

# **Avaliação da Estabilidade da Conformação Nativa de uma Proteína**

Sugestões de Leitura

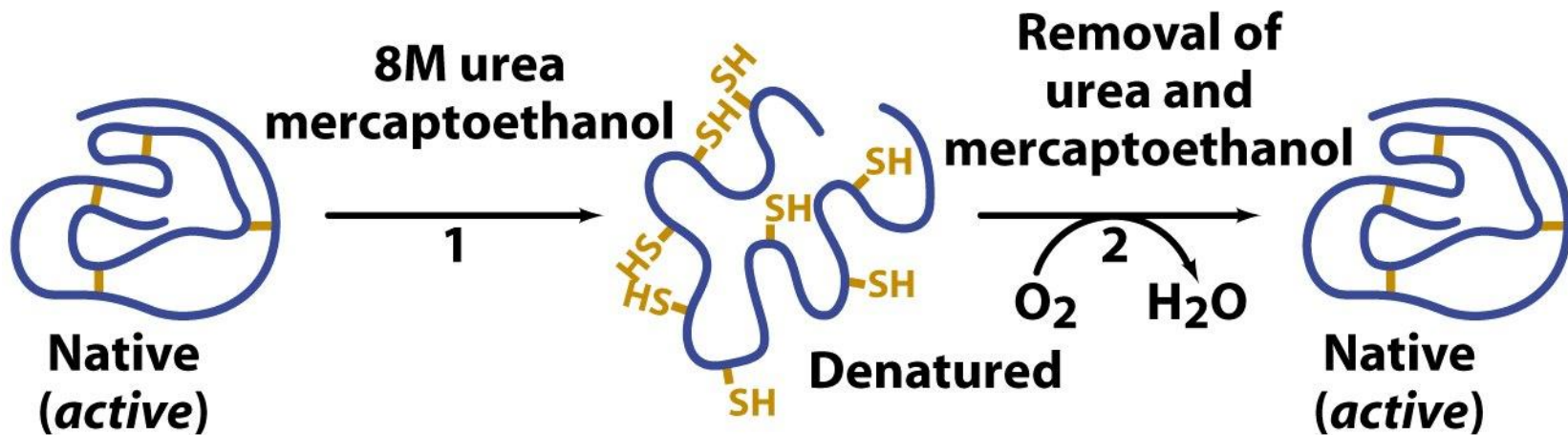
Protein Structure

T.E. Creighton (2ª edição - 1997)

Linear extrapolation method analyzing solvent denaturation curves

Pace & Shaw

Proteins: Structure, Function and Genetics Suppl 4: 1-7 (2000)

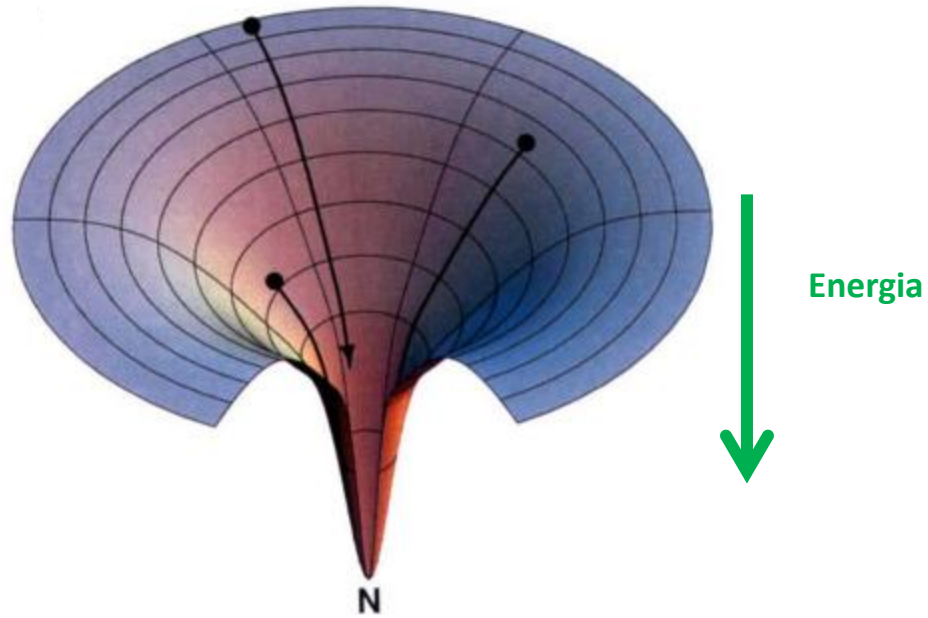


A conformação nativa da cadeia polipeptídica é termodinamicamente estável

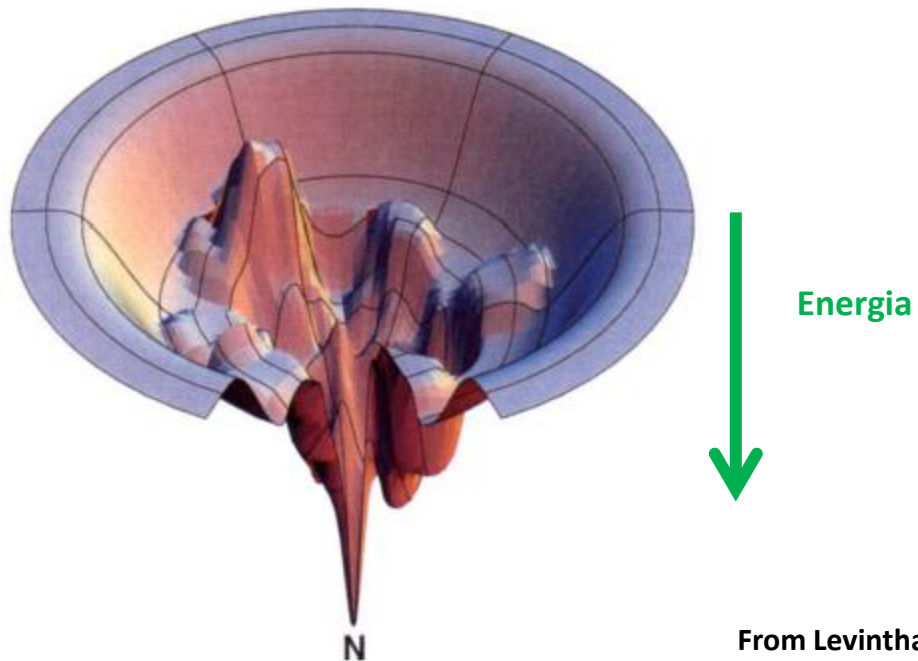
Esta conformação depende somente da estrutura primária e as condições do meio

O processo pelo qual a cadeia polipeptídica atinge a conformação nativa, o dobramento, enovelamento, *fold*ing, pode ser estudado *in vitro*

## Funil de Enovelamento



## Funil "Realista"



From Levinthal to pathways to funnels  
Dill & Chan  
Nature Structural Biology 4, 10 – 19 (1997)

