

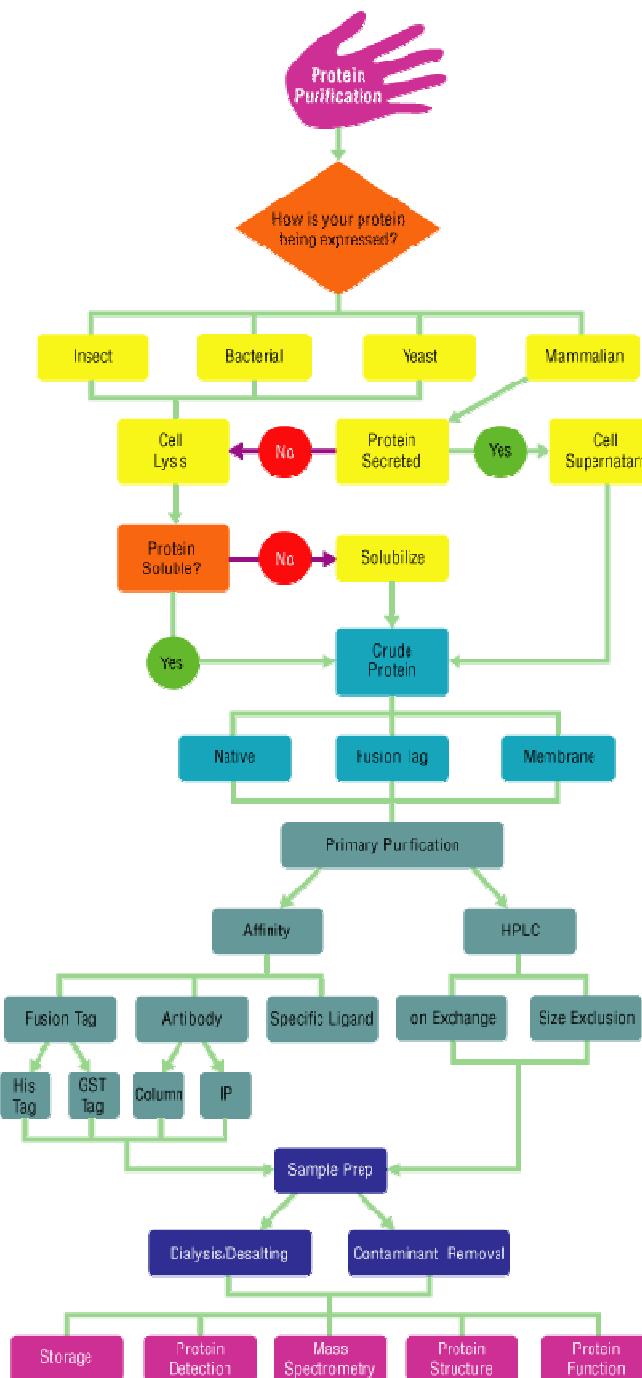
Métodos de determinação da estrutura de macromoléculas

Cristalografia de raios X

- Purificação da proteína
- Obtenção de cristais de proteína
- Recolha de dados
- Determinação das fases
- Refinamento da estrutura
- Validação da estrutura
- Deposição e/ou publicação da estrutura

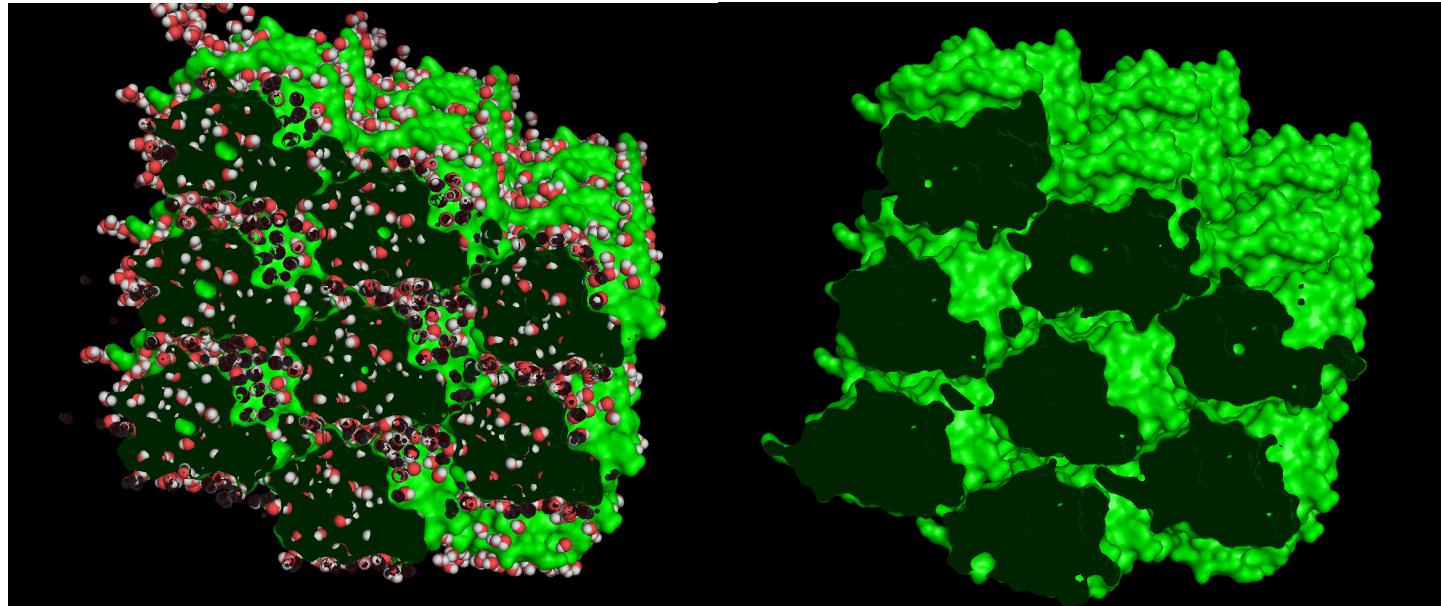
Purificação

- Conhecimento da sequência
- Sistema de expressão ?
- Técnicas standard de purificação de proteína
- Obtenção de quantidades na ordem do miligrama
- A proteína deve ter uma pureza superior a 97% para que a cristalização seja viável

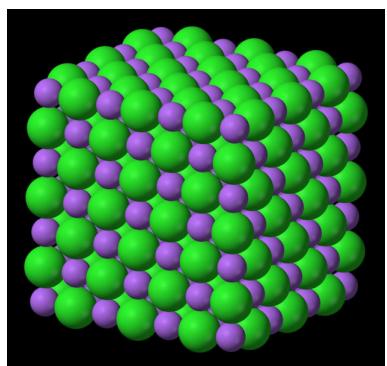


Cristalização

- Dificuldade de cristalização:
as macromoléculas são objectos irregulares com superfícies de contacto relativamente pequenas
- Crescimento lento:
os cristais podem demorar meses até atingirem as dimensões necessários (~0.5 mm)
- Dependência de múltiplos parâmetros:
pH, temperatura, concentração de proteína, solvente, precipitantes, iões e outros ligandos. Por vezes usam-se *robôs de cristalização* para varrer um conjunto vasto de combinações



Cristal de lisozima



Cristal de cloreto de sódio

- Os cristais de proteína contêm uma quantidade elevada de água
- O empacotamento é muito menos denso que num cristal iônico como o cloreto de sódio

- Cristal vs solução

Robô de cristalização



Douglas Instruments
Success in protein crystallization

Software de controlo

Description Liquids selection Distribution Summary

Category	Name	Color Legend	Details
Salt	Tri-Ammonium_Citrate_pH7	[Yellow]	[Edit]
Buffer	tri-Ammonium_Citrate	[Blue]	[Edit]
Buffer	Sodium_Malonate	[Purple]	[Edit]
Detergent	C12E8	[Blue]	[Edit]
Precipitant	Dioxane	[Green]	[Edit]

Modify list

DISTRIBUTION PARAMETER

Scope: all lines

Pattern:

