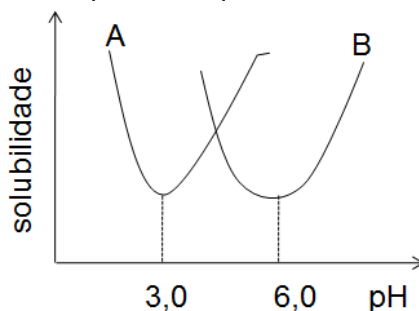


## Lista de exercícios de revisão

1.a) Os reagentes SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol são usualmente empregados em eletroforese de proteínas. Qual o papel de cada um desses reagentes?

b) Duas proteínas A e B apresentam solubilidade em função do pH dada pelo gráfico abaixo. Quando uma mistura dessas proteínas em tampão de pH 6,0 é aplicada em uma coluna de troca aniônica (troca ânions), uma delas é eluída normalmente, enquanto a outra só é eluída após adição de tampão com quantidades crescentes de NaCl.



Baseado nos dados acima, diga qual proteína é eluída após adição de NaCl, **justificando** sua resposta.

- Coluna carregada positivamente (trocadora de ânions)

- amostras em tampão pH 6:

Proteína A acima do pI (3,0), negativamente carregada. Retida na coluna e eluída com aumento da concentração de NaOH (trocador de ânions).

Proteína B no pI (6,0), carga neutra. Não gruda na coluna

c) Você é o farmacêutico responsável por uma indústria alimentícia. Entre os componentes para a fabricação de diversos produtos da indústria está a enzima alfa-amilase. Ao entrar em contato com um fornecedor para a compra de um lote da enzima para hidrolisar amido, o vendedor lhe oferece 500 g da enzima com 99% de pureza. Essa é a única informação fornecida com relação à qualidade da enzima sendo negociada. Você compraria desse fornecedor?

Antes de decidir pela compra do produto deve ser verificado se a atividade da enzima foi preservada após o processo de purificação.

Para isso o fornecedor precisa informar a atividade específica da enzima no lote. Sabendo que a pureza é de 99%, é possível verificar se a atividade enzimática é compatível com a atividade esperada para a enzima com 100% de atividade.

A atividade enzimática de uma enzima (U) é definida pela quantidade capaz de formar 1  $\mu$ mol de produto por minuto. A atividade específica corresponde a quantidade de unidades de atividade enzimática da enzima por grama de proteína (U/g).

2. Para obter um emprego de bioquímico, solicita-se que você assista a um vídeo que mostra uma colega purificando a citrato sintase a partir de coração de boi. Em determinados passos do protocolo (descrito abaixo) o entrevistador para o vídeo e lhe coloca questões. Responda as questões formuladas em *“itálico”*.

a) Vinte quilos de coração bovino são retirados de um matadouro e transportados ao laboratório em gelo. O bioquímico começa a processar os corações e realiza todas as

etapas numa câmara fria (~5 °C) ou sob gelo. O tecido cardíaco é picado, suspenso em uma solução de sacarose 0,2 M tamponada a pH 7,2 e homogeneizado com um homogeneizador de alta velocidade. *Porque foi utilizado tecido cardíaco e em grande quantidade para purificar a citrato sintase?*

*A citrato sintase é uma enzima do Ciclo de Krebs, necessário para o metabolismo aeróbico. O coração tem metabolismo aeróbico intenso e portanto rico em citrato sintase. Foi utilizado bastante tecido porque ocorre perda da proteína durante as etapas de purificação.*

*Qual o propósito de manter o tecido frio e suspendê-lo em sacarose 0,2 M a pH 7,2?*

*A baixa temperatura diminui a atividade de enzimas proteases que degradariam as proteínas presentes no tecido. A sacarose tem a função de manter a pressão osmótica equilibrada durante a homogeneização do tecido/lise celular e evitar a lise das mitocôndrias. O tampão pH 7,2 mantém o pH próximo ao pH fisiológico, de forma a evitar a desnaturação das proteínas de interesse e a manutenção da sua atividade enzimática preservada*

*O que ocorre com o tecido quando é homogenizado?*

*Ocorre a lise celular com o rompimento da membrana citoplasmática e liberação do conteúdo citoplasmático.*

b) O homogenato do tecido, que é denso e opaco, é submetido a uma série de etapas de centrifugação diferencial. *O que se consegue com esse procedimento?*