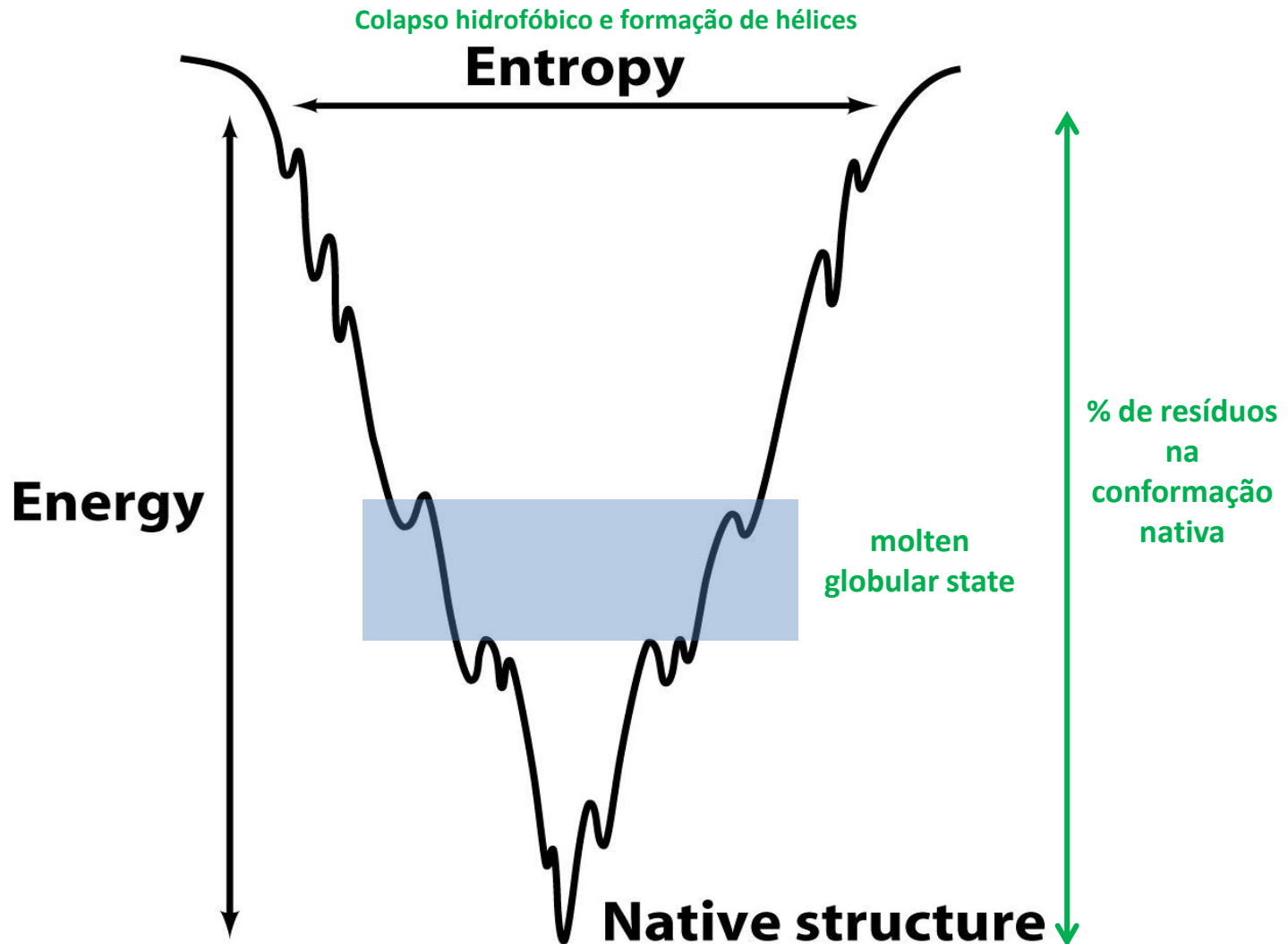
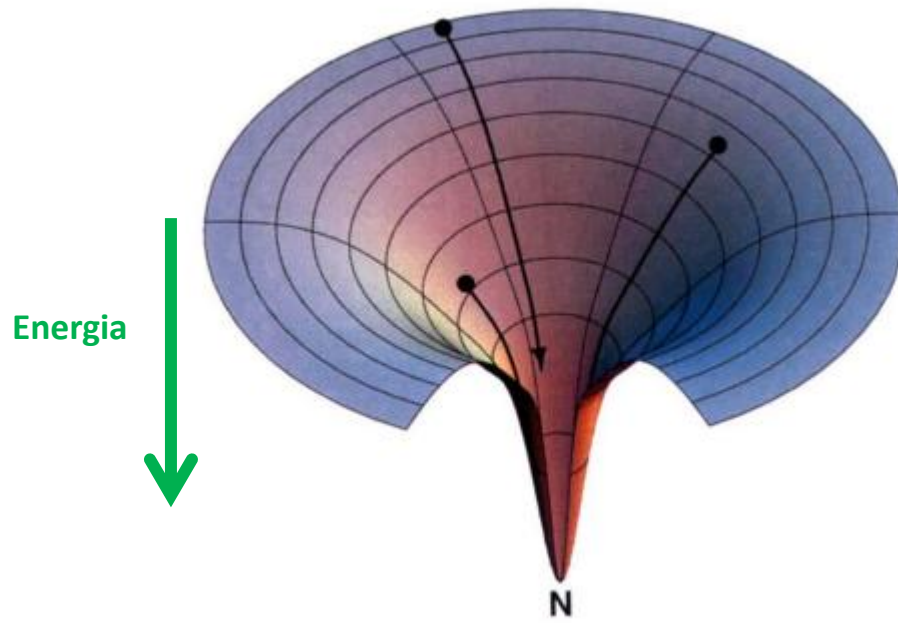
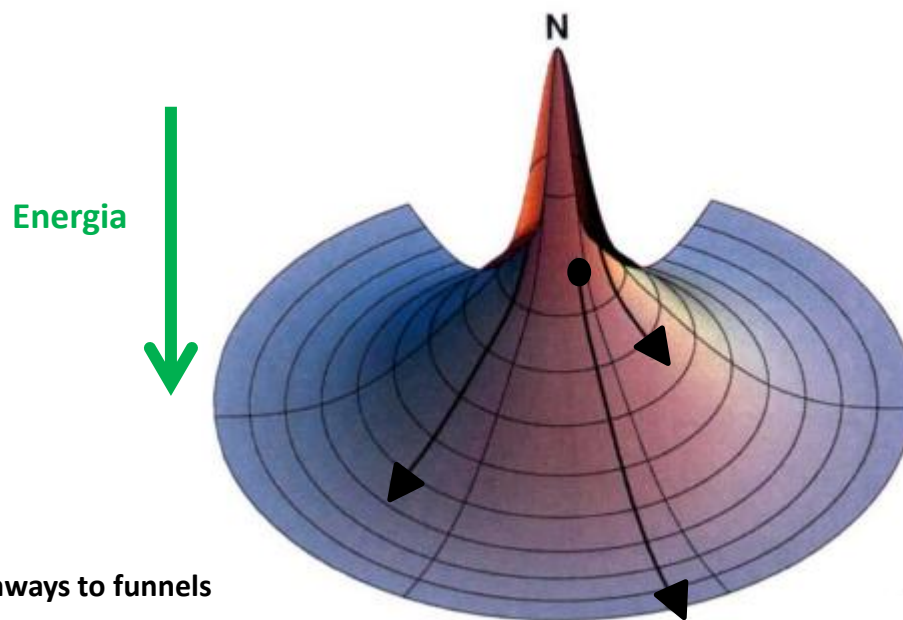


Figure 6-41 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
 © 2006 John Wiley & Sons

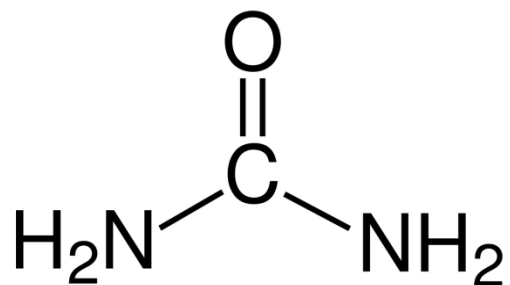
A diferença de energia ( $\Delta G^0$ ) entre a conformação nativa e a desnaturada em condições fisiológicas (25°C, pH 7, 1 atm) está na faixa de 5 a 15 kcal/mol (~ 20 a 60 kJ/mol).



