

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP

FARMÁCIA BIOQUÍMICA – 015N

Reatividade de Compostos Orgânicos II

**Estrutura Primária de Proteínas:
Sequenciamento de Aminoácidos**

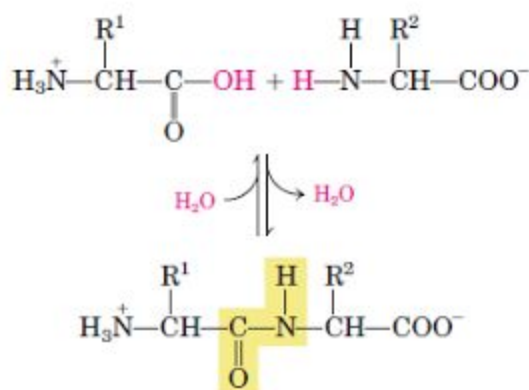
Beatriz In Soon Chang (9328183)
João Gabriel Evangelista (9370730)
Mariana Cyrino Nunes (9328116)
Sarah Gueiros da Silva (9328565)
Tayane Silva Braga (9327884)
Victória Cacita Teixeira (9380529)

São Paulo - SP
Novembro de 2016

I. Introdução

Os peptídeos são cadeias de aminoácidos

Duas moléculas de aminoácidos podem ser unidas covalentemente por meio de uma **ligação peptídica**. A ligação é formada pela remoção dos elementos da água (desidratação) de um grupo alfa-carboxila de um aminoácido e de um grupo alfa-amino de outro:



Formação da ligação peptídica

O grupo alfa-amino atua como nucleófilo, deslocando o grupo hidroxila do outro aminoácido, formando a ligação. Os grupos amino são bons nucleófilos, mas o grupo hidroxila é um mal grupo de saída. Dessa forma, para tornar a reação termodinamicamente mais favorável, o grupo carboxila precisa ser quimicamente ativado, para que seja eliminado com facilidade. A reação possui um ponto de equilíbrio que favorece os reagentes e não os produtos e, em pH fisiológico, a reação não ocorre com a formação de grande quantidade de produtos. Nos seres vivos, a ligação não é feita pela reação direta entre os aminoácidos, mas através de um grande aparato de síntese proteica, que inclui ribossomos, ácidos ribonucleicos, várias proteínas e enzimas.

A ligação peptídica possui características intermediárias entre uma ligação simples e dupla, devido às interações entre duas formas de ressonância. A consequência deste caráter parcial de dupla ligação é que não há possibilidade de rotação em torno da ligação C-N. Dessa forma, os quatro átomos dos grupamentos que participam da ligação (C, O, N e H) ficam dispostos em um plano rígido - a unidade peptídica. Por outro lado, existe a possibilidade de rotação em torno das ligações com o carbono alfa (C alfa-C e N-C alfa), que são ligações simples. Esta é uma propriedade muito importante na determinação da conformação tridimensional das cadeias polipeptídicas.

Os aminoácidos podem ser reunidos por ligações peptídicas formando dipeptídeos, tripeptídeos e quando muitos são reunidos, polipeptídeos. As proteínas podem ter milhares de unidades de aminoácidos. Os polipeptídeos são aqueles que possuem peso molecular abaixo de 10.000 e as proteínas acima disso.

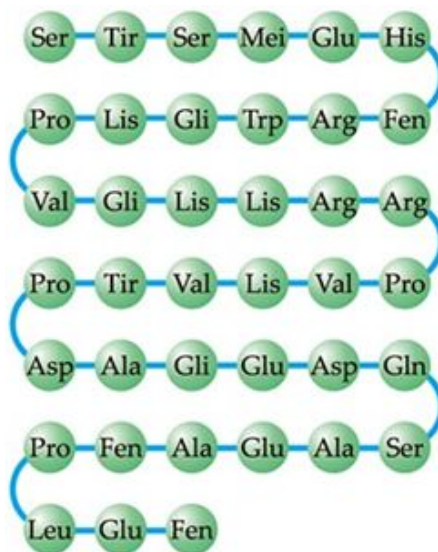
II. Sequenciamento de Aminoácidos

Determinação da estrutura primária: Sequenciamento dos aminoácidos

Quimicamente, as proteínas são polímeros de alto peso molecular formadas por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, juntamente com enxofre, fósforo e em alguns casos, ferro. São componentes essenciais a todas as células vivas e estão relacionadas praticamente a todas as funções fisiológicas.

A estrutura primária de uma proteína é definida pela sequência de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. É o nível estrutural mais simples e importante, pois o arranjo espacial da molécula deriva desse seqüenciamento. A estrutura primária pode variar em três aspectos: número, sequência e natureza dos aminoácidos.

A função de uma proteína depende de sua sequência de aminoácidos. Uma simples troca na sequência pode resultar em uma doença genética.



Estrutura primária de uma proteína

Os polipeptídeos e proteínas possuem composições de aminoácidos características

A hidrólise de peptídeos e proteínas com ácidos dá origem a uma mistura de alfa-aminoácidos. Quando totalmente hidrolisada, cada tipo de proteína fornece uma proporção ou mistura característica dos diferentes aminoácidos. Dificilmente os 20 aminoácidos se apresentam em quantidades iguais, podem aparecer uma vez na molécula ou até mesmo não existir em determinada proteína.

Purificação do polipeptídeo

Muitas técnicas como diálise, cromatografia por permeação em gel, cromatografia por troca iônica, cromatografia por afinidade e eletroforese permitem a separação de polipeptídeos de acordo com o tamanho, solubilidade em determinado solvente, carga ou capacidade de ligar-se a um suporte.

