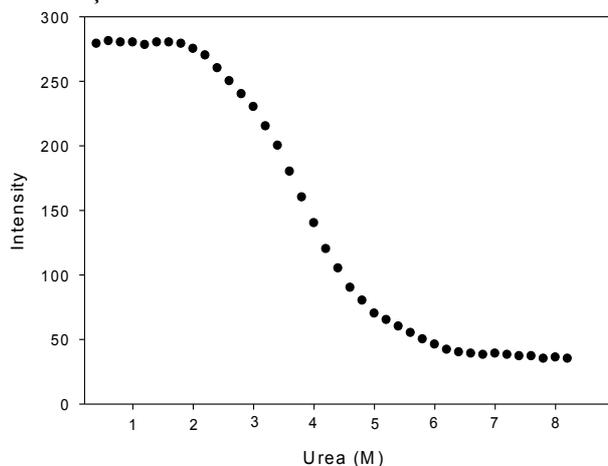
Monod, Wyman e Changeaux propuseram um modelo para explicar a cooperatividade da hemoglobina. Este modelo, chamado de “concerted model”, propõe que a hemoglobina está em equilíbrio entre um estado tenso (“T”) e outro relaxado (“R”):



O  $O_2$  liga-se mais fortemente ao estado R deslocando o equilíbrio na direção da forma “T”. Assim, quando  $O_2$  liga-se à primeira subunidades todas as outras subunidades mudam de conformação para a forma “R” concomitantemente.

### Questões

1. Analise a estrutura do inibidor de tripsina bovino (BPTI) (PDB ID 1BPI) e desenhe o diagrama de topologia para essa proteína indicando as pontes dissulfeto. Qual é a resolução desta estrutura cristalográfica? Note as diferenças entre a primeira e a última  $\alpha$ -hélice, como elas são classificadas?
2. Uma determinada proteína interage com um ligante em uma fenda na superfície. Não há nenhum átomo polar enterrado na interface proteína-ligante. Este complexo esconde um total de 400  $\text{\AA}^2$  de superfície hidrofóbica. Estime a constante de dissociação do complexo a 300 K.
3. Submeta a estrutura da acilfosfatase para o servidor DALI ([http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server/](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/)). Quais outras proteínas possuem a mesma topologia?
4. Técnicas experimentais de desdobramento de proteínas são úteis na elucidação da estrutura e das interações que mantêm o dobramento da mesma. O gráfico abaixo registra o desenovelamento de uma proteína em concentrações crescentes de uréia.

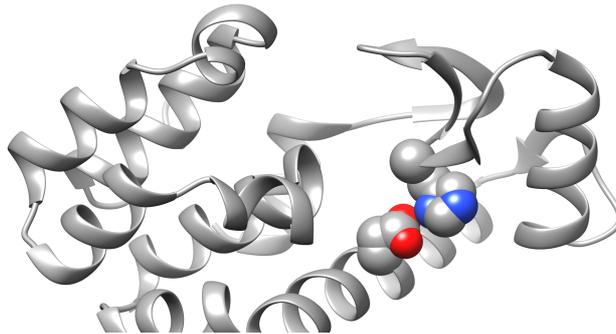


A variação de energia livre ( $\Delta G^0 = -RT \ln K$ ) da proteína em água calculada neste experimento apresentou o valor de  $\Delta G = 0.58$  Kcal/mol.

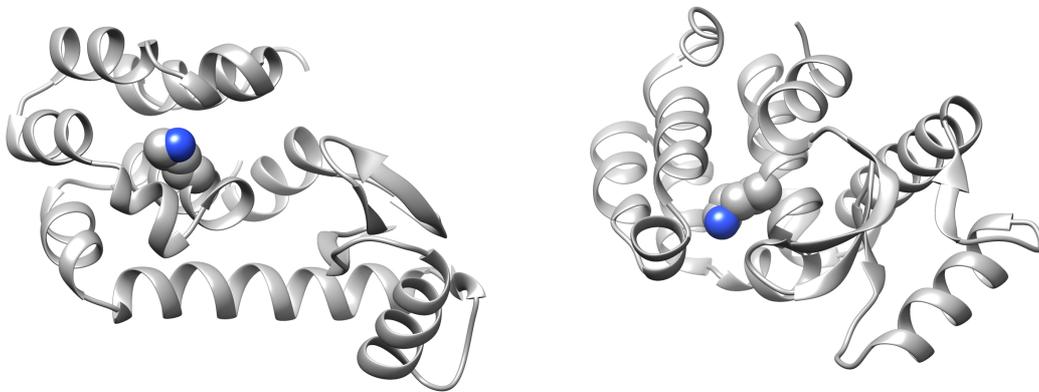
- a) Levando em consideração este valor de  $\Delta G$ , que conclusão é possível inferir sobre a estrutura da proteína?