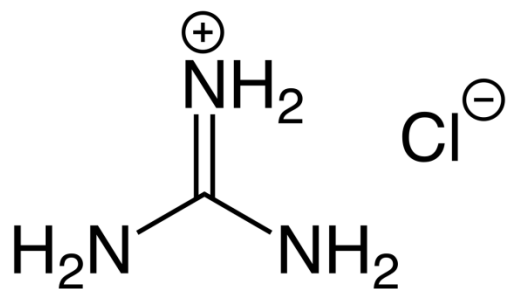
“condições nativas”



“condições desnaturantes”  
 Uréia, Cloreto de Guanidina  
 Detergentes  
 pH  
 Temperatura



Uréia

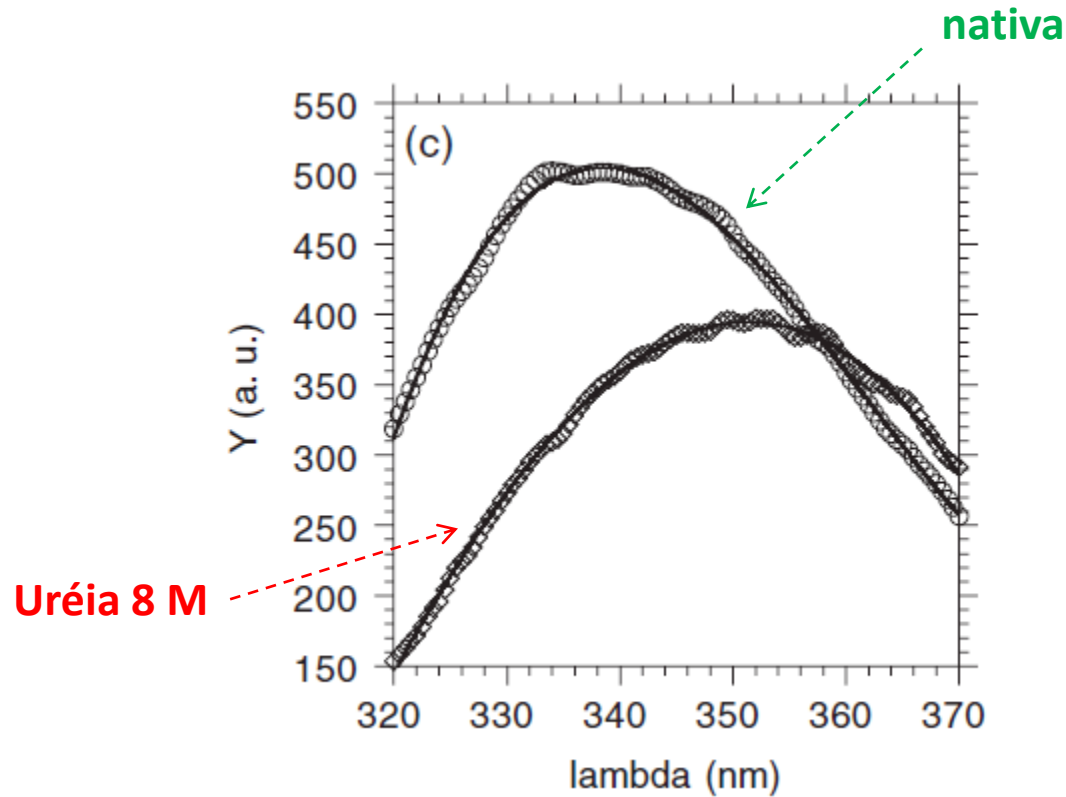
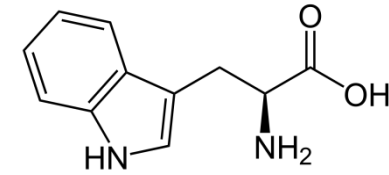


Cloreto de Guanidina

## Fluorescência de resíduos de triptofano

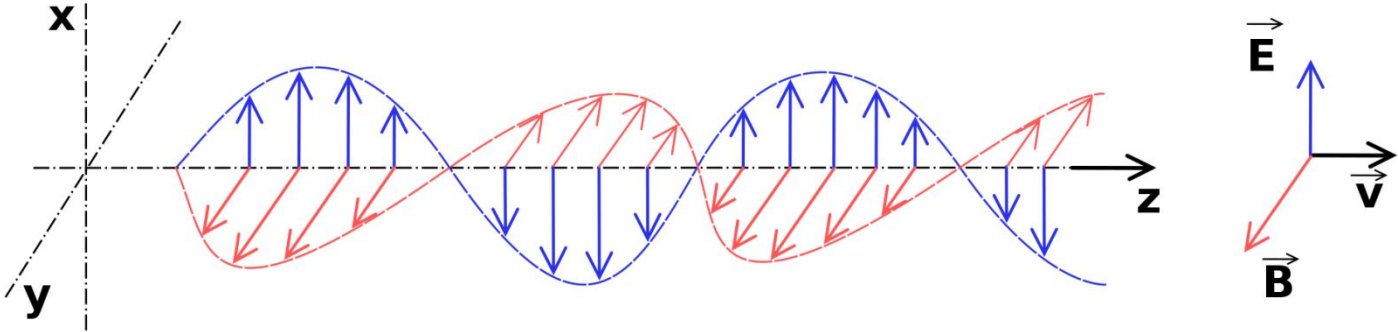
Absorção : ~ 280 nm

Emissão: dependente do microambiente (320 – 350 nm)