Sequenciamento do peptídeo a partir da terminação amino: Degradação de Edman

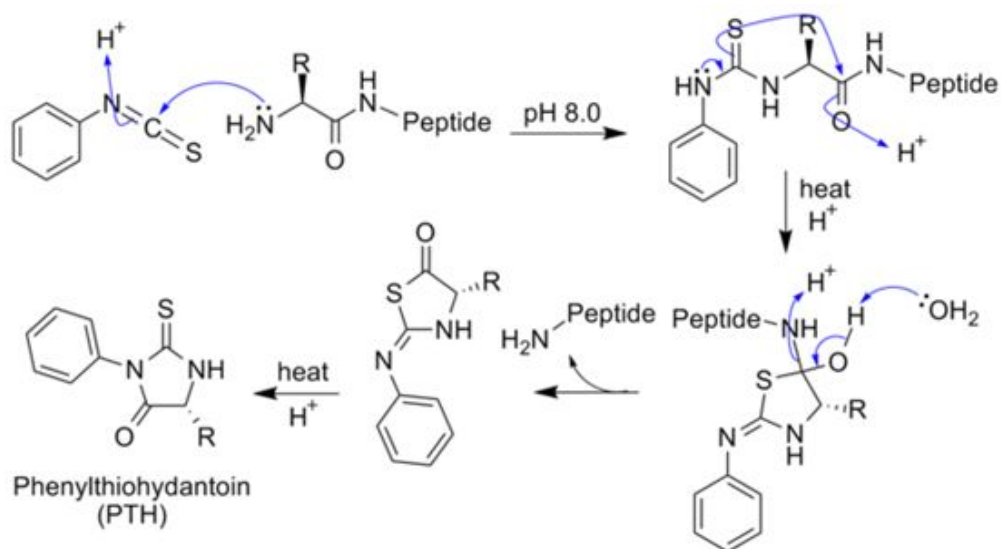
Um método conhecido para determinar a ordem em que os aminoácidos estão ligados é a degradação de Edman, utilizando como reagente o isotiocianato de fenila.

Neste método, o grupo amino N-terminal liberado adiciona-se ao isotiocianato, formando um derivado da tioureia. Ácidos fracos transformam o aminoácido livre em uma feniltio-hidantoína, deixando inalterado o resto do polipeptídeo. A nova cadeia tem agora um novo aminoácido terminal, que sofre outra degradação de Edman, e assim por diante.

Este procedimento permite a identificação em rotina de fragmentos de polipeptídeos contendo até 50 aminoácidos.

A reação de degradação tem alto rendimento, no entanto, ela não é completa, e pequenas quantidades de peptídeos que não reagiram permanecem na mistura.

Na degradação de Edman, o grupo amino terminal do aminoácido atua como nucleófilo enquanto o carbono do grupo isotiocianato é o sítio eletrofílico. Na primeira etapa ocorre o ataque do nucleófilo ($-NH_2$) ao eletrófilo ($R-N=C=S$), os elétrons da ligação entre o carbono eletrofílico e nitrogênio são deslocados para o átomo de nitrogênio que, por sua vez, retira um próton do meio para estabilizar sua carga. Em uma segunda etapa, o nitrogênio do grupo tiocianato conjuga seu par de elétrons com o carbono recém atacado, forma-se uma dupla ligação nitrogênio-carbono e há deslocamento dos elétrons da ligação carbono-enxofre para o átomo de enxofre, formando um tiolato ($R-S^-$), um nucleófilo forte; o tiolato ataca a carbonila da ligação peptídica em uma reação intramolecular, originando um anel de 5 membros. A reação prossegue como uma substituição nucleofílica na carbonila, no intermediário tetraédrico formado, o grupo amino ligado ao restante da cadeia peptídica é protonado e expulso com o retorno do par de elétrons do oxigênio, restaurando a carbonila. Por fim, a molécula remanescente sofre um rearranjo e dá origem à feniltiohidantoína (PTH).



Degradação de Edman

O fracionamento de cadeias mais longas é feito com enzimas

A degradação de Edman só permite o seqüenciamento de polipeptídeos pequenos (com até 50 aminoácidos). No caso de peptídeos maiores, quebra-se as cadeias longas em fragmentos menores, utilizando enzimas hidrolíticas.

Por exemplo, a tripsina, uma enzima digestiva, quebra os polipeptídeos somente nos grupos carbóxi da arginina e da lisina. Desta forma, um peptídeo muito longo pode ser quebrado em pedaços menores, que podem, então, ser sequenciados pelo método de Edman.

Após a primeira quebra enzimática, determina-se a seqüência dos fragmentos, mas não a ordem em que eles estão ligados. Para resolver este problema, realiza-se uma segunda hidrólise seletiva com uma enzima diferente, este processo é conhecido como superposição de peptídeos.

Espectrometria de massas

Embora a degradação de Edman ainda seja utilizada, a espectrometria de massas é atualmente o método escolhido para a determinação da seqüência de aminoácidos. Um espectrômetro de massa produz íons a partir da amostra que separados de acordo com sua massa/carga (m/z), gerando um registro (espectro) de suas abundâncias. As proteínas são fragmentadas predominantemente na ligação peptídica. Os fragmentos de peptídeos gerados diferem sequencialmente da massa de um resíduo de aminoácido e, deste modo, a sua seqüência pode ser deduzida.