

#### RMN de Proteínas

## RMN de proteínas



RMN trata da interação de spins nucleares com um campo magnético externo.





Cada núcleo possui uma frequência de ressonância característica devido ao seu ambiente químico

Origens do deslocamento químico



#### O experimento básico de RMN



O momento magnético resultante pode ser manipulado por pulsos de radiofrequência, gerando estados de spin que podem ser detectados na bobina da sonda.

#### O experimento básico de RMN



#### Transformada de Fourier

Uma operação matemática para converter dados que variam em tempo para dados que variam em freqüência e vice-versa



## Determinação de estruturas de proteínas de alta resolução por RMN



#### Espectros Multidimensionais permitem observar correlações entre spins de núcleos diferentes





## 2D NOESY: a principal fonte de informação estrutural

NOE: Interação dipolar através do espaço ~ 1 / r<sup>6</sup>

Providencia um alista de todos os pares de átomos separados por uma distância máxima de ~ 5 Å



Também: -acoplamentos <sup>3</sup>J -RDCs



## RMN PERMITE ESTUDAR A ESTRUTURA EM SOLUÇÃO



## Proteínas têm flexibilidade conformacional

## RMN PERMITE ESTUDAR A ESTRUTURA EM SOLUÇÃO

Resíduos 24-139

Resíduos 51-134



**N-terminal** 

**N-terminal** 

Proteínas têm flexibilidade conformacional

## Estruturas determinadas por RMN e cristalografia são muito similares



**Solution vs crystal structure** 

## RMN permite estudar interações entre proteínas



## RMN permite estudar interações entre proteínas



## Átomos de VirB7 perturbados pela VirB9



#### RMN permite estudar exposição de sítios específicos ao solvente

### Cinética de troca <sup>1</sup>H - <sup>2</sup>H (H-D) por RMN



![](_page_16_Figure_3.jpeg)

![](_page_17_Figure_0.jpeg)

## Troca H-D

![](_page_18_Figure_1.jpeg)

![](_page_19_Picture_0.jpeg)

![](_page_19_Picture_1.jpeg)

![](_page_19_Picture_2.jpeg)

#### X-rays

Wilhelm Conrad Röntgen (Nobel Prize in physics, 1901), Max von Laue (Nobel Prize in physics, 1914), and father and son Sir William Henry Bragg and William Lawrence Bragg (Nobel Prize in physics,1915): The prizes were awarded to these 4 persons for their contribution to the discovery of X-rays, understanding their nature as electromagnetic waves and their use in revealing the atomic structure of matter.

![](_page_19_Figure_5.jpeg)

## $n\lambda = 2dsin\theta$

![](_page_20_Picture_0.jpeg)

#### Linus Pauling,

Nobel Prize in chemistry 1954, California Institute of Technology (Caltech) Pasadena, CA, USA. b 1901, d. 1994

"for his research into the nature of the chemical bond and its application to the elucidation of the structure of complex substances".

![](_page_20_Picture_4.jpeg)

![](_page_20_Picture_5.jpeg)

![](_page_20_Picture_6.jpeg)

![](_page_21_Picture_0.jpeg)

#### Max Ferdinand Perutz (b. 1914, d. 2002) and John Cowdery Kendrew (b. 1917, d. 1997). Nobel Prize in Chemistry 1962. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom.

![](_page_21_Picture_2.jpeg)

The Nobel Prize in Chemistry 1962 "for their studies of the structures of globular proteins"

![](_page_22_Picture_0.jpeg)

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962 was awarded jointly to **Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson** and **Maurice Hugh Frederick Wilkins** "for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material".

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

![](_page_22_Figure_3.jpeg)

![](_page_23_Picture_0.jpeg)

#### **Dorothy Crowfoot Hodgkin**

(b. 1910, d. 1994) Nobel Prize in Chemistry 1964. University of Oxford, Royal Society, Oxford, United Kingdom.

The Nobel Prize in Chemistry 1964 was awarded "for her determinations by X-ray techniques of the structures of important biochemical substances".