# Absorção diferencial de luz circularmente polarizada

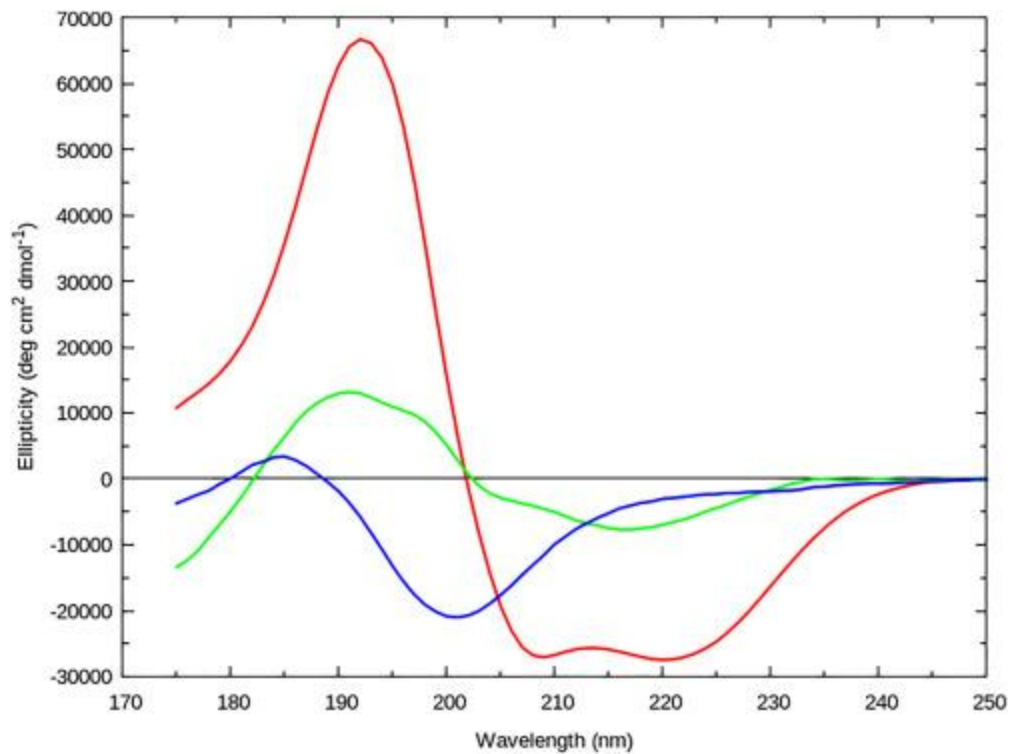
## Dicroísmo Circular - CD





# Absorção diferencial de luz circularmente polarizada

## Dicroísmo Circular - CD



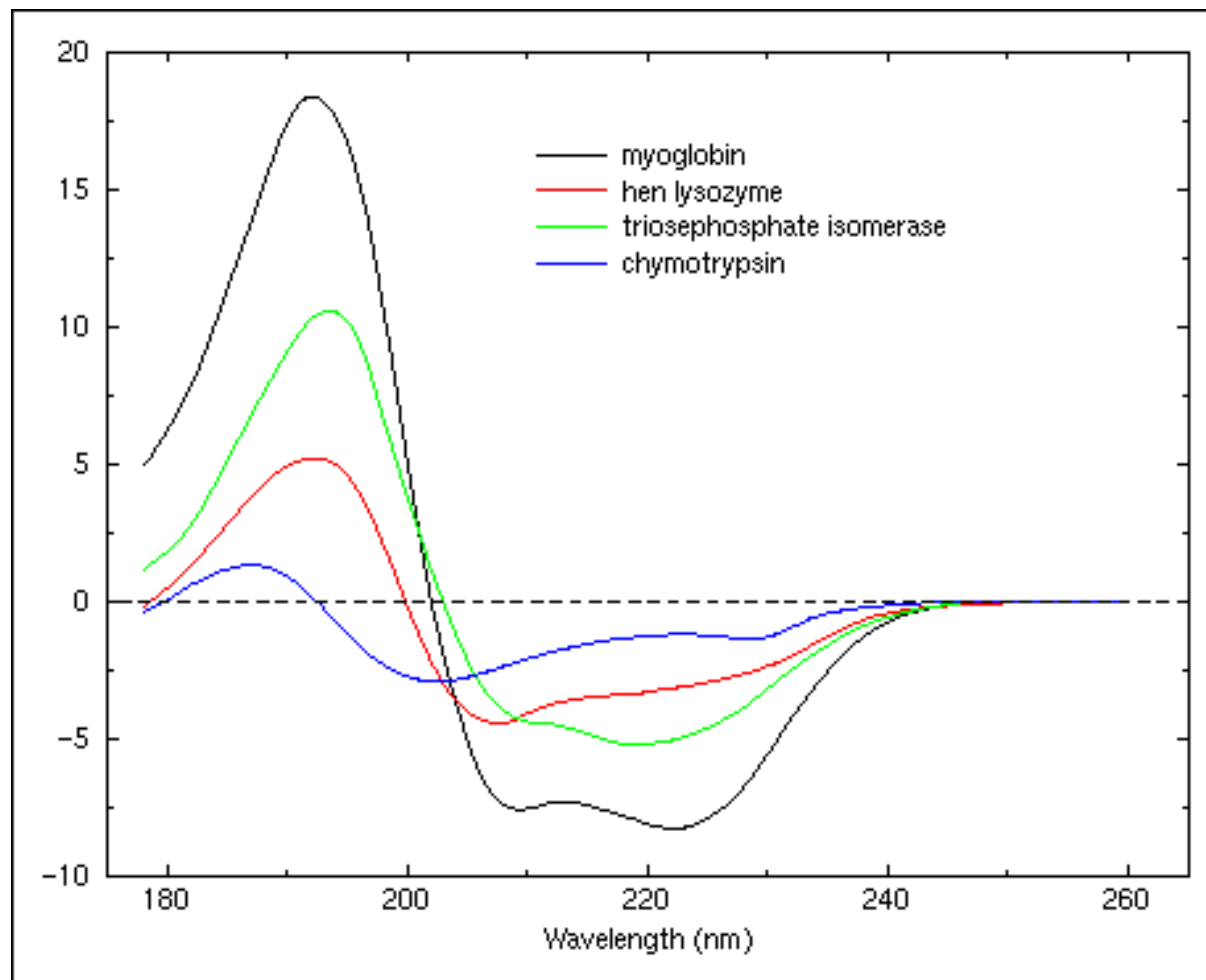
$\alpha$ -hélice  
Fita  $\beta$   
randômico

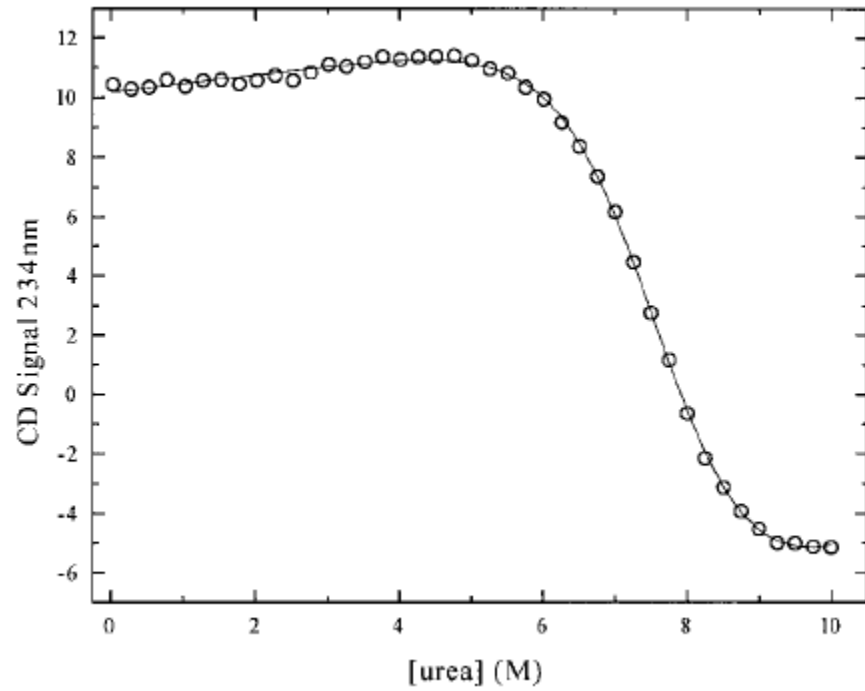
Chem 5, 2751-2774 (2019)  
Rogers et al.