- concentration

Min/Step	Min: 0.1
	Step: 0.1
- pH

Constant	:	7.0
----------	---	-----

Apply to all

pH View	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

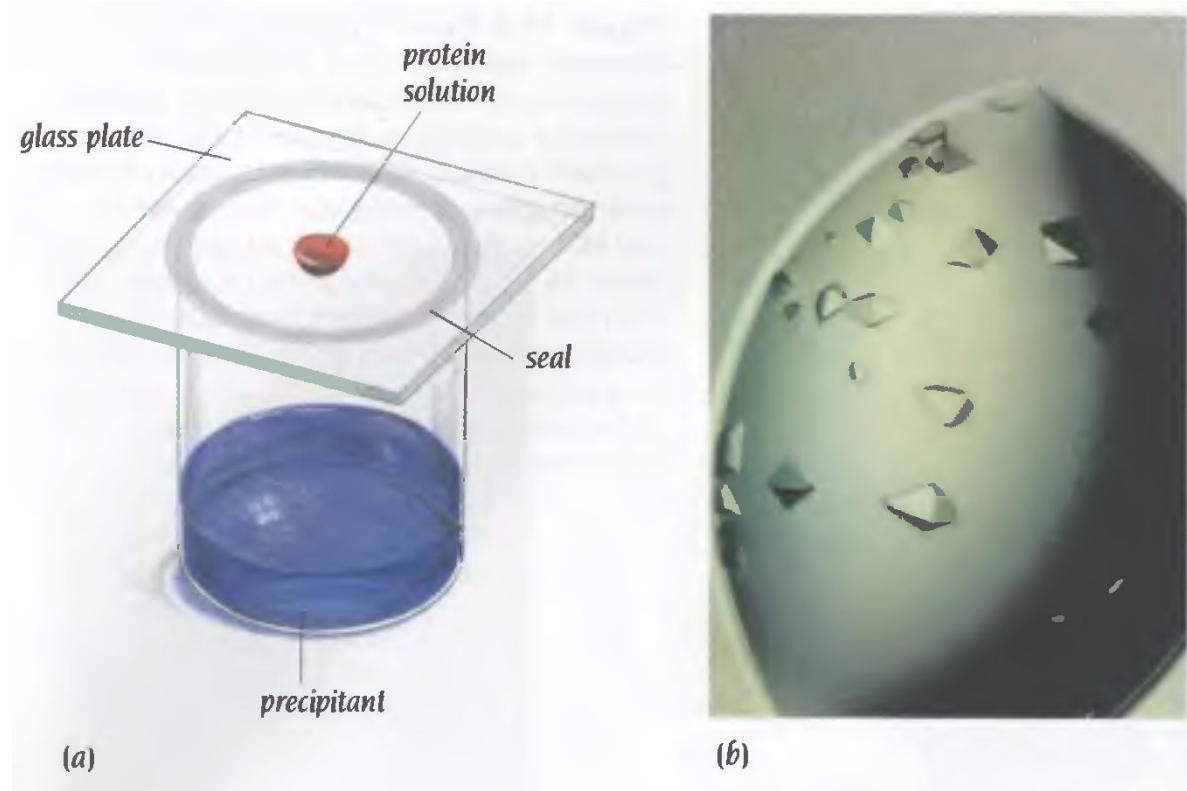
This well contains:

Liquid name	Volume (µl)	Conc.	pH
C12E8	18.2	0.2 mM	-1.0
Sodium_Malonate	44.1	1.5 M	7.0
Water	37.7		

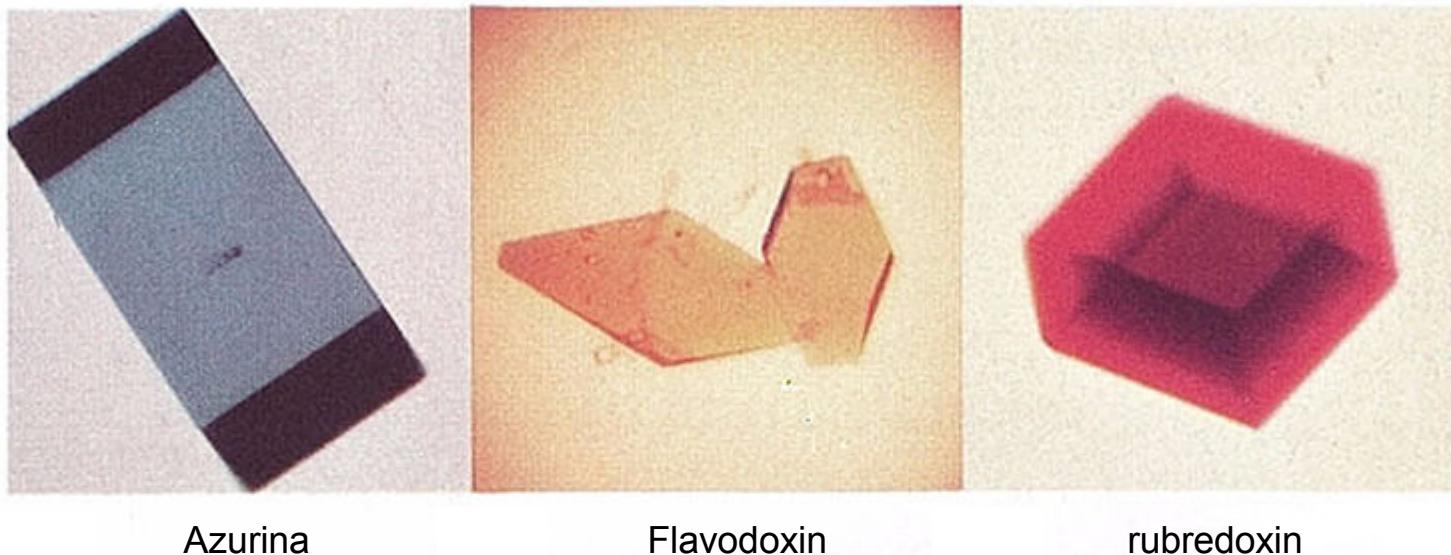
Color Legend	Category	Liquid name	Scope	Parameter	Pattern	Value	Value	Delete
[Purple]	Buffer	Sodium_Malonate	plate(conc, pH): A1->H12	Concentration	Constant	1.5	-1.0	X
[Yellow]	Salt	Tri-Ammonium_Citrate	all columns: A1->D6	pH	Constant	7.0	-1.0	X
[Green]	Precipitant	Dioxane	all lines: E1->H12	Concentration	Min/Max	0.3	1.25	X
[Blue]	Detergent	C12E8	all lines: A7->D12	Concentration	Min/Step	5.0	4.0	X
				Concentration	Min/Step	0.1	0.1	X

Método da gota pendente

- Cerca de 10 μL de uma solução de 10 mg/ml de proteína é colocada numa placa de vidro
- A placa é invertida sobre um copo contendo ~ 1 mL de uma solução concentrada de precipitante, por exp. sulfato de amónia
- O equilíbrio entre a gota e a solução é atingido lentamente por difusão de vapor, e a concentração de proteína aumenta por perda de água para o reservatório, até ser atingido o limite de saturação, com a consequente precipitação da proteína e formação de cristais (se as condições forem propícias!)