![](_page_23_Picture_4.jpeg)

![](_page_23_Picture_5.jpeg)

![](_page_24_Picture_0.jpeg)

The Nobel Prize in Chemistry 1988 "for the determination of the three-dimensional structure of a photosynthetic reaction centre"

![](_page_24_Figure_2.jpeg)

Johann Deisenhofer (b. 1943), University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, USA; Howard Hughes Medical Institute;

Robert Huber (b. 1937) & Hartmut Michel (b. 1948); Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Federal Republic of Germany

![](_page_25_Picture_0.jpeg)

# Structure and function of ionic and water channels, 2003

![](_page_25_Figure_2.jpeg)

#### Peter Agre & Roderick MacKinnon,

Nobel prize in Chemistry 2003 or discoveries concerning channels in cell membranes

#### Roger Kornberg,

Nobel prize in Chemistry, 2006 for his studies of the molecular basis of eukaryotic transcription

![](_page_26_Picture_2.jpeg)

![](_page_26_Figure_3.jpeg)

![](_page_27_Picture_0.jpeg)

![](_page_27_Picture_1.jpeg)

![](_page_27_Picture_2.jpeg)

Venkatraman (Venki) Ramakrishnan, Thomas A. Steitz, and Ada Yonath 2009 Nobel prize in chemistry, for studies of the structure and function of the ribosome.

![](_page_28_Picture_0.jpeg)

![](_page_28_Picture_1.jpeg)

The Nobel Prize in Chemistry 2012 was awarded jointly to Robert J. Lefkowitz and Brian K. Kobilka *"for studies of Gprotein-coupled receptors"* 

![](_page_28_Picture_3.jpeg)

## Crystal structure of the entire respiratory complex I | NATURE | VOL 494 | 28 FEBRUARY 2013

Rozbeh Baradaran<sup>1</sup>, John M. Berrisford<sup>1</sup><sup>†</sup>, Gurdeep S. Minhas<sup>1</sup> & Leonid A. Sazanov<sup>1</sup>

![](_page_29_Figure_2.jpeg)

![](_page_30_Picture_0.jpeg)

![](_page_31_Picture_0.jpeg)

![](_page_32_Picture_0.jpeg)

#### PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY

![](_page_33_Picture_1.jpeg)

![](_page_34_Picture_0.jpeg)

Cristais proteicas possuem 25-75% água

![](_page_35_Picture_1.jpeg)

![](_page_36_Picture_0.jpeg)

Membrane phospholipid

Detergent

**Q** Amphiphile

![](_page_37_Picture_0.jpeg)

![](_page_38_Figure_0.jpeg)

![](_page_39_Figure_0.jpeg)

<sup>©</sup> Garland Science 2010

![](_page_40_Picture_0.jpeg)

![](_page_41_Picture_0.jpeg)

![](_page_42_Picture_0.jpeg)

 $\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h} \sum_{k} \sum_{l} \left| F_{hkl} \right| e^{-2\pi i (hx + ky + lz - \Phi_{hkl})}$ 

![](_page_43_Figure_1.jpeg)

Espaço recíproco (h, k, l)

#### A mapa de densidade eletrônica é o FT da padrão de difração

![](_page_44_Figure_1.jpeg)

#### A padrão de difração é o FT da mapa de densidade eletrônica

![](_page_45_Figure_0.jpeg)

**Figure 5.3** (a) Structure-factor pattern (top) calculated from a simple model (bottom). (b) Fourier transforms of individual reflections from a. Red is positive electron density, blue is negative. (c) Sums of FTs from b. In each square, the FT of one reflection is added to the sum above it.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h} \sum_{k} \sum_{l} F_{hkl} e^{-2\pi i (hx+ky+lz)}$$

$$F_{hkl} = \int_x \int_y \int_z \rho(x, y, z) e^{2\pi i (hx + ky + lz)} dx dy dz$$

The FT of *any single reflection* will look like this: a repetitive rise and fall of electron density that is the average electron-density along the set of Miller planes that share their indices with that specific reflection.