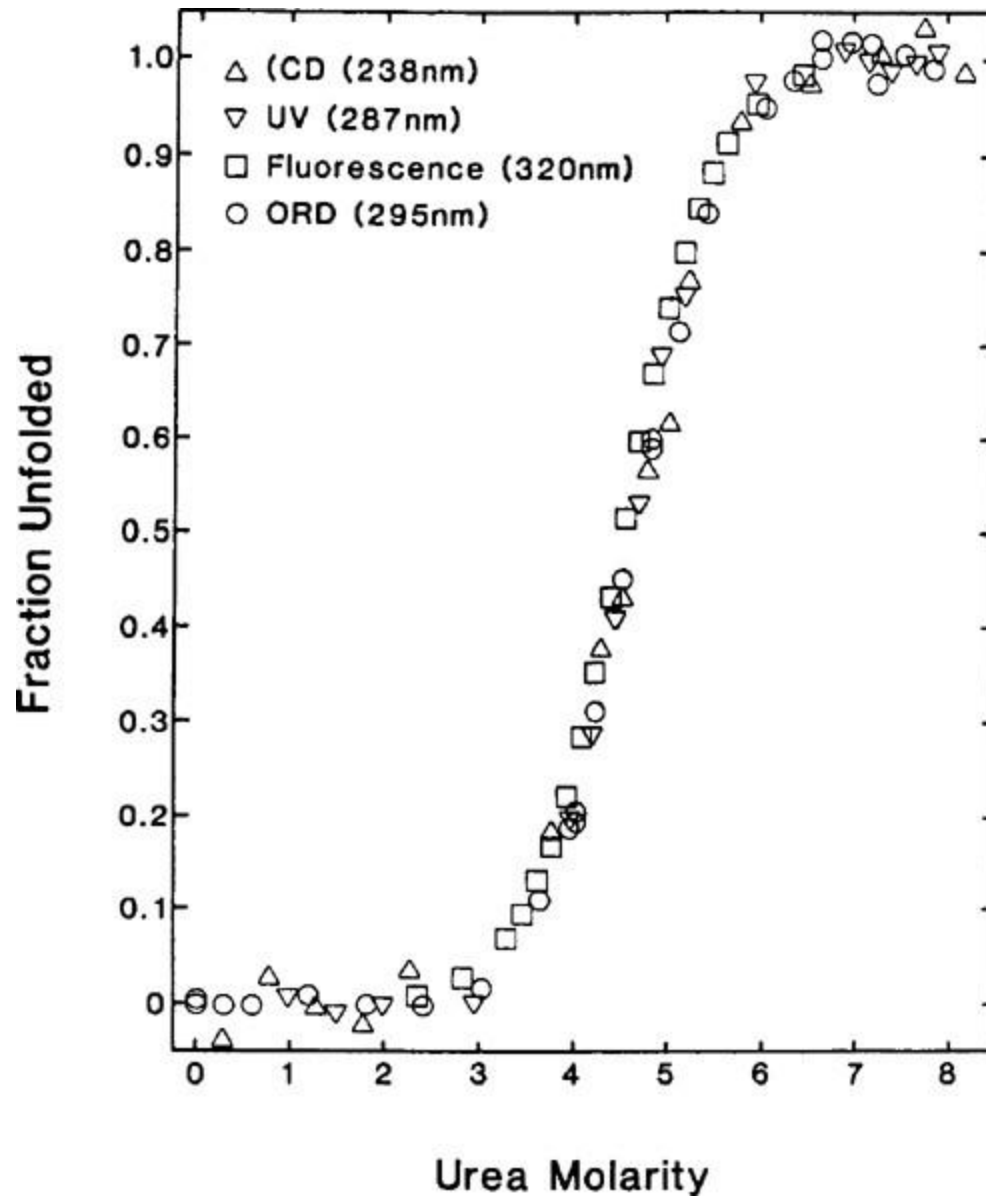
How to study proteins by circular dichroism  
Kelly, Jess and Price  
BBA 1751, 119-139 (2005)

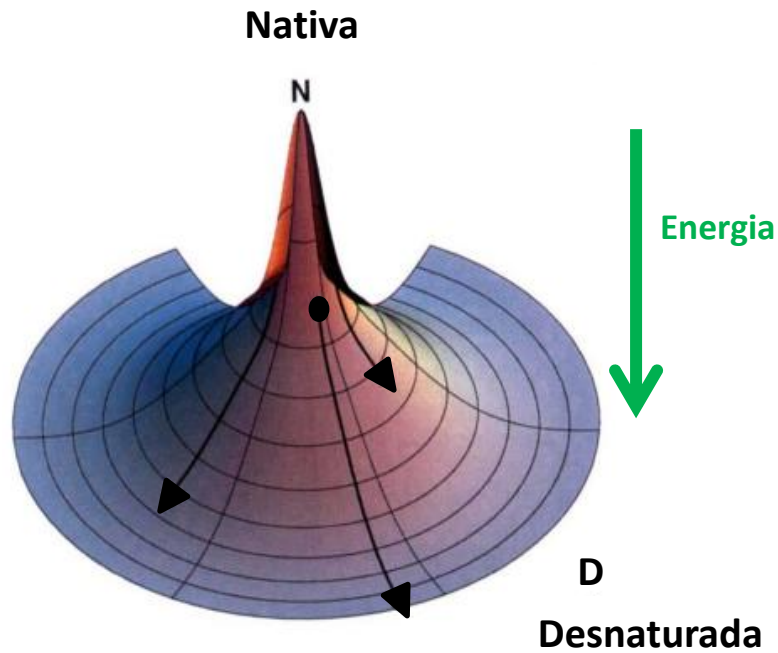
# Absorção diferencial de luz circularmente polarizada

## Dicroísmo Circular - CD

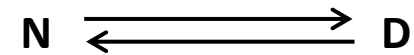








## Modelo de Desnaturação pela Transição entre Dois Estados



*Constante de Equilíbrio para o processo de desnaturação*

$$K_{\text{desnaturação}} \\ K_{\text{unfold}} (K_u)$$

$$K_u = [D] / [N]$$

$$f_N = \frac{[N]}{[N] + [D]}$$

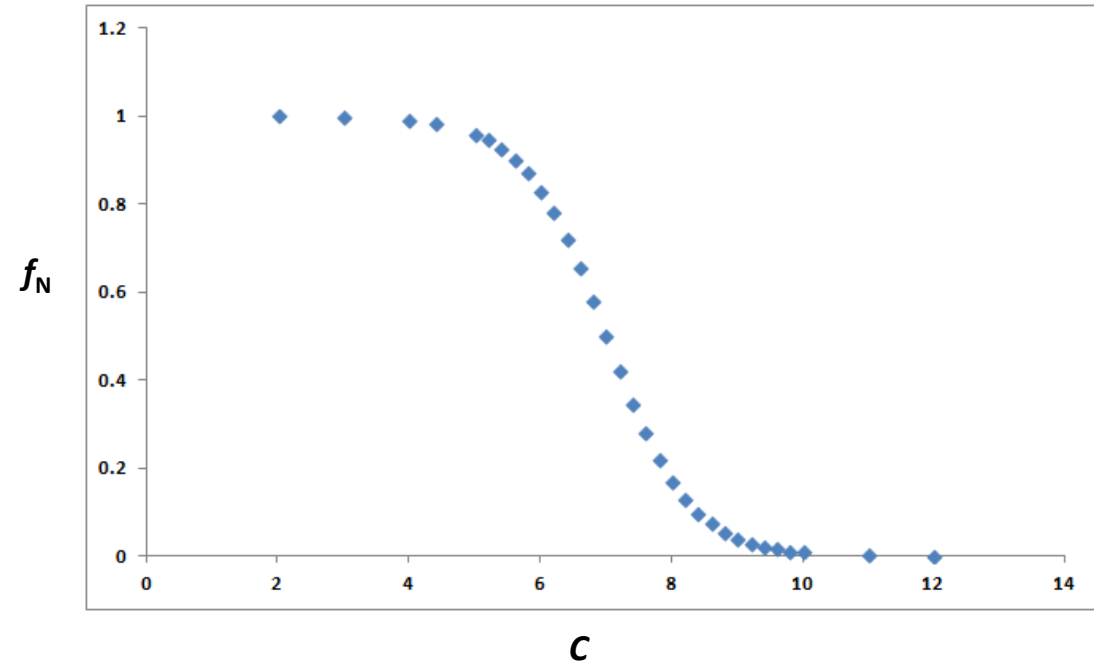
$$f_N = \frac{[1]}{[N] + \frac{[D]}{[N]}}$$