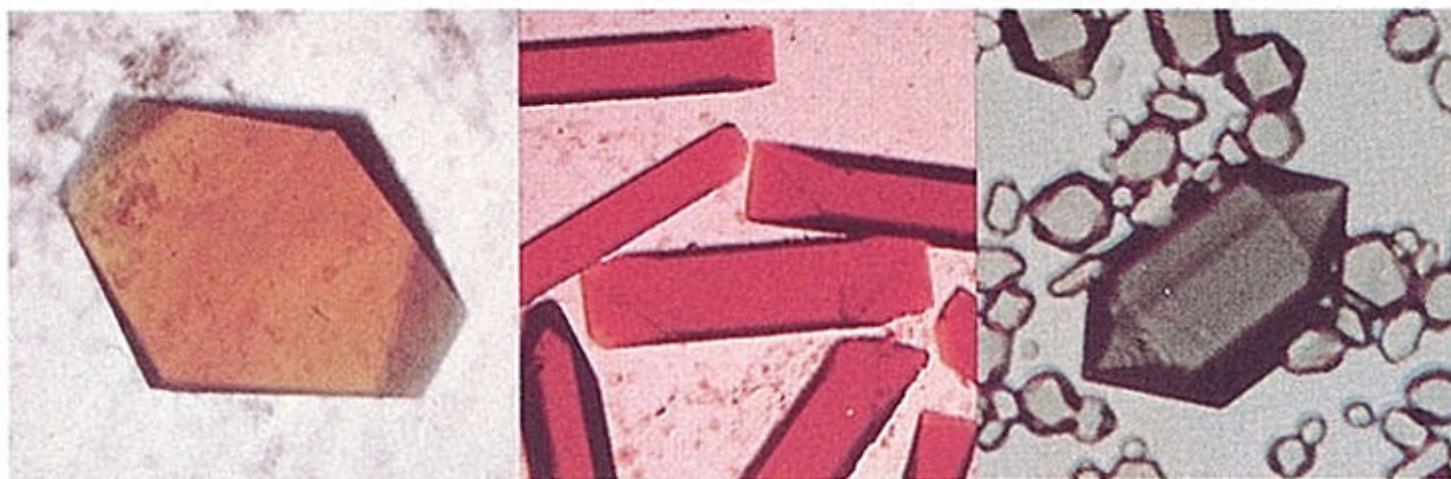
Cristais de proteína



Azurina

Flavodoxin

rubredoxin

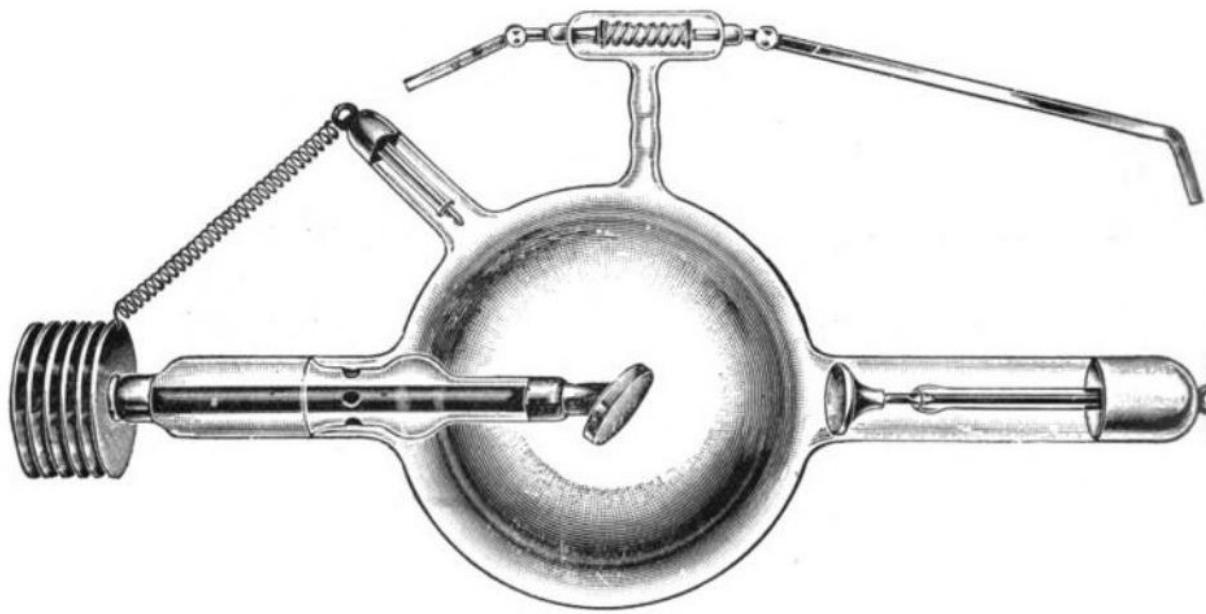


miohemeritina

hemoglobin

bacterioclorofila a

Produção de raios X



Tubo de descarga de Crookes (cerca de 1900)

- A grande diferença de potencial entre cátodo e ânodo produz descarga de electrões sobre o ânodo. A travagem dos electrões no ânodo é acompanhada de produção de raios X (*Bremsstrahlung*, radiação de travagem)
- O primeiro tipo de tubo de raios X, muito pouco eficiente. Opera com um vácuo de cerca de um 1 Torr

Produção de raios X

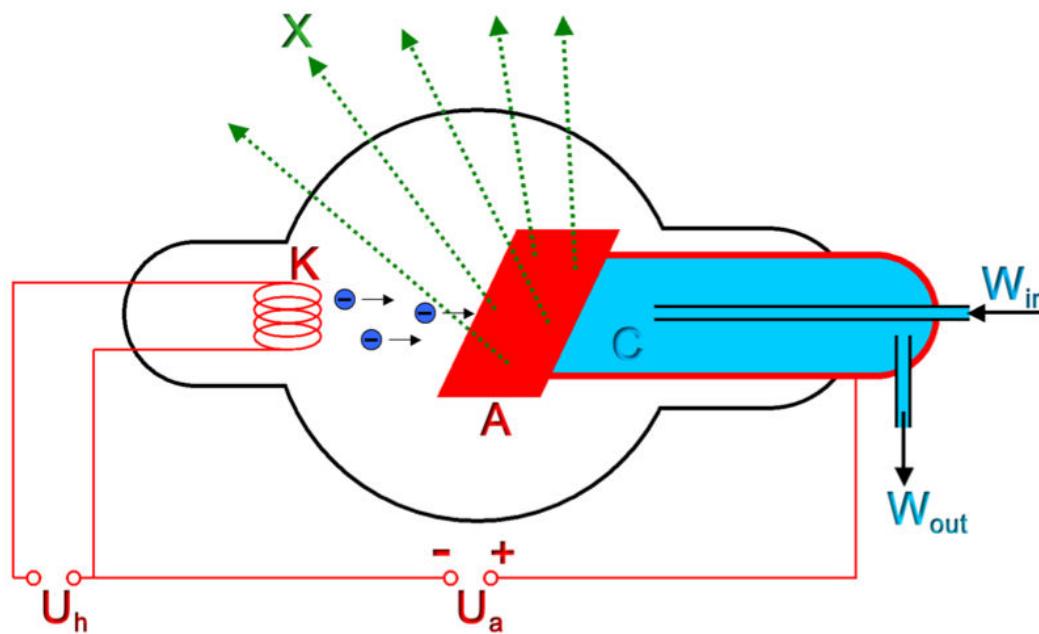
K - cátodo

A - ânodo

C - sistema de refrigeração

W_{in}, W_{out} - água

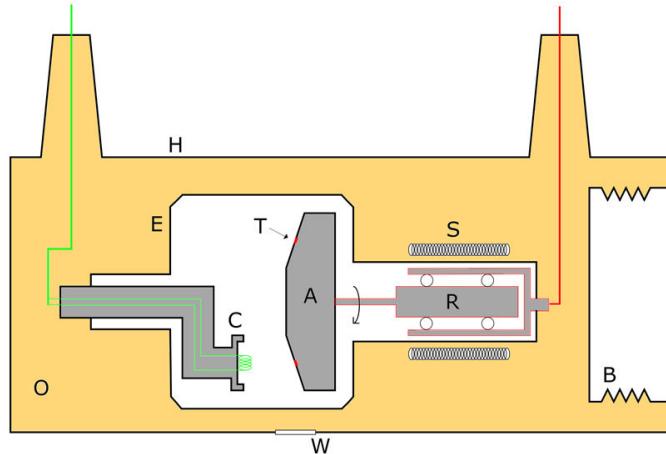
X - raios X



Tubo de Coolidge

- Os electrões libertam-se do cátodo por emissão termiónica, sendo acelerados até ao ânodo
- O sobreaquecimento do ânodo é evitado através de um sistema de arrefecimento a água