*A centrifugação diferencial em velocidades crescentes permite separar (fracionar) componentes celulares com densidades distintas. Quanto maior a densidade mais rapidamente sedimentam em uma dada velocidade.*

c) A purificação continua com a fração que contém principalmente mitocôndrias intactas. *Por que?*

*A citrato sintase se localiza nas mitocôndrias, onde ocorre o ciclo de Krebs.*

d) Essas são então lisadas osmoticamente. O lisado que é menos denso que o homogenado, mais ainda opaco, consiste principalmente de membranas mitocôndriais e conteúdo mitocôndrial interno. *Qual a finalidade da lise?*

*Liberar a citrato sintase para o exterior da mitocôndria e permitir sua separação das demais proteínas mitocondriais.*

e) Ao lisado, adiciona-se sulfato de amônio até uma concentração específica. A solução é centrifugada, o precipitado descartado e o sobrenadante recolhido. A este, que é mais claro que o lisado, adiciona-se mais sulfato de amônio. Nova centrifugação é realizada, mas desta vez, o precipitado é recolhido porque contém a proteína de interesse. *Qual o objetivo de se adicionar sulfato de amônio?*

*Cada proteína tem uma solubilidade distinta que depende de sua composição de aminoácidos. A solubilidade é afetada pelo sulfato de amônio e cada proteína precipita com diferentes concentrações de sulfato de amônio.*

*Por que a proteína precipita?*

*Proteínas se mantem em solução em meio aquoso porque as regiões polares se mantem em contato com o meio aquoso enquanto as regiões hidrofóbicas são mantidas no seu interior. O sulfato de amônio é um sal iônico e compete e remove a água de hidratação e permite que regiões hidrofóbicas agreguem e a proteína precipite. Quanto mais hidrofóbica for a proteína, menor sua solubilidade e mais facilmente precipita com a adição de sais.*

*Qual a razão para se adicionar o sal em duas etapas?*

*Na primeira etapa proteínas menos solúveis que a citrato sintase precipitam em baixas concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A adição de mais  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ao sobrenadante faz com que a proteína precipite e seja coletado no precipitado após a segunda centrifugação.*

f) O precipitado de sulfato de amônio é solubilizado e dialisado contra grandes volumes de uma solução tamponada a pH 7,2. *Qual é a finalidade da diálise?*

*Remover o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  co-precipitado e ressuspendido.*

*Por que o sulfato de amônio não é incluído no tampão de diálise?*

*o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pode prejudicar etapas subseqüentes de purificação utilizando métodos baseados na carga da proteína*

*Por que se utiliza uma solução tamponada em vez de água?*

*Para evitar a desnaturação da proteína e perda da atividade enzimática causada por variações bruscas no pH.*

g) A solução dialisada é aplicada em uma coluna de cromatografia por exclusão. A eluição das proteínas da coluna é acompanhada por medidas de absorção de luz das frações a 280 nm. A primeira fração proteica que sai da coluna é recolhida e todas as outras frações são descartadas. *Como as proteínas são separadas na cromatografia de exclusão?*

*A fase estacionaria na coluna tem poros que definem um valor de corte. Proteinas menores que o valor de corte entram nos poros e percorrem um caminho mais longo até sair da coluna. Proteínas maiores que o valor de corte passam entre os beads da resina e saem mais rapidamente da coluna. A citrato sintase deve ter alto peso molecular pois sai nas primeiras frações.*

*Por que a absorção de luz a 280 nm é uma boa maneira de se monitorar a presença de proteínas nas frações eluídas?*

*Esse comprimento de onda de UV corresponde ao máximo de absorção de luz de resíduos aromáticos das proteínas (Tyr, Phe, Trp). É possível estabelecer uma relação entre a quantidade de luz absorvida e a concentração de proteína total na amostra. Esse método espectroscópico direto é mais rápido do que a quantificação utilizando*

reagentes que se ligam a proteína e absorvem em comprimentos de luz visível (ex. Bradford)

h) Para identificar as frações contendo citrato sintase foram realizadas medidas de atividade da enzima. As frações contendo atividade citrato sintase foram reunidas e aplicadas numa coluna cromatográfica de troca catiônica. Após desprezar a solução inicial que deixa a coluna, o bioquímico adiciona uma solução de pH mais alto à coluna e colhe a fração protéica que é imediatamente eluída. Qual a razão para o bioquímico fazer isso?