When the FTs of two or more reflections are added together, we see interference between them that results in a detailed electron density map with peaks at the atomic positions.

![](_page_46_Picture_0.jpeg)

![](_page_47_Picture_0.jpeg)

\* <sup>\*</sup>

×

Determinação de Estruturas de Proteínas em Alta Resolução

## 1) Cristalografia de Proteínas

Vantagens:

- Maior resolução
- Não há limite teórico sobre o tamanho (5000 g/mol até 10<sup>7</sup> g/mol) Desvantagens:
  - Dinâmica conformacional pode não ser evidente
- Não aplicável à proteínas com grande flexibilidade conformacional
  - Difícil estudar a cinética de processos
  - Passo limitante: obter cristais que difratam

## 2) Ressonância Magnética Nuclear de Proteínas

Vantagens:

- Aplicável a proteínas pequenas (até 30 – 50 kDa, incluindo oligopeptídeos)

- Pode ser utilizado para estudar vários tipos de dinâmica conformacional com frequencias de 10<sup>-9</sup> s até 1 s
- Pode ser utilizado para estudar a cinética de processos
  - e interações e enovelamento de proteínas

Desvantagens:

- Limite de tamanho: < 30 - 50 kDa

Dicroísmo circular e Fluorescência Técnicas espectroscópicas para estudar Enovelamento e estabilidade de proteínas e suas interações Dicroísmo circular e Fluorescência Técnicas espectroscópicas para estudar Enovelamento e estabilidade de proteínas e suas interações

![](_page_50_Figure_1.jpeg)

Dicroísmo circular

![](_page_51_Picture_1.jpeg)

![](_page_52_Figure_0.jpeg)

![](_page_53_Figure_0.jpeg)

Pleated sheet

 $A = \varepsilon \mathbf{X} \mathbf{C} \mathbf{X} \mathbf{I}$ 

$$\varepsilon_{\rm L}$$
 -  $\varepsilon_{\rm R}$  =  $\Delta \varepsilon$ 

elipsidade molar residual [ $\theta$ ] (deg x cm<sup>2</sup> x dmol<sup>-1</sup>)

 $[\theta] =$  elipsidade ( $\theta$ ; mdeg)

caminho da cubeta (mm) x concentração da proteína (M) x (nº aminoácidos -1)]

- região UV-distante (170-250 nm)
- dominada pelas contribuições das ligações peptídicas
- usada para caracterizar estruturas secundárias
- região UV-próxima (250-300 nm)
- origina das cadeia laterais dos aminoácidos aromáticos
- observada somente em proteínas enoveladas quando o grupo aromático está imobilizado num ambiente assimétrico.

 Uso primário de dicroísimo circular em bioquímica é de monitorar estruturas regulares e assimétricas em biopolímeros

![](_page_56_Figure_0.jpeg)

Far UV or amide region

![](_page_57_Picture_0.jpeg)

![](_page_57_Figure_1.jpeg)

Dois requerimentos importantes para uso de CD para estimar conteúdo de estrutura secundária de proteínas:

1) O espectro deve ser adiquerido de 260 nm eté pelo menos 185nm.

2) Determinação precisa de concentração protéica (< 10% erro).

![](_page_58_Figure_3.jpeg)

![](_page_59_Figure_0.jpeg)

## Espectrofluorimetria (Fluorescência)

![](_page_60_Figure_1.jpeg)

#### Esquemática de um fluorímetro

![](_page_61_Figure_1.jpeg)

# Fluorescência intrínseca de proteínas é devido principalmente aos triptofanos

 O centro do pico e a intensidade de fluorescência são sensíveis a mudanças no ambiente do aminoácido

![](_page_62_Figure_2.jpeg)

## Fluorescência: desnaturação química e térmica

![](_page_63_Figure_1.jpeg)

![](_page_64_Figure_0.jpeg)

#### Fluorescência