Produção de raios X



C - cátodo

A - ânodo

C - sistema de refrigeração

W - janela

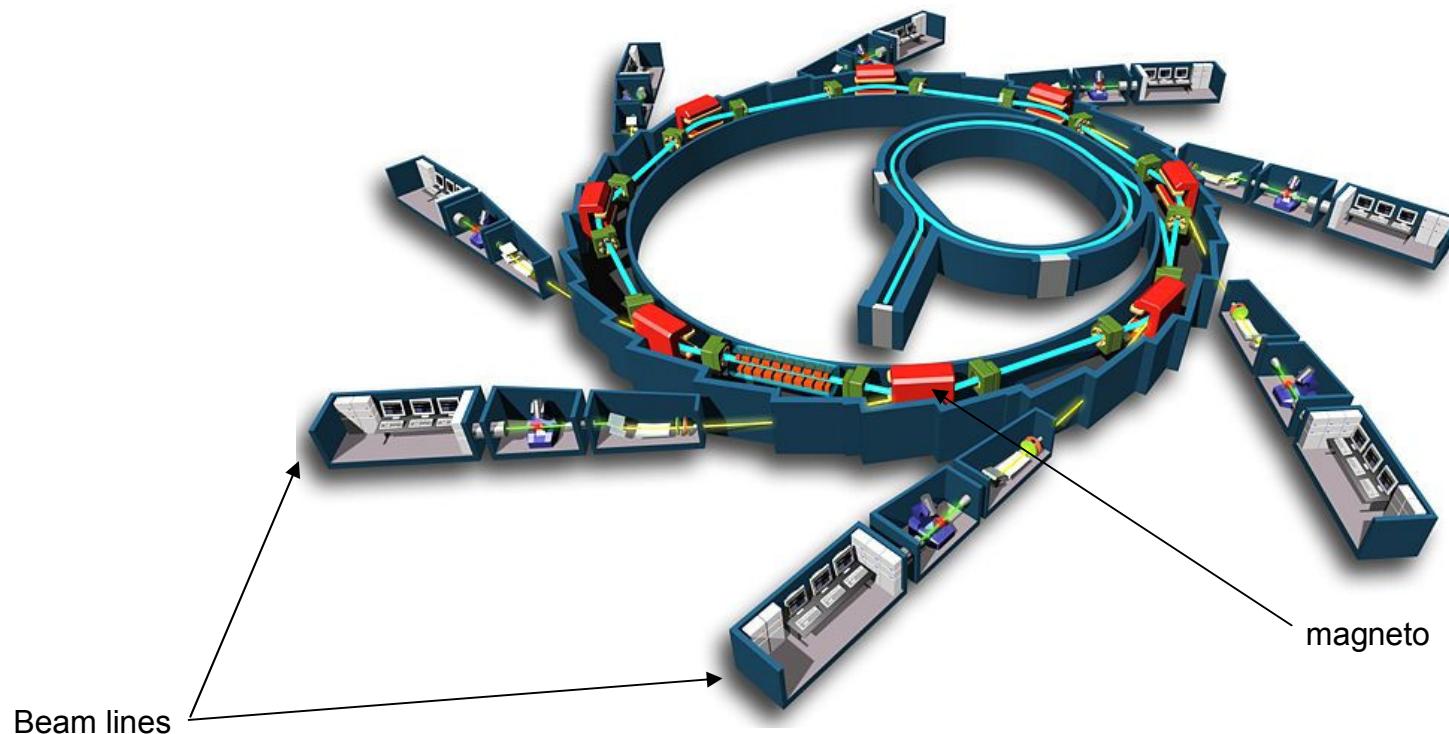
T - zona alvo



Tubo de Ânodo rotativo

- O ânodo roda para expor diferentes ao feixe de raios X e assim dissipar calor numa área mais extensa
- É o design mais usado actualmente para fontes monocromáticas de raios X

Radiação sincrotrónica



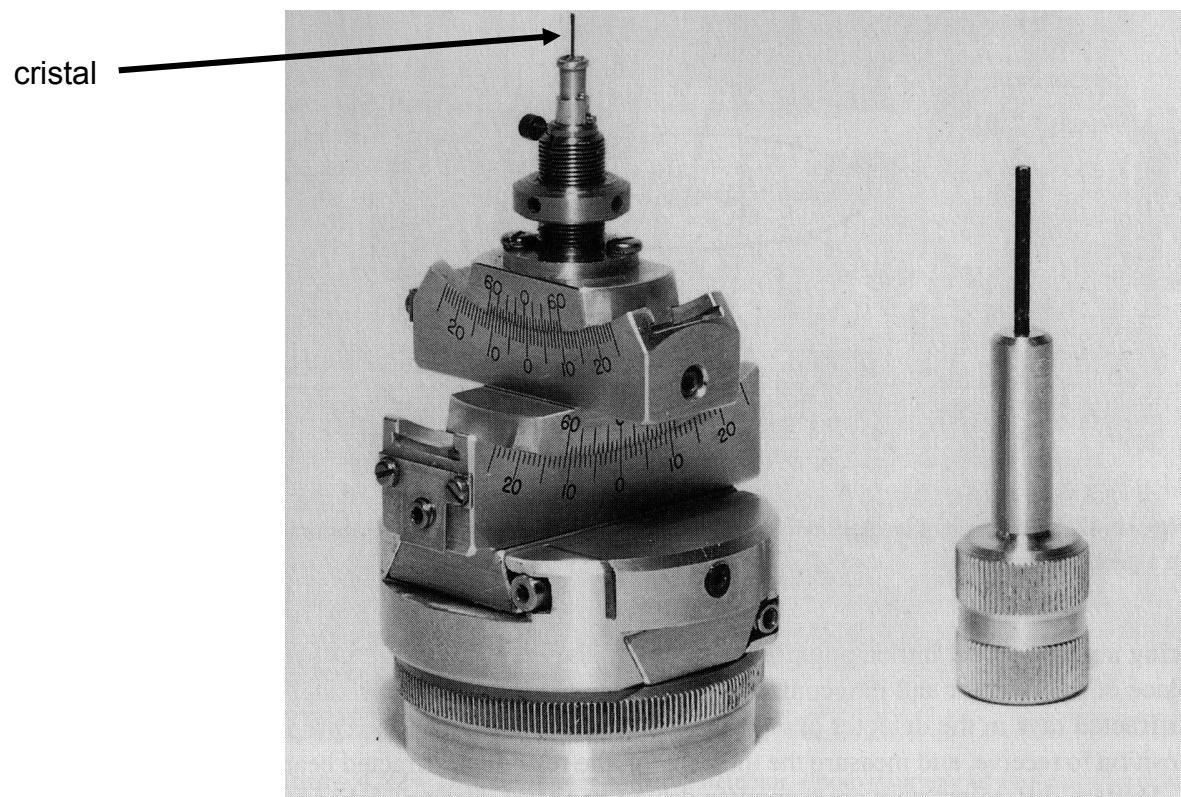
- Radiação X produzida pela aceleração de electrões num acelerador circular (sincrotrão)
- Produz feixes extraordinariamente intensos, que podem ser monocromáticos ou policromáticos
- Permite tempos de medição muito mais curtos
- Instalações geridas e partilhadas por consórcios de países, p.ex. o ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) em Grenoble