- b) Por que é importante escolher um processo de desenovelamento que seja reversível?
- c) O desenovelamento pode ser acompanhado por análise de fluorescência, absorvância, dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear (RMN). Discuta as vantagens e/ou desvantagens e aplicações destes métodos
- d) Suponha que foi introduzida uma mutação pontual que aumenta a estabilidade da proteína. O que deve ocorrer com o gráfico acima? E o que ocorre com o gráfico se esta mutação desestabilizar a proteína?

5. A figura abaixo mostra a lisozima do fago T4 (PDB 1LYD) com destaque para a ponte salina entre a His31 e o Asp70. Desenhe uma curva hipotética de desnaturação desta enzima com uréia. Qual seria a alteração observada nesta curva caso o Asp70 fosse substituído por i) glutamina e ii) arginina?



A estrutura do mutante M102K da lisozima (PDB 1L54) é mostrada abaixo em duas orientações diferentes. Os átomos da Lys102 estão representados como esferas; eles estão inacessíveis ao solvente. Como você espera que seja a curva de desnaturação desde mutante em comparação à da enzima selvagem? Por quê?

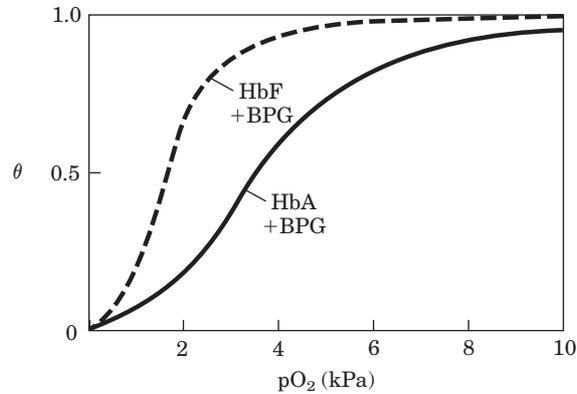


6. A proteína A interage com o ligante X com  $K_d 10^{-6}$  M. A proteína B interage com o mesmo ligante mas com  $K_d 10^{-9}$  M. Qual proteína possui maior afinidade pelo ligante X? Explique.

7. A proteína calcineurina liga-se à calmodulina com uma velocidade de associação de  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , e uma constante de dissociação,  $K_d$ , de 10 nM. Calcule a velocidade de dissociação do complexo ( $k_{off}$ ), inclua as unidades adequadas.

8. Desenhe a curva de desnaturação de uma proteína A em função da temperatura. Assuma que a proteína A seja pequena, e portanto o equilíbrio de desnaturação envolve apenas dois estados. Em seguida, suponha que um mutante foi construído. Este mutante envolve a troca de dois resíduos de Ser por Cys, de tal forma que as duas cisteínas estão próximas uma da outra na estrutura tridimensional da proteína, e formam uma ponte dissulfeto estabilizando a estrutura. Desenhe sobre o mesmo gráfico, a curva de desnaturação do mutante.

9. Estudos de transporte de oxigênio em fêmeas grávidas mostraram que as curvas de saturação com oxigênio do sangue do feto e do sangue materno são diferentes. Os eritrócitos do feto contêm uma variante estrutural da hemoglobina (HbF), que consiste de duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Enquanto que a hemoglobina da mãe (HbA) consiste de  $\alpha_2\beta_2$ . Qual hemoglobina possui maior afinidade pelo oxigênio nas condições nativas? Explique.



10. Depois de passar alguns dias em altitudes muito elevadas, a concentração de BPG nos eritrócitos aumenta. Qual será o efeito do aumento da concentração de BPG na curva de saturação da hemoglobina? Proponha uma explicação para porque essa adaptação seria benéfica para o funcionamento do organismo em altas altitudes. Desenhe gráficos para fundamentar a sua resposta.