Ao adicionar tampão com pH mais alto muda o estado de ionização dos grupos químicos presentes nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos das proteínas, diminuindo a sua carga líquida e a capacidade de interagir com a coluna de troca catiônica.

Qual é a carga de uma coluna de troca catiônica?

Negativa

Qual é a carga da proteína nas condições da cromatografia?

Positiva no início da cromatografia. Neutra/negativa após a adição de solução com pH mais alto.

3. Uma bioquímica conseguiu purificar uma celulase através da marcha de purificação a seguir.

1º passo: cromatografia de troca aniônica em pH 10.

2º passo: cromatografia de filtração em gel em pH 6,0.

Após cada passo os tubos que continham a atividade de celulase foram reunidos. Para esse material foi calculada a atividade enzimática total de celulase e também a quantidade de proteína. A tabela abaixo resume estes resultados.

Passo	Atividade de celulase aplicada (U)	Atividade de celulase recuperada (U)	Proteína total aplicada (mg)	Proteína total recuperada (mg)
Troca iônica	500	100	1.0	0.05
Filtração em gel	100	80	0.05	0.02

Após cada cromatografia os tubos que continham atividade de celulase também foram reunidos e analisados por SDS-PAGE. Os resultados são mostrados na Figura abaixo.

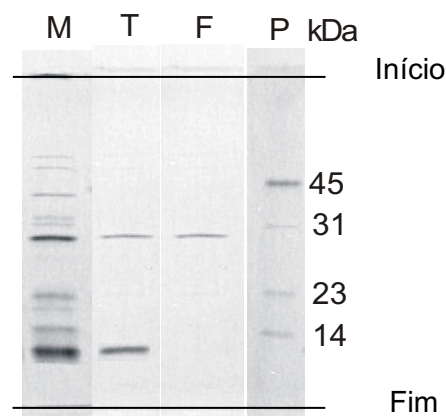


Figura. SDS-PAGE dos materiais recolhidos ao longo da marcha de purificação. M – meio de cultura; T – material recuperado após cromatografia de troca aniônica. F – material recuperado após cromatografia de filtração em gel; P – padrões de peso molecular.

Para o experimento de filtração em gel usado na marcha de purificação, primeiramente foi construída uma curva de calibração com proteínas de diferentes pesos moleculares. Os dados obtidos estão descritos na tabela abaixo juntamente com o resultado para cromatografia da celulase.

Tabela 2 – Volumes de eluição na cromatografia de filtração em gel em uma coluna cujo, volume total é 25ml.

Material	Volume de eluição (mL)
Proteína padrão de 2.000.000 daltons	7.53
Proteína padrão de 66.000 daltons	9.38
Proteína padrão de 45.000 daltons	10.46
Proteína padrão de 12.400 daltons	13.70
Proteína padrão de 6.500 daltons	16.22
ATIVIDADE CELULÁSICA	9.58

a) Calcule a recuperação da atividade enzimática após cada um dos passos da purificação da celulase.

Troca iônica:  $100/500=0,2*100=20\%$   
 Gel Filtração:  $80/100=0,8*100=80\%$   
 Recuperação total=  $80/500=0,16*100=16\%$

b) Calcule a atividade específica da celulase após cada um dos passos da marcha de purificação.

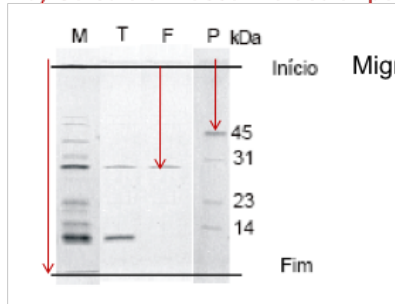
Atividade específica inicial: 500U/mg proteína  
 Troca iônica:  $100U/0,05mg = 2000U/mg$  proteína  
 Gel Filtração:  $80U/0,02 = 4000U/mg$

c) Qual dos passos é melhor na purificação desta enzima? Por quê?