ESRF



Recolha de dados - goniómetro

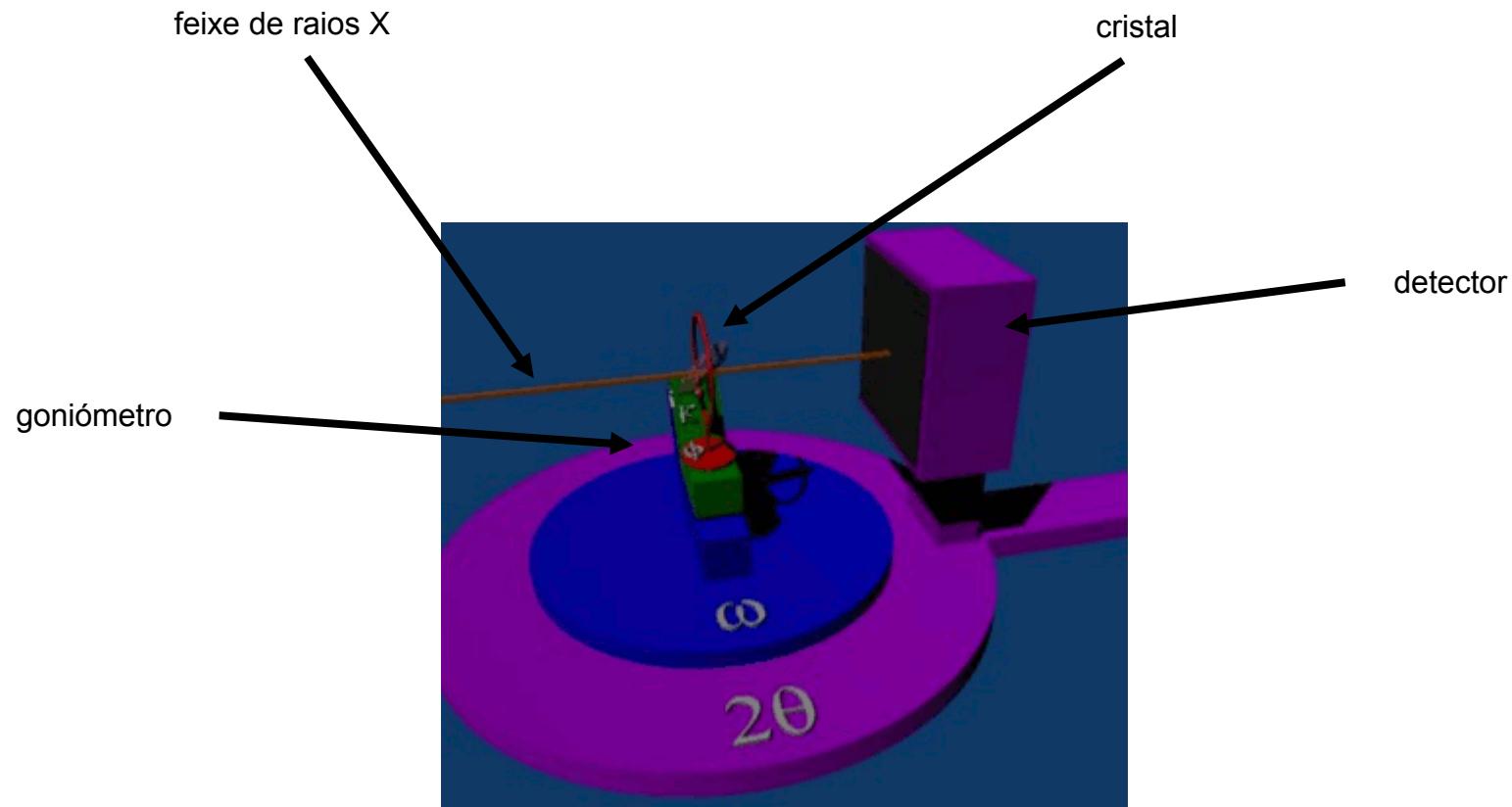
- O cristal é montado numa cabeça móvel (goniómetro), que permite a orientação do cristal de acordo com os seus eixos de simetria



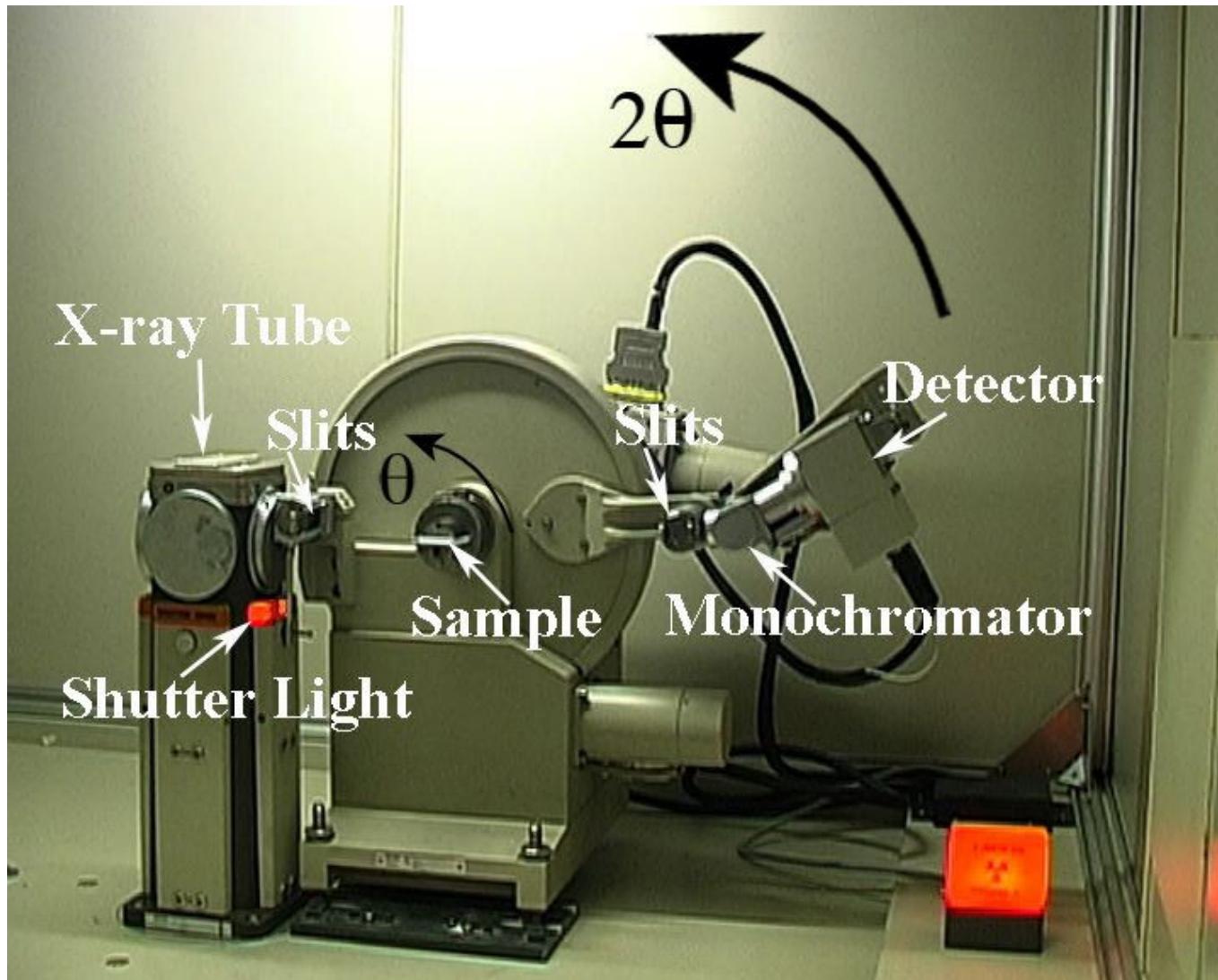
Goniómetro

Recolha de dados

- O cristal roda sobre o feixe de raios, e os raios difractados são recolhidos num detector

