

BIO0452
Proteínas: estrutura; função e biologia celular.
2018

EXERCÍCIOS - 7

Questão 1 - Compare os métodos de difração de raios x por cristais e ressonância magnética nuclear e **crio – microscopia eletrônica** quanto aos seguintes aspectos: princípios; complementaridade e limitações.

Questão 2 - Responda às seguintes questões relacionadas aos grupos ionizáveis em proteínas:

a. O pK_a do grupo tiól (R-SH) do amino ácido cisteína livre é aproximadamente 8,0. Tomando como base essa informação, qual a porcentagem de grupo tiólico desprotonado (R-S⁻) a pH fisiológico (pH = 7,0)?

(Obs.1: $\text{Cys-SH} \leftrightarrow \text{CysS}^- + \text{H}^+$, quando $\text{pH} = pK_a$, $[\text{Cys-SH}] = [\text{CysS}^-]$)

(Obs.2: $\text{pH} = pK_a + \log([\text{CysS}^-] / [\text{Cys-SH}])$, de acordo com a equação de Henderson–Hasselbalch)

b. O pK_a do grupo tiol do resíduo cisteína 32 da enzima tiorredoxina é 5,0. Neste caso, qual a porcentagem de grupo tiólico desprotonado (R-S⁻) a pH fisiológico (pH = 7,0)? Que fatores podem estar envolvidos nessa diferença de valores de pK_a entre a cisteína livre e o resíduo de cisteína inserido no polipeptídeo de tiorredoxina?

c. Entre as metodologias “cristalografia de raio x” e “ressonância magnética nuclear”, qual é a mais apropriada para o estudo de grupos ionizáveis em proteínas? Justifique.

Questão 3 - A proteína "X" foi caracterizada por várias metodologias, cujos resultados estão descritos abaixo (Figs. 1 a 3).

Espectrometria de massas

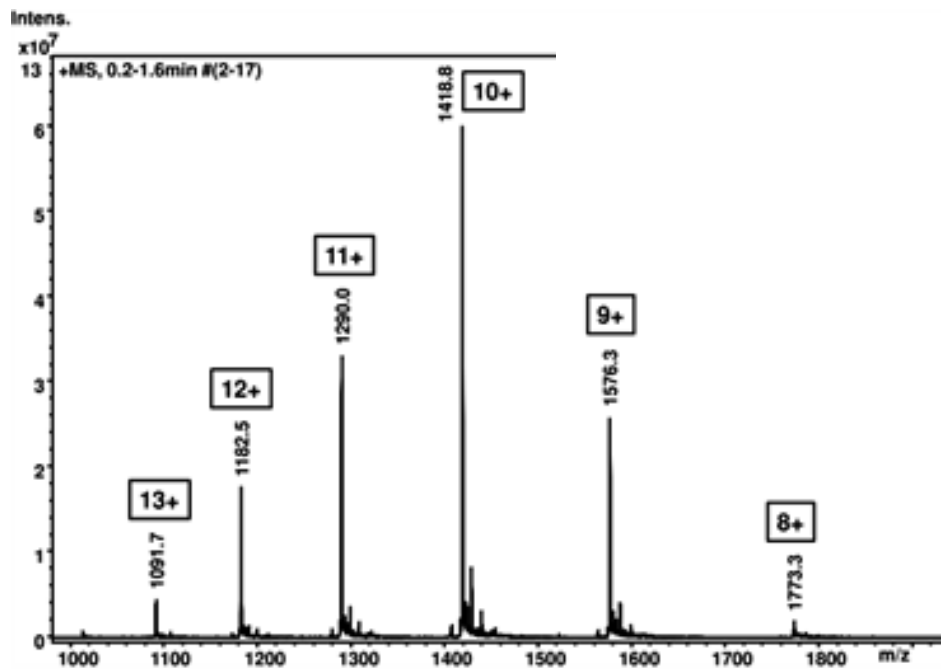


Figura 1 (Questão 3): Espectro de ESI-MS da proteína X **pura**. Os valores acima de cada um dos picos referem-se às razões massa/carga (m/z) (posição vertical) e às cargas (z) (dentro das caixas).

Cromatografia de filtração a gel

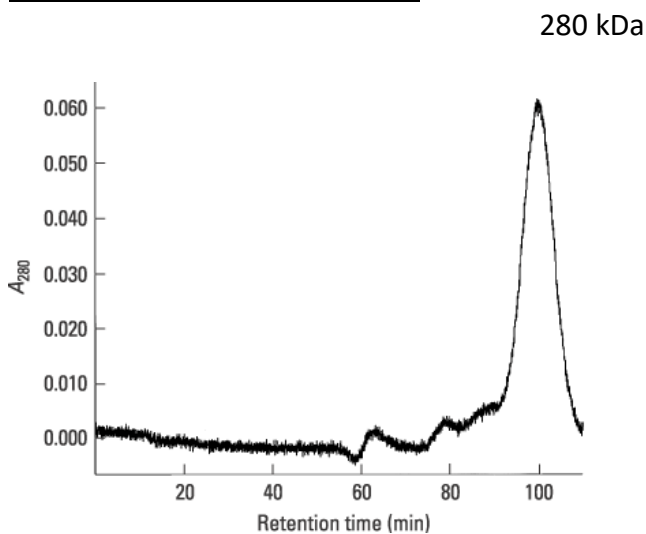


Figura 2 (Questão 3): Cromatografia de filtração da proteína X misturada a outras proteínas padrão. Com base nessas informações, estima-se que o pico da proteína X (seta) corresponde a uma massa molecular de aproximadamente 320 kDa.

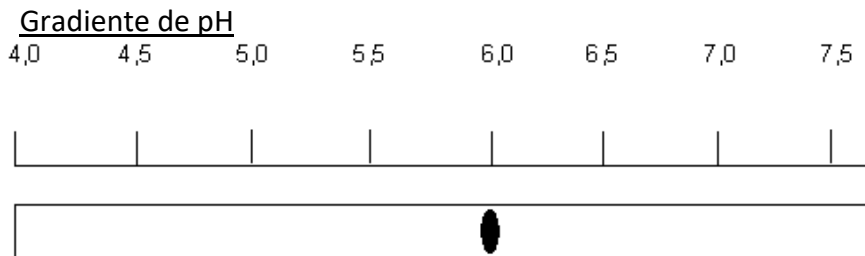


Figura 3 (Questão 3) Focalização isoeletrônica. A banda escura que aparece no gel corresponde à proteína “X”.

Com base nesses dados, responda:

- 3.1 Quais informações sobre a massa molecular, pI e grau de oligomerização proteína em questão podem ser obtidas?
- 3.2 Nesse caso, entre as metodologias “cristalografia de raio x” e “ressonância magnética nuclear”, qual é mais apropriada para a elucidação da estrutura em alta resolução da proteína X? Justifique.