$$f_N = \frac{[1]}{1 + \frac{[D]}{[N]}}$$

$$f_N = \frac{1}{1 + K_u}$$

$$f_N = \frac{1}{1 + e^{\frac{-\Delta G_u}{RT}}}$$

Simulação de  $f_N$  em função de diferentes  $\Delta G_u$  resultantes de diferentes concentrações de desnaturante [C]



baixa [desnaturante]  $\rightarrow$  baixa [D]  $\rightarrow$  pequeno  $K_u$   $\rightarrow$   $\Delta G_u$  alto e positivo  $\rightarrow$   $e^{-\Delta G_u/RT}$  pequeno  $\rightarrow$   $f_N \sim 1$

alta [desnaturante]  $\rightarrow$  alta [D]  $\rightarrow$  grande  $K_u$   $\rightarrow$   $\Delta G_u$  alto e negativo  $\rightarrow$   $e^{-\Delta G_u/RT}$  grande  $\rightarrow$   $f_N \sim 0$

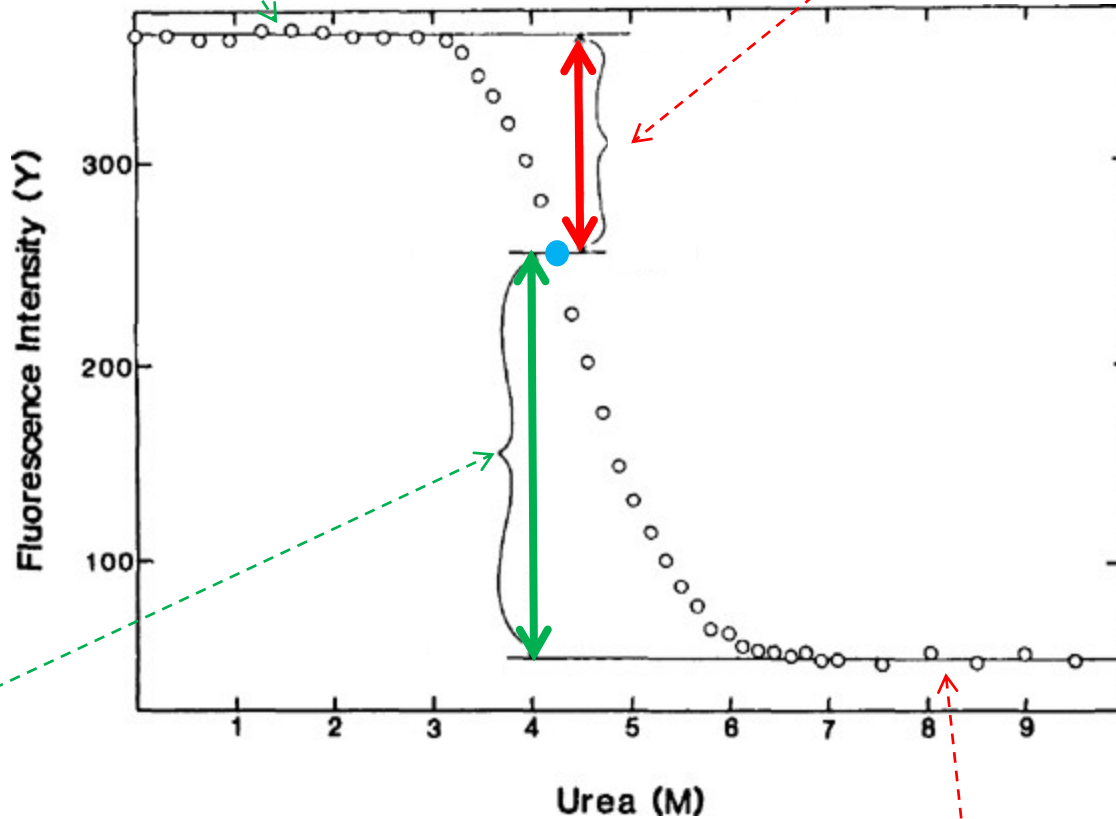
$f_u$  - fração da população de proteínas na conformação desnaturada (*unfolded*)

$$f_u = (A1 - Y) / (A1 - A2)$$

A1

patamar superior

Leitura obtida para 100% da proteína na conformação nativa



$K_{\text{desnaturação}}$   
 $K_{\text{unfold}} (K_u)$

$$K_u = [D] / [N]$$

$$[D] = [\text{proteína}]_{\text{total}} \cdot f_u$$

$$[N] = [\text{proteína}]_{\text{total}} \cdot f_f$$

$$K_u = f_u / f_f$$

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u$$

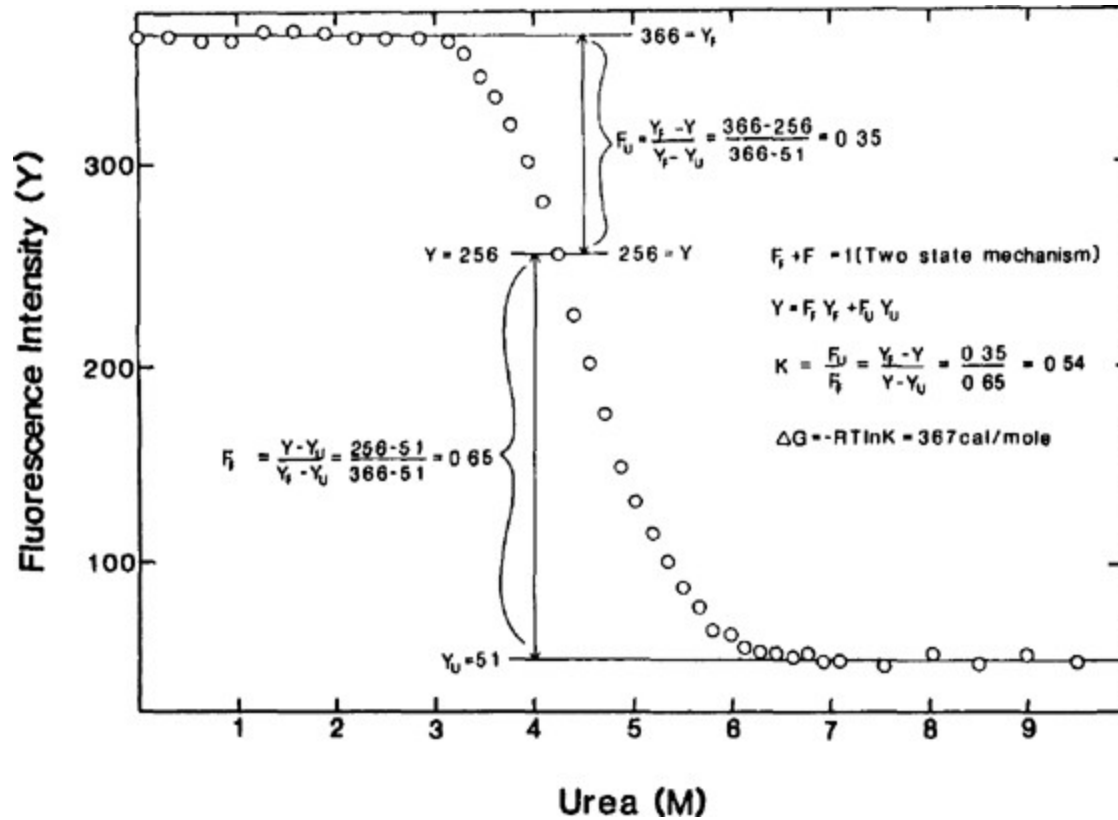
$f_f$  - fração da população de proteínas na conformação nativa (*folded*)