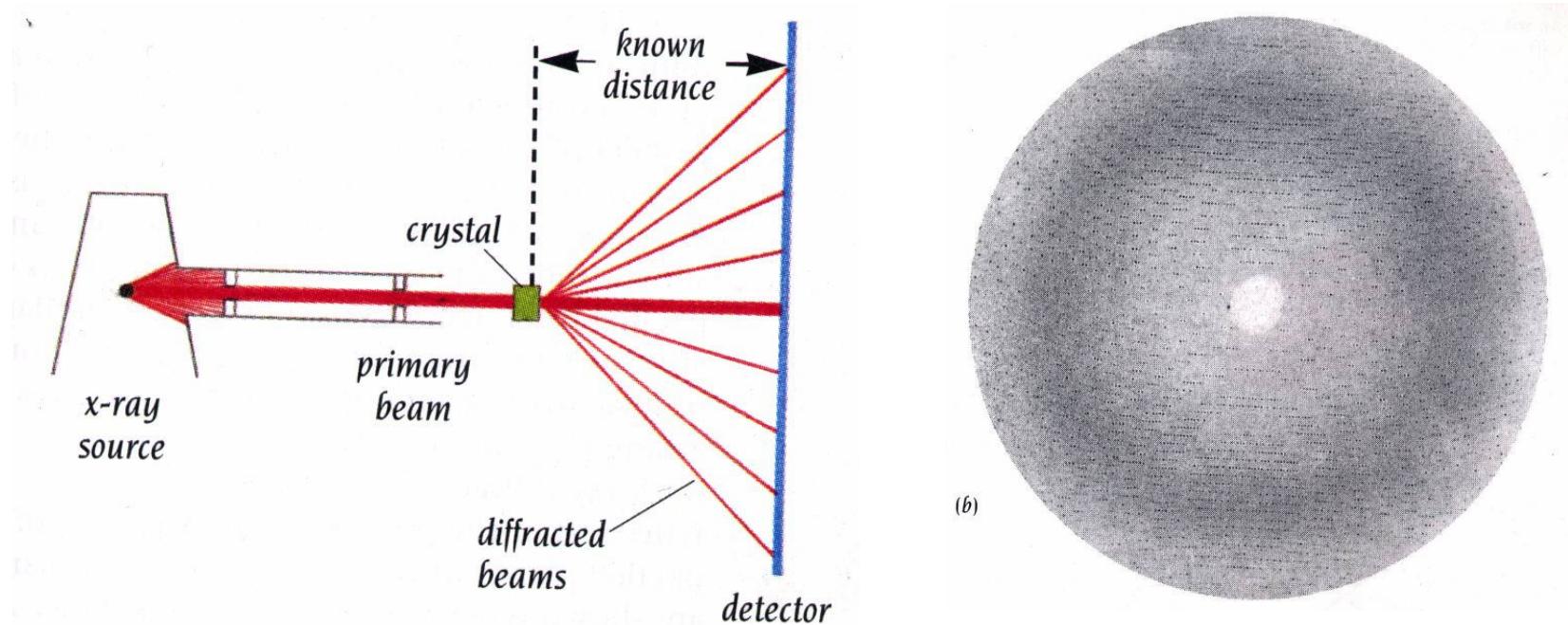


Difractómetro de raios X

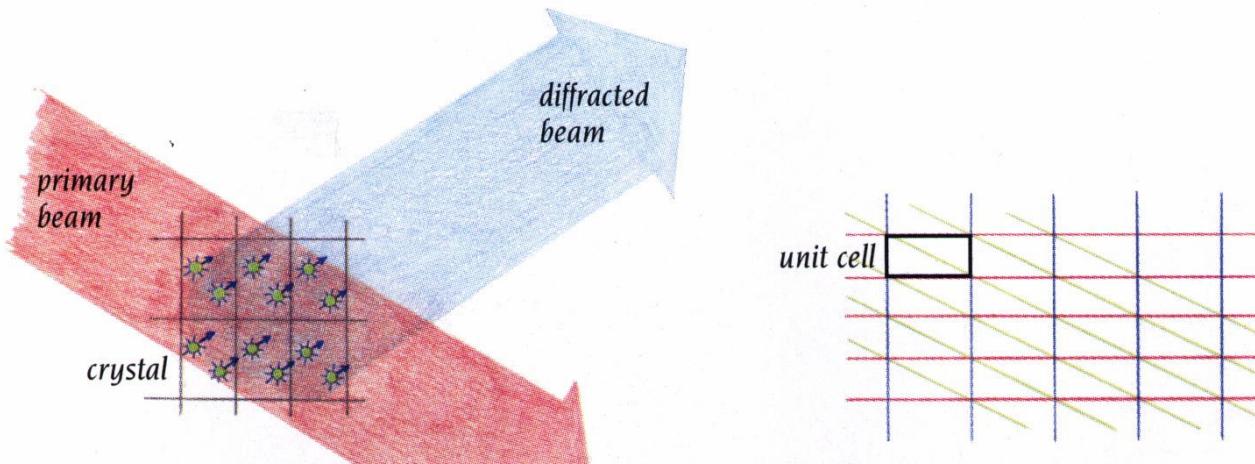


Dados de difracção

- Os raios X difractados pelo cristal produzem um padrão de pontos na superfície do detector.

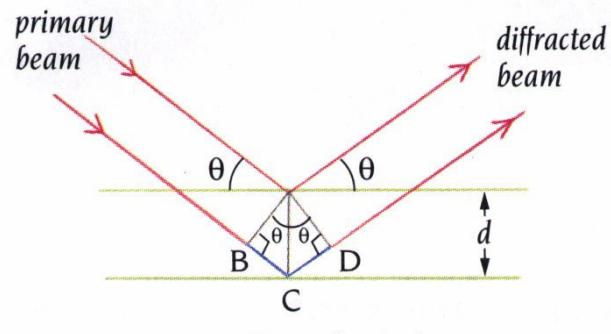


Lei de Bragg



(a)

(b)



(c)