O passo de troca iônica aumenta em 4x a atividade específica da proteína de interesse porem há perda de 80% da atividade enzimática. A Gel filtração aumenta em apenas 2x a atividade específica mas perde apenas 20% da atividade. Assim, cada passo tem vantagens e desvantagens. Os dois passos de purificação combinados resultam no enriquecimento de 8x na atividade específica. Seria necessário testar se a gel filtração aplicada exclusivamente resultaria no mesmo incremento de 8 x na atividade específica obtido com os passos sequenciais.

d) Calcule a massa molecular da enzima determinada por SDS-PAGE e por filtração em gel. Compare os valores e formule hipóteses para explicar os resultados.

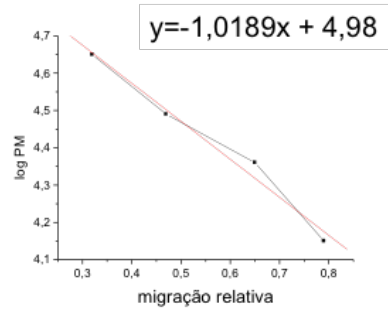
d) Calcule a massa molecular por SDS-PAGE e por filtração em gel.



$$\text{Migração relativa} = \frac{\text{migração individual}}{\text{migração total (bromofenol)}} = \frac{(1,4 \text{ cm})}{(4,3 \text{ cm})}$$

PM (kDa)	(log)	Migração relativa
45	(4,65)	0,32
31	(4,49)	0,47
23	(4,36)	0,65
14	(4,15)	0,79
<b>Celulase</b>	<b>(4,48)</b>	<b>0,49</b>

PM= 30,2 kDa



4.

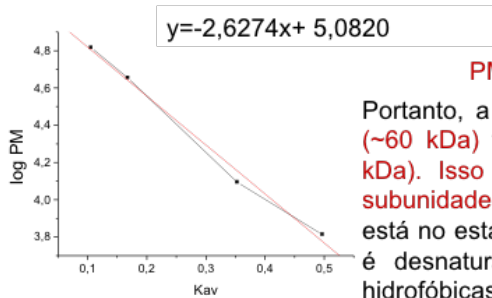
Massa molecular por filtração em gel

$$K_{av} = \frac{(V_{\text{eluição}} - V_0) (\text{exclusão})}{(V_t - V_0)}$$

$\nearrow 7,53$   
 $\searrow 25$

PM (kDa)	(log)	v.eluição(ml)	Kav
66	(4,8155)	9,38	0,106
45	(4,6532)	10,46	0,168
12,4	(4,0934)	13,70	0,353
6,5	(3,8129)	16,22	0,497
<b>Celulase</b>	<b>(4,7737)</b>	<b>9,58</b>	<b>0,1173</b>

PM 59,38 kDa



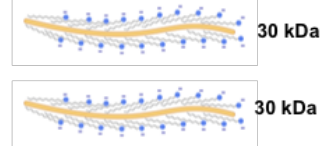
Portanto, a massa molecular determinada por filtração em gel (~60 kDa) foi 2X a massa determinada por SDS-PAGE (~30 kDa). Isso indica que a enzima nativa é um dímero de 2 subunidades de ~30 kDa. De fato, na filtração em gel a proteína está no estado nativo, enquanto que em SDS-PAGE a proteína é desnaturada em presença de SDS que rompe ligações hidrofóbicas, e no caso de gel redutor, também as ligações dissulfeto.

Filtração em gel

30 kDa

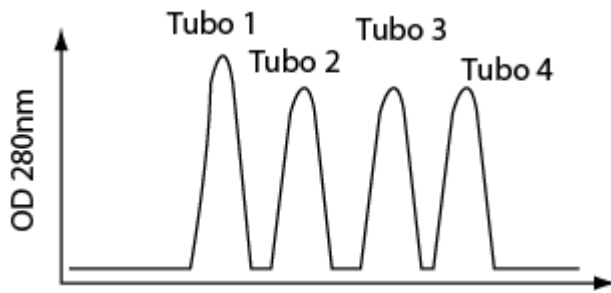
30 kDa

SDS-PAGE



5.