$$f_f = (Y - A2) / (A1 - A2)$$

A2

patamar inferior

Leitura obtida para 100% da proteína na conformação desnaturada



$K_{\text{desnaturala\c{c}o}}$   
 $K_{\text{unfold}} (K_u)$

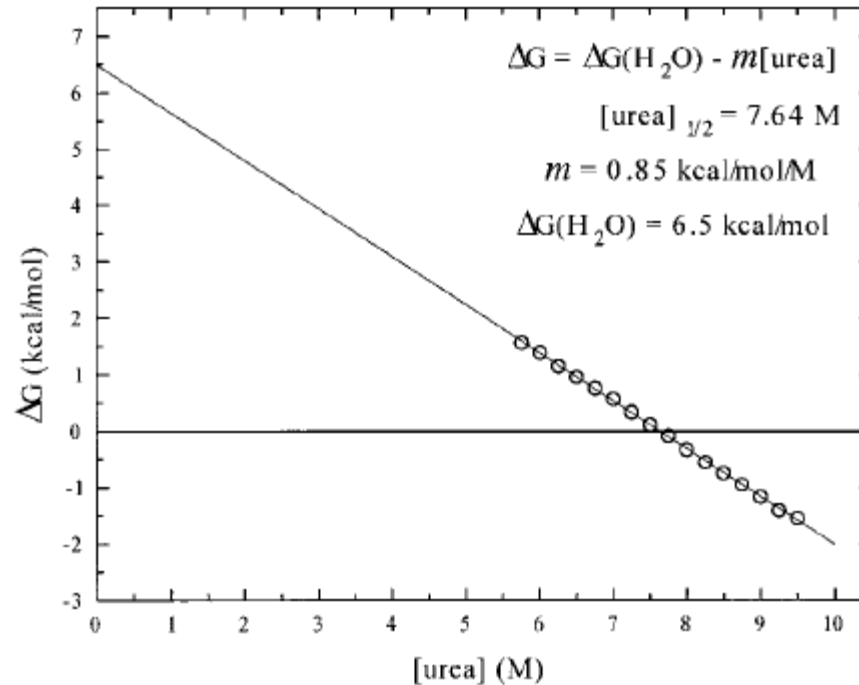
$$K_u = [D] / [N]$$

$$K_u = f_u / f_f$$

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u$$

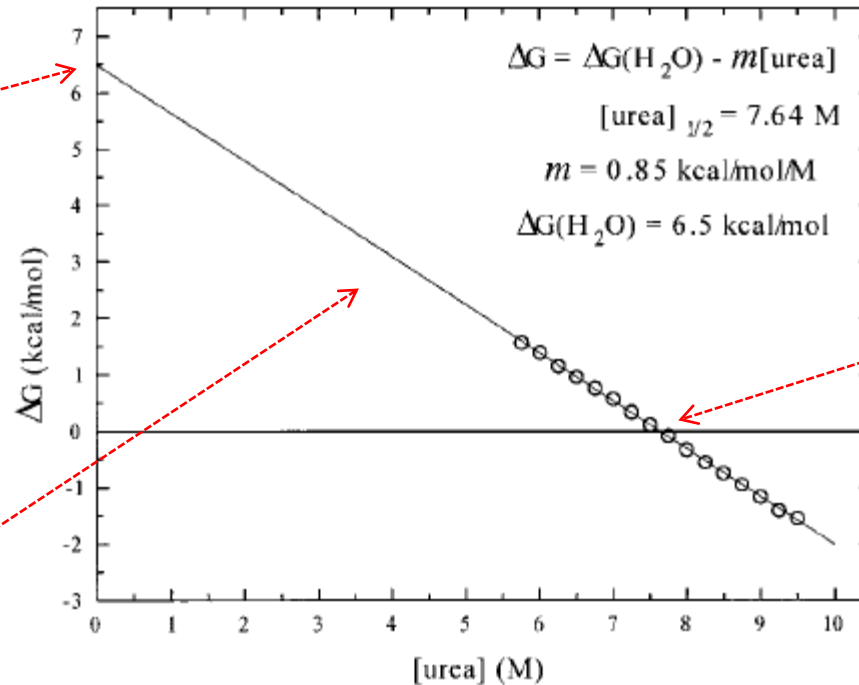


## Método da Extrapolação Linear



$$\Delta G_u = \Delta G_{H_2O} - m[C]$$

## Método da Extrapolação Linear



Intercepto no eixo y

$\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$

$C_{50}$   
Intercepto no eixo x

Inclinação  
 $m$

$$\Delta G_u = \Delta G_{\text{H}_2\text{O}} - m[C]$$

Equação da reta

$\Delta G_{H_2O}$  corresponde à diferença de energia livre entre a conformação nativa e desnaturada da proteína em meio sem desnaturante. Assim, representa a estabilidade da conformação nativa em relação à conformação desnaturada, incluindo componentes entálpicos e entrópicos. Trata-se da variação de energia livre associada ao processo de desnaturação (desenovelamento, *unfolding*) da proteína.

Parâmetro  $m$  indica a intensidade da desestabilização da conformação nativa causada pela variação na concentração de desnaturante. Este parâmetro avalia a cooperatividade na transição entre as conformações nativa e desnaturada, indicando a interdependência das interações que estabilizam a conformação nativa da proteína. Um alto parâmetro  $m$  sugere que o rompimento de apenas uma pequena fração de quaisquer interações que estabilizam a conformação nativa leva ao colapso da estrutura como um todo.