$$2 d \sin \theta = n \lambda$$

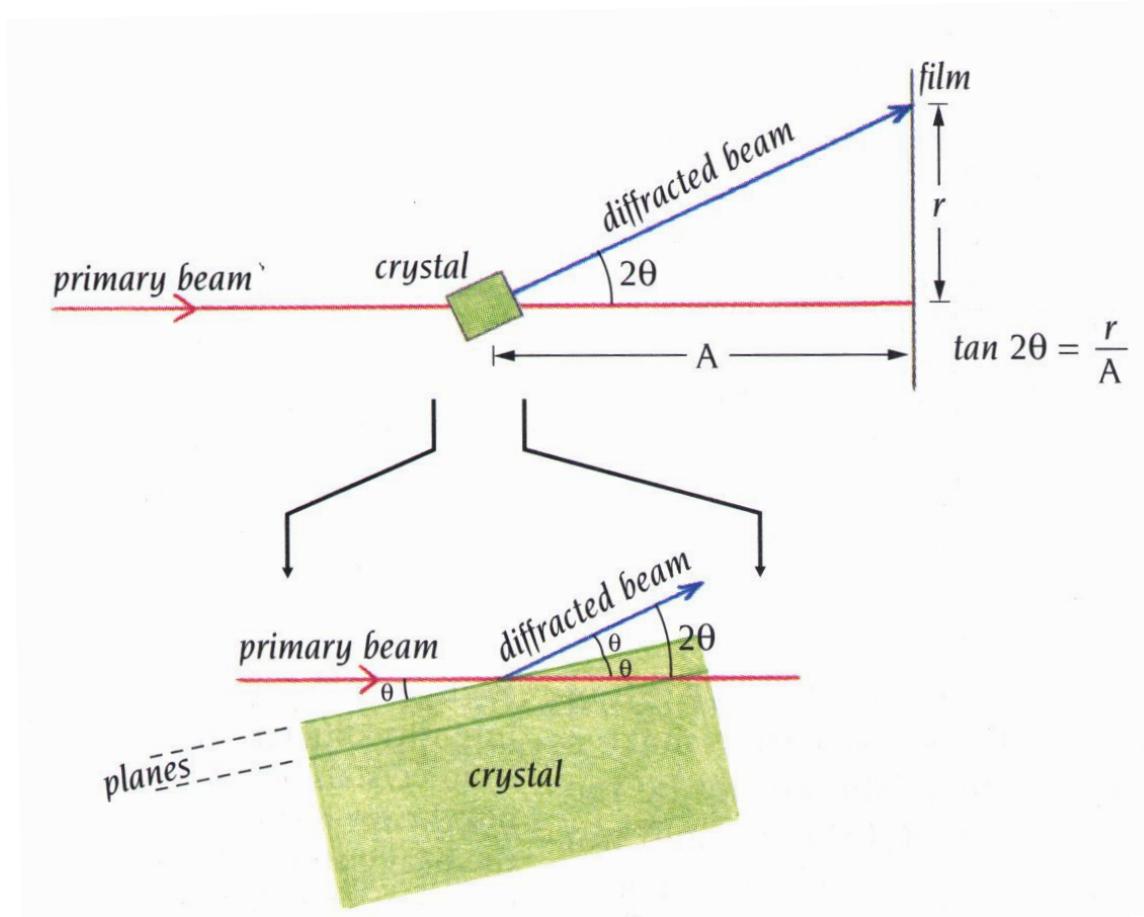
d - distância entre dois planos

λ - comprimento de onda

θ - ângulo de incidência

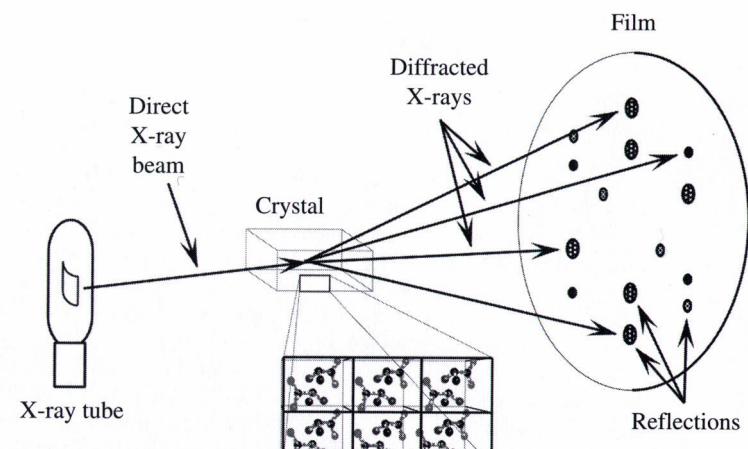
Cálculo da distância entre planos

- A lei de Bragg pode ser usada para calcular a distância entre dois planos, se o ângulo do raio difractado for conhecido, bem como o comprimento de onda da radiação X usada.

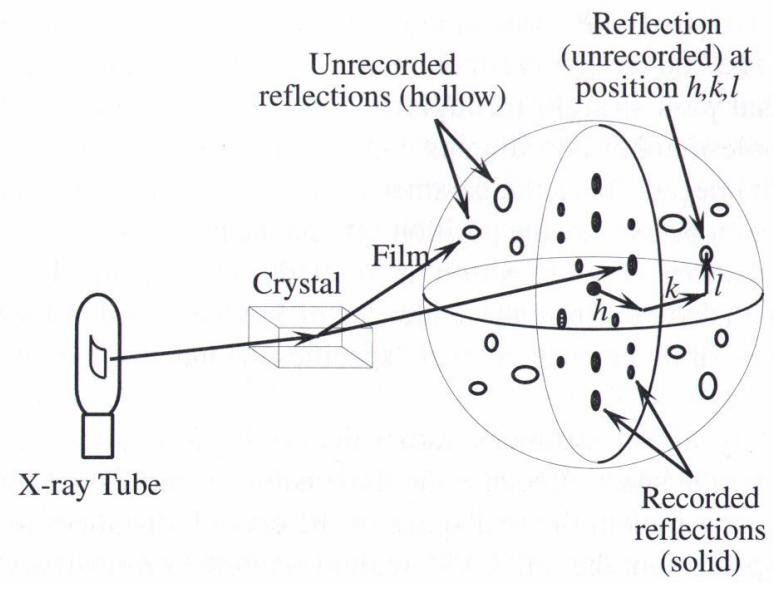


Espaço real versus espaço recíproco

- Os dados recolhidos pelo detector podem ser encarados como sendo uma secção numa rede tridimensional de pontos igualmente espaçadas. A cada conjunto de planos no cristal corresponde um ponto do *espaço recíproco*.

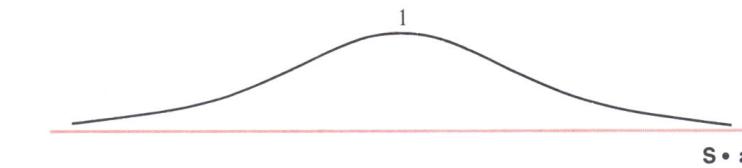
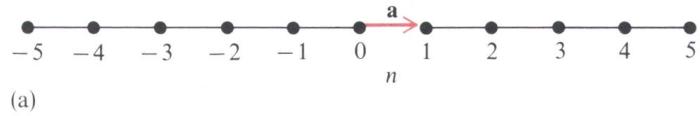


Espaço real

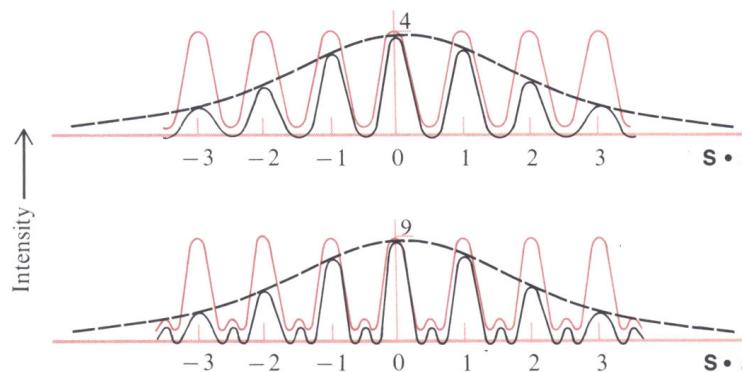


Espaço recíproco

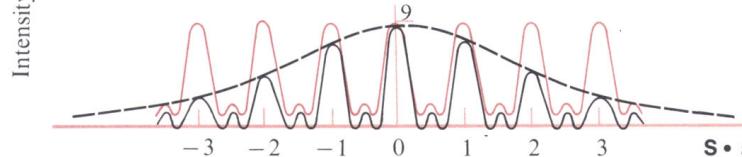
Espalhamento e periodicidade



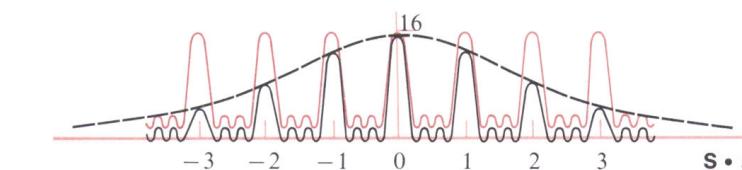
1 átom na origem



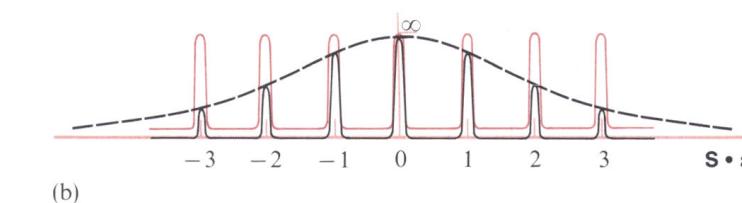
2 átoms em $-\frac{a}{2}$ e $\frac{a}{2}$