4. Um bioquímico recebeu uma amostra para análise. Nela, havia diversas proteínas que precisavam ser separadas umas das outras. Numa primeira etapa, o bioquímico utilizou uma coluna de gel filtração recomendada para proteínas de alto peso molecular (>60 kDa) e obteve o seguinte perfil de eluição:



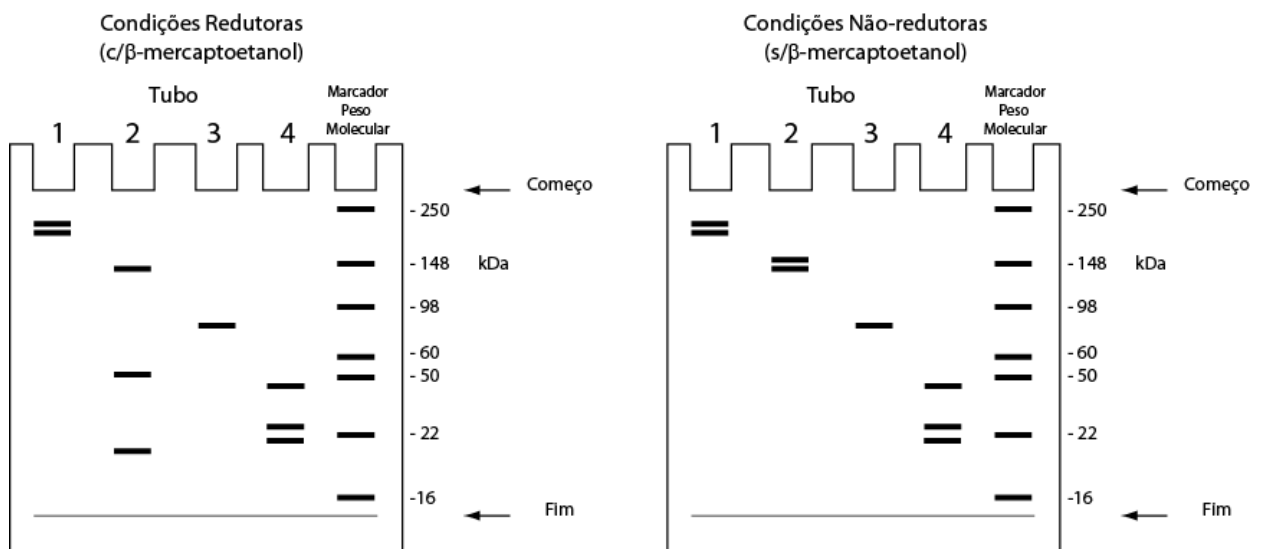
**Figura** - Perfil da cromatografia de gel filtração em Superdex-200. As proteínas separadas foram coletadas nos tubos 1, 2, 3 e 4, conforme indicado na figura. Os volumes aproximados de eluição para cada tubo foram:

Tubo 1 = 10 ml; Tubo 2 = 11 ml; Tubo 3 = 13 ml; Tubo 4 = entre 14,5 e 15 ml  
 Volumes aproximados (+/- 0,5 ml)

Usando essa mesma coluna de gel filtração, nas mesmas condições da corrida anterior, o bioquímico analisou os padrões de peso molecular, obtendo os seguintes resultados:

Padrão	Vol. Eluição (ml)
Proteína padrão de 2.000 kDa	7.53
Proteína padrão de 250 kDa	9.38
Proteína padrão de 170 kDa	10.46
Proteína padrão de 65 kDa	13.70
Proteína padrão de 24 kDa	16.22
Volume total da coluna = 25 ml	

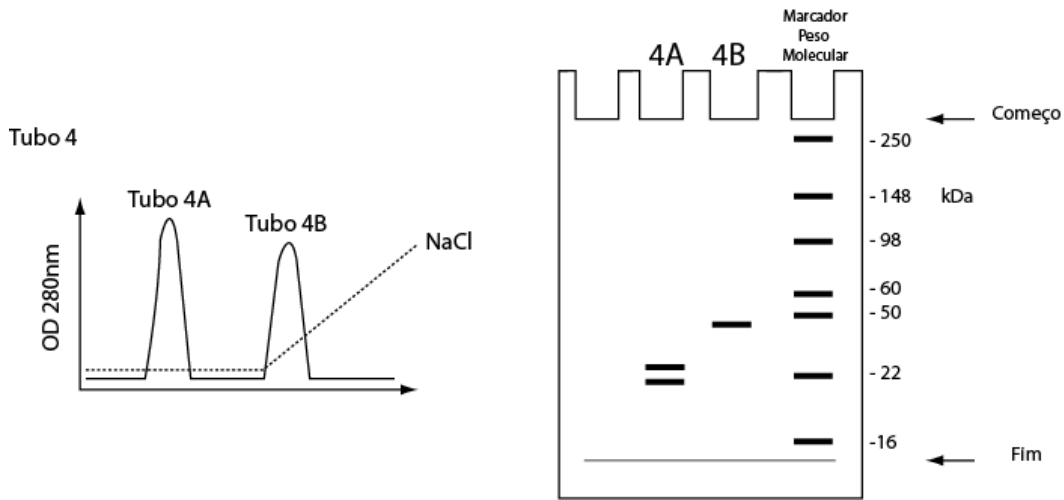
Os tubos marcados de 1 a 4 foram então analisados por SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras, sendo obtido o seguinte perfil:



**Figura** - Eletroforese de SDS-PAGE em condições redutoras (c/β-mercaptoetanol) e não redutoras das proteínas contidas nos tubos 1, 2, 3 e 4. No último poço, encontram-se os padrões de pesos moleculares.

Após analisar os dados, o bioquímico então decidiu submeter a amostra do tubo 4 a uma cromatografia de troca de ânions (-) em pH 7, seguida de eletroforese SDS-PAGE

das frações obtidas. Os resultados da cromatografia e da eletroforese estão na figura abaixo:



**Figura** - Cromatografia de troca de ânions das proteínas no tubo 4 e eletroforese das proteínas presentes nos tubos 4A e 4B.

O bioquímico deu-se então por satisfeito e escreveu o seu relatório final.

Inicialmente deve ser estimado o tamanho das proteínas eluídas nas frações da cromatografia de gel filtração e das bandas separadas no SDS-PAGE:

- Coluna de exclusão molecular  
Padrão de PM

kDa	$V_e$	$K_{av}$	log PM
2.000	$7,53=V_0$		
250	9,38	0,106	2,400
170	10,46	0,168	2,230
65	13,7	0,353	1,813
24	16,22	0,497	1,380

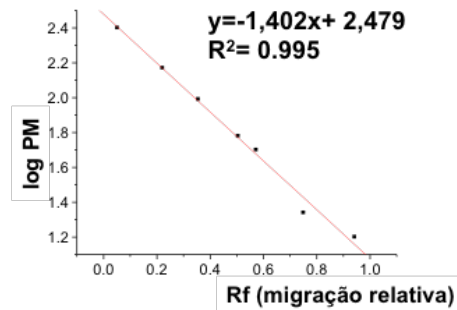
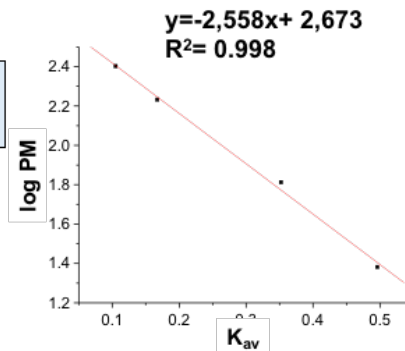
$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_r - V_0}$$

Amostra

tubos	$V_e$	$K_{av}$	log PM	PM
1	10	0,141	2,312	205.120
2	11	0,199	2,164	145.880
3	13	0,313	1,872	74.470
4	14,5	0,399	1,652	44.874
4b	15	0,428	1,578	37.844

-SDS-PAGE –Padrão de PM

kDa	Migração	Rf	log PM
250	0,21	0,052	2,400
148	0,90	0,222	2,170
98	1,44	0,356	1,991
60	2,05	0,506	1,778
50	2,32	0,573	1,699
22	3,04	0,751	1,342
16	3,82	0,943	1,204





-SDS-PAGE- Condições redutoras

<b>Tubo 1</b>	migração	Rf	Log PM	PM
banda 1	0,40	0.099	2,340	218.776
banda 2	0,50	0.124	2,305	201.837

<b>Tubo 2</b>				
banda 1	0,950	0,235	2,150	141.254
banda 2	2,27	0,560	1,694	49.431
banda 3	3,22	0,795	1,364	23.121

<b>Tubo3</b>				
banda 1	1,65	0,407	1,908	80.910

<b>Tubo 4</b>				
banda 1	2,44	0,602	1,635	43.152
banda 2	2,94	0,726	1,461	28.907
banda 3	3,1	0,765	1,406	25.468

Notas:

Para resolver essa questão é preciso considerar que:

- Algumas proteínas podem ser constituídas por mais de uma cadeia polipeptídica (proteínas multiméricas) no estado nativo. Essas cadeias são mantidas unidas por ligações covalentes (pontes dissulfeto) ou não-covalentes (interações iônicas ou interações hidrofóbicas).
- A cromatografia de gel filtração fornece o peso molecular em condições nativas.
- O SDS-PAGE é desnaturante e desfaz interações não-covalentes entre polipeptídeos que compõem uma proteína multimerica. A adição de um agente redutor no tampão de amostra (beta-mercapto etanol, DTT) desfaz pontes dissulfeto intra ou intermoleculares fazendo com que cada polipeptídeo migre individualmente no gel de acordo com seu PM. O PM estimado corresponde aos polipeptídeos individuais que compõem a proteína nativa.
- O SDS-PAGE tem maior resolução que a cromatografia de gel filtração, e resulta em valores de PM mais precisos.

a) Quantas proteínas estavam presentes na amostra?

Sete

b) Qual o peso molecular de cada uma delas?

Tubo 1: 219, 201 KDa

Tubo 2: 141, 134 KDa

Tubo 3: 80,9 KDa

Tubo 4: 45 e 44 kDa

Quais continham mais de uma sub-unidade e qual o peso molecular de cada cadeia proteica?

A proteína com PM de 134 kDa (tubo 2) apresenta 4 subunidades: 2 de ~ 49.4 e 2 de ~ 23.1 kDa ligadas por pontes dissulfeto.

A gel filtração indicou a presença de proteínas com PM > 39 KDa no tubo 4. O SDS-PAGE dessa fração indicou a presença de 3 bandas, sendo que duas delas tem tamanho em torno de 22 KDa, sugerindo a presença de uma proteína dimérica.

A cromatografia de troca iônica do tubo 4 seguida de SDS-PAGE das frações confirmou a existência de duas proteínas, uma com ~43KDa formada por uma única cadeia peptídica, e uma com PM ~ 45 KDa composta por 2 polipeptídeos ligados por interações não-covalentes (o PM dessas subunidades calculado pelo ajuste da reta está super-estimado como pode ser visto pela observação do gel).

c) Qual o pI aproximado de cada proteína do tubo 4 (maior, menor ou próximo de 7)?

A coluna de troca aniônica tem carga positiva.

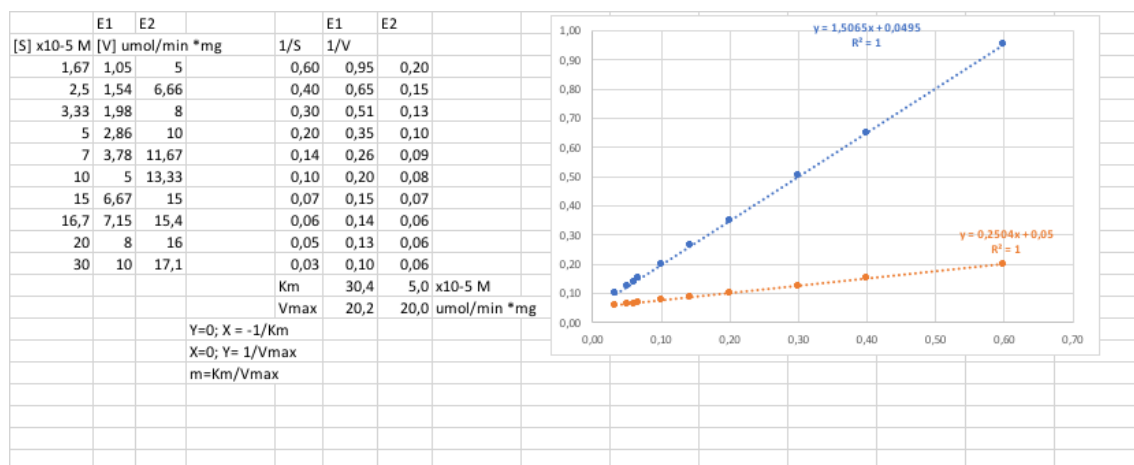
As proteínas do tubo 4A não se ligam na coluna em pH7. Portanto tem carga líquida positiva ou neutra neste pH, o que indica que tenham PI maior ou igual a 7.

A proteína do tubo 4B se liga na coluna em pH 7 e é eluída com a adição de NaCl. Portanto tem carga líquida negativa o que indica que seu PI seja menor que 7.