Equação que descreve o comportamento da “leitura” (y) usada para acompanhar a transição entre os dois estados (N e D)

$$f_N = \frac{[N]}{[N] + [D]}$$

$$y = A_1 \cdot f_N + A_2 \cdot f_U$$

$$f_N = \frac{[1]}{[N] + [D]}$$

$$y = A_1 \cdot f_N + A_2 \cdot (1 - f_N)$$

$$f_N = \frac{[1]}{1 + \frac{[D]}{[N]}}$$

$$y = A_1 \cdot \left( \frac{1}{1 + e^{\frac{-\Delta G_u}{RT}}} \right) + A_2 \cdot \left( 1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{-\Delta G_u}{RT}}} \right)$$

$$f_N = \frac{1}{1 + K_u}$$

$$y = \frac{A_1}{1 + e^{\frac{-\Delta G_u}{RT}}} + A_2 - \frac{A_2}{1 + e^{\frac{-\Delta G_u}{RT}}}$$

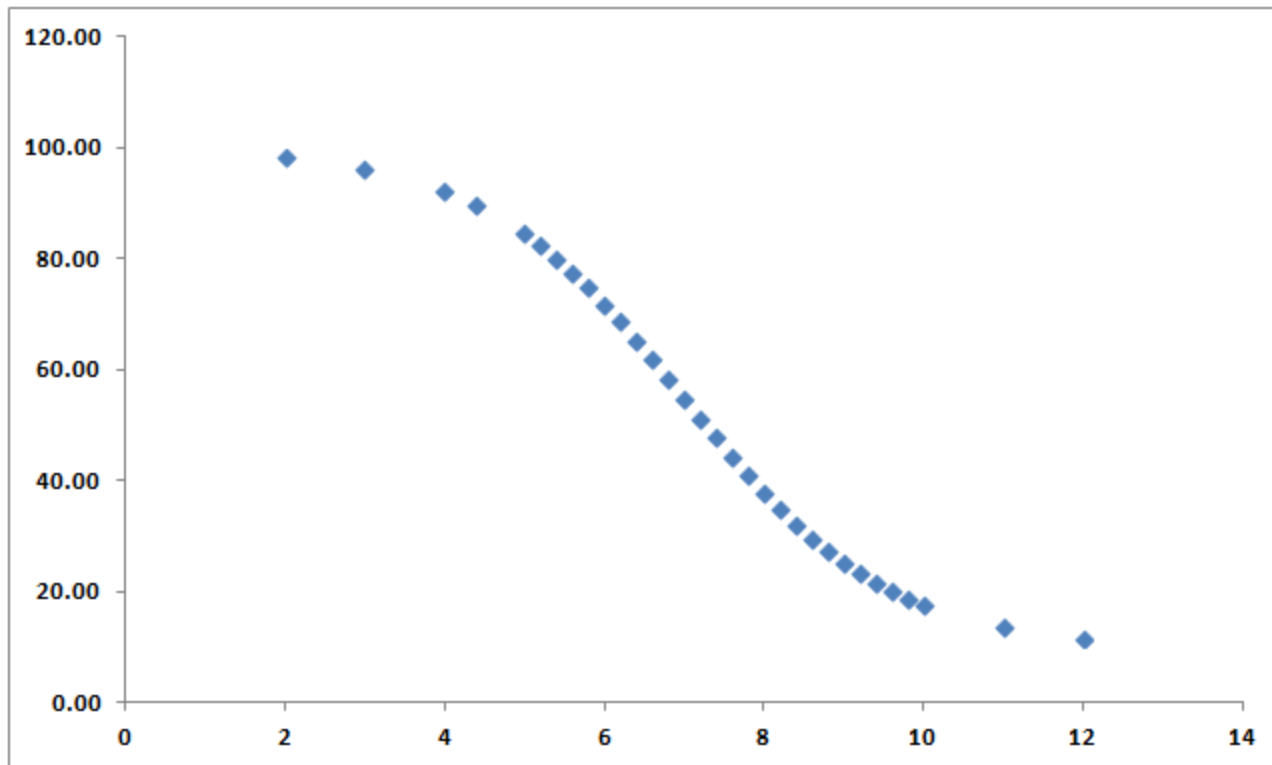
$$f_N = \frac{1}{1 + e^{\frac{-\Delta G_u}{RT}}}$$

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{-\Delta G_u}{RT}}} \leftarrow \Delta G_u = \Delta G_{H_2O} - m[C]$$

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{-(\Delta G_{H_2O} - m[C])}{RT}}}$$

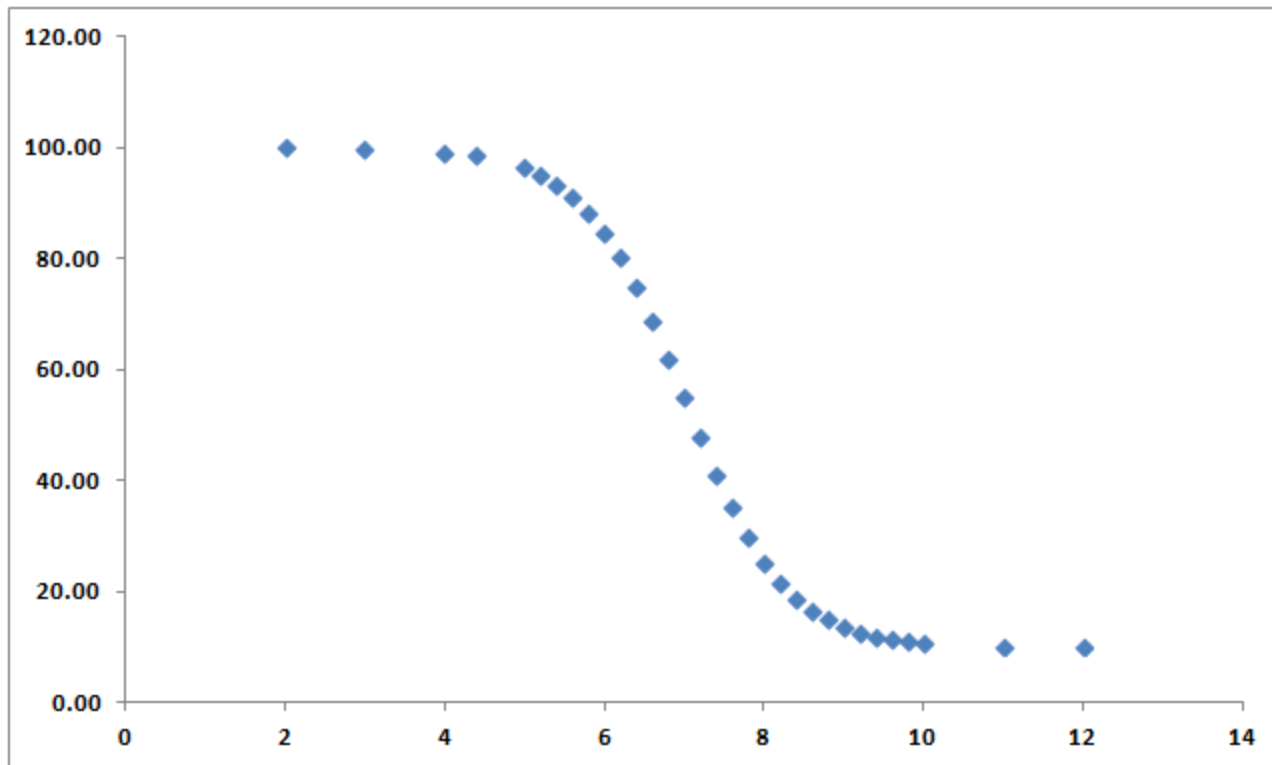
# Efeito do parâmetro $m$ na curva de desnaturação

$m = 2000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$



# Efeito do parâmetro $m$ na curva de desnaturação

$m = 4000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$



# Efeito do parâmetro $m$ na curva de desnaturação

$m = 8000 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$