5. O tecido embrionário de fígado contém uma enzima que catalisa a reação  $S \longrightarrow P$ . O tecido de fígado de adultos também apresenta a mesma atividade enzimática ( $S \longrightarrow P$ ). Alguns dados cinéticos obtidos com extratos dos dois tecidos são apresentados abaixo.

[S] (M)	Velocidade Inicial Observada ( $\mu\text{-moles} \times \text{mg de proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ )	
	Extrato de Fígado Adulto (E <sub>1</sub> )	Extrato de Fígado Embrionário (E <sub>2</sub> )
	$1,67 \times 10^{-5}$	1,05
$2,5 \times 10^{-5}$	1,54	6,66
$3,33 \times 10^{-5}$	1,98	8,00
$5,0 \times 10^{-5}$	2,86	10,00
$7,0 \times 10^{-5}$	3,78	11,67
$1,0 \times 10^{-4}$	5,00	13,33
$1,5 \times 10^{-4}$	6,67	15,0
$1,67 \times 10^{-4}$	7,15	15,4
$2,0 \times 10^{-4}$	8,00	16,0
$3,0 \times 10^{-4}$	10,00	17,1

A partir dos dados acima você conclui que essas enzimas são a mesma ou são enzimas diferentes? Justifique.



Embora as enzimas tenham a mesma Vmax, o Km é diferente, indicando que têm afinidade diferente para o mesmo substrato. São portanto enzima distintas.

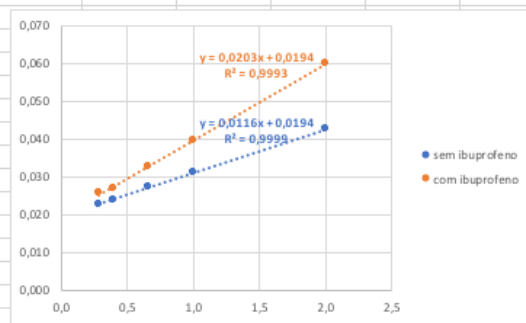
6. As prostaglandinas são responsáveis pela febre e dor associadas a processos inflamatórios. Esses mediadores são produzidos a partir do ácido araquidônico, um ácido graxo de 20 C, por meio de reações catalisadas pela prostaglandina endoperóxido

sintase. Experimentos realizados com essa enzima em ausência e em presença do ibuprofeno, um medicamento largamente utilizado, forneceram os dados cinéticos apresentados na tabela abaixo.

Ácido araquidônico mM	Velocidade (mM/min)	
	sem ibuprofeno	com ibuprofeno (0,1 mM)
0,5	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

a) Calcule o  $K_M$  e o  $V_{m\acute{a}x}$  da prostaglandina endoperóxido sintase em ausência e em presença do ibuprofeno. **Mostre os seus cálculos.**

mM	Sem		Com 0,1 mM ibuprofeno		1/S	Sem		Com	
	mM/min					1/V			
0,5	23,5	16,67			2,0	0,043	0,060		
1	32,2	25,25			1,0	0,031	0,040		
1,5	36,9	30,49			0,7	0,027	0,033		
2,5	41,8	37,04			0,4	0,024	0,027		
3,5	44	38,91			0,3	0,023	0,026		
					$K_m$ (mM)	0,6	1,0		
					$V_{max}$	51,546	51,546		
					$Y=0; X = -1/K_m$				
					$X=0; Y = 1/V_{max}$				
					$m=K_m/V_{max}$				
					$K_m\ ap = \alpha \cdot K_m$				
					$\alpha = 1 + [I] / K_i$				
					$\alpha$	1,75			
					$K_i$ (mM)	0,13			



b) Que tipo de ação tem o ibuprofeno sobre a enzima? **Justifique detalhadamente sua resposta.**

Reduz a afinidade da enzima pelo substrato ( $K_m$  aparente aumenta de 0,6 para 1 mM) sem afetar a  $V_{max}$ . É portanto um inibidor reversível competitivo.

c) Considere que a reação catalisada pela prostaglandina endoperóxido sintase possa ser simplificada pelo esquema abaixo e redesenhe o esquema em presença de ibuprofeno.



+ I



EI

d) Defina a  $K_i$  para o ibuprofeno e calcule o seu valor.

**K<sub>i</sub> , a constante de inibição, corresponde a afinidade da enzima para o inibidor.  
K<sub>i</sub> = 0,13 mM**