3 átoms em $-a$, 0 e $+a$

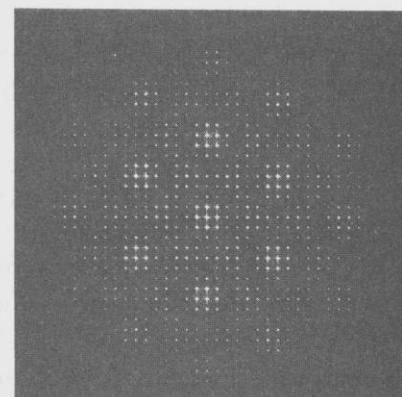
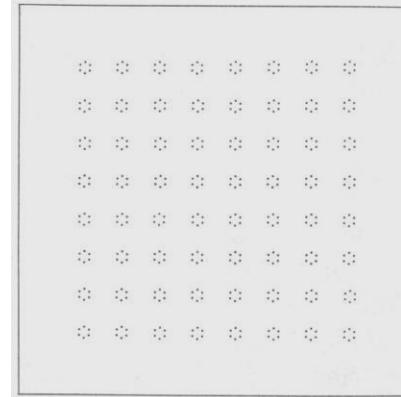
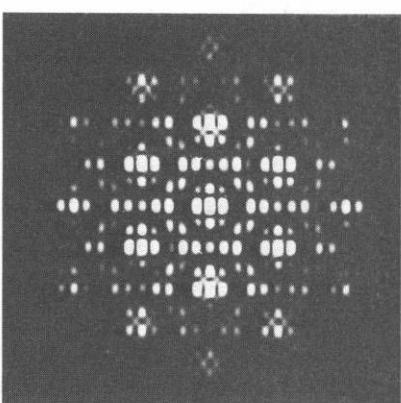
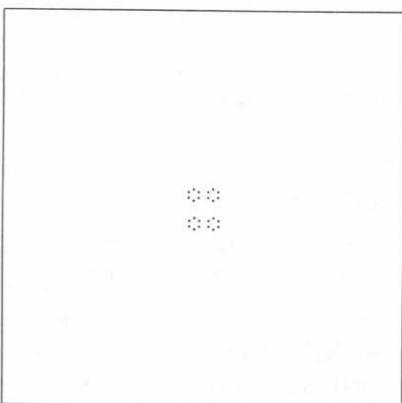
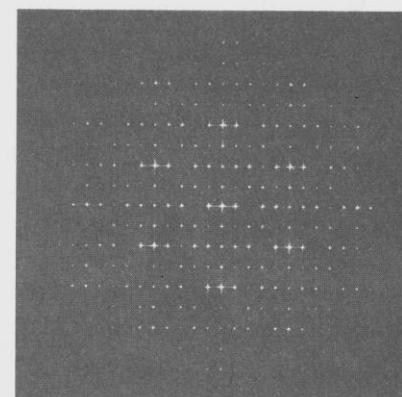
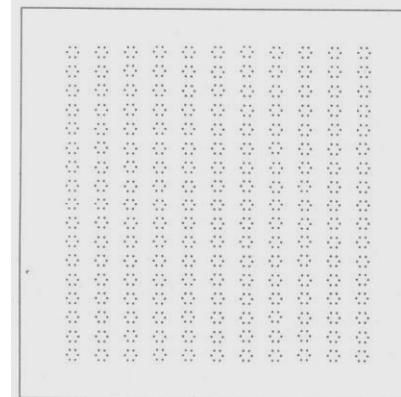
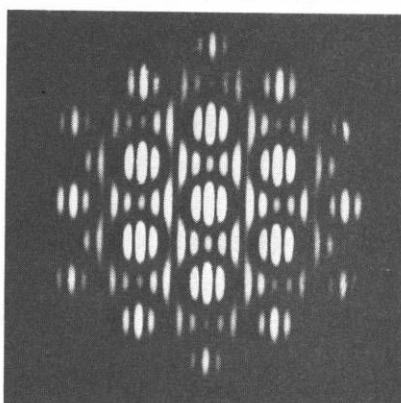
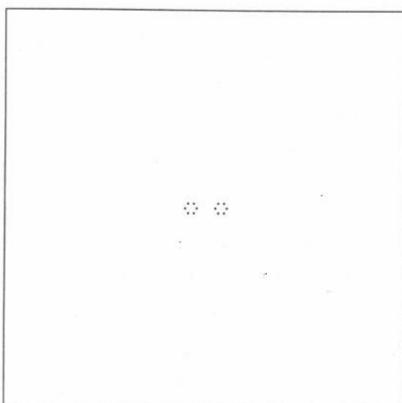
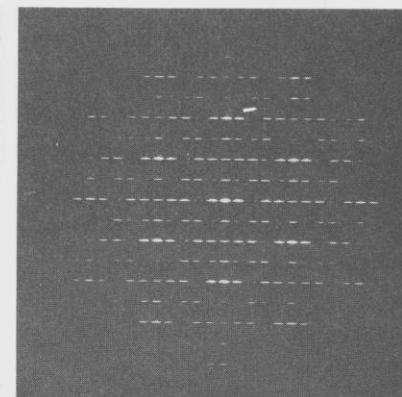
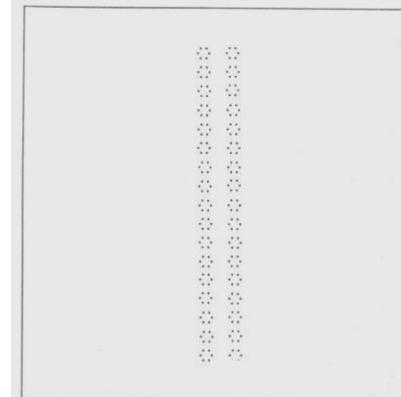
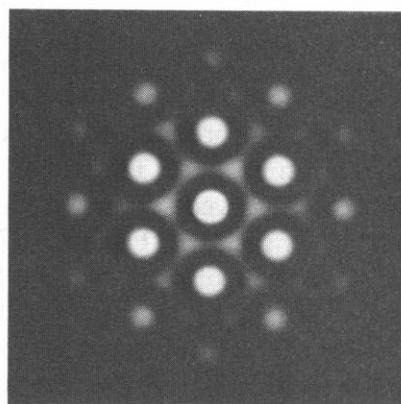
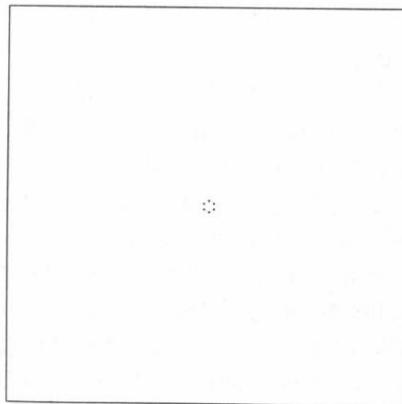


4 átoms em $-(3/2)a$, $-(1/2)a$, $+(1/2)a$, $+(3/2)a$



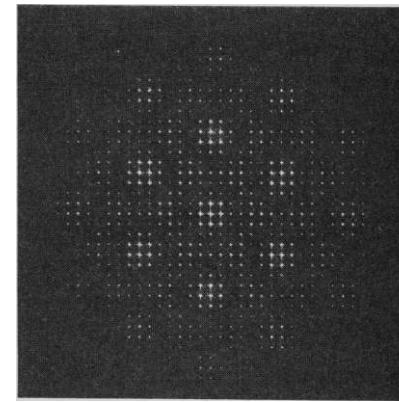
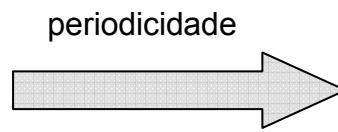
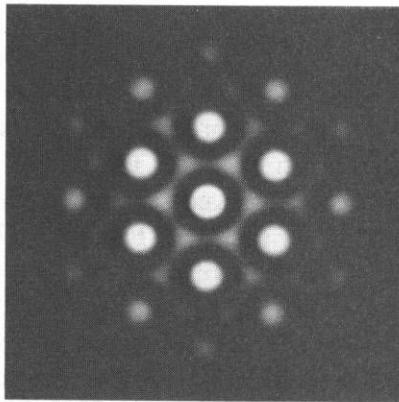
Número infinito de átomos

Espalhamento numa rede bi-dimensional

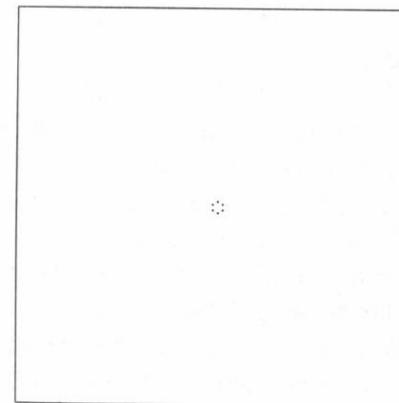
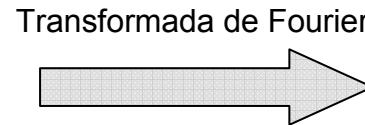
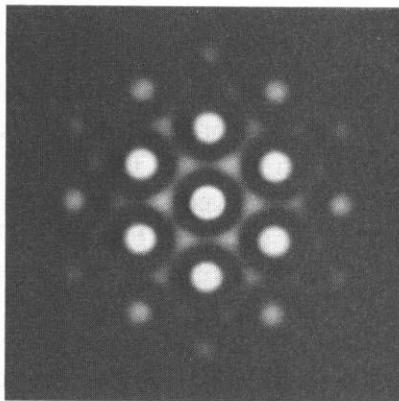


Reconstrução da estrutura

O padrão produzido por um retículo periódico de moléculas é idêntico ao da molécula isolado, mas apenas mensurável num conjunto discreto de pontos:



A partir do padrão de espalhamento da molécula isolada seria possível reconstruir a estrutura da molécula original:



Reconstrução da estrutura

- Cada reflexão (h,k,l) pode ser descrita por um factor de estrutura F_{hkl}

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)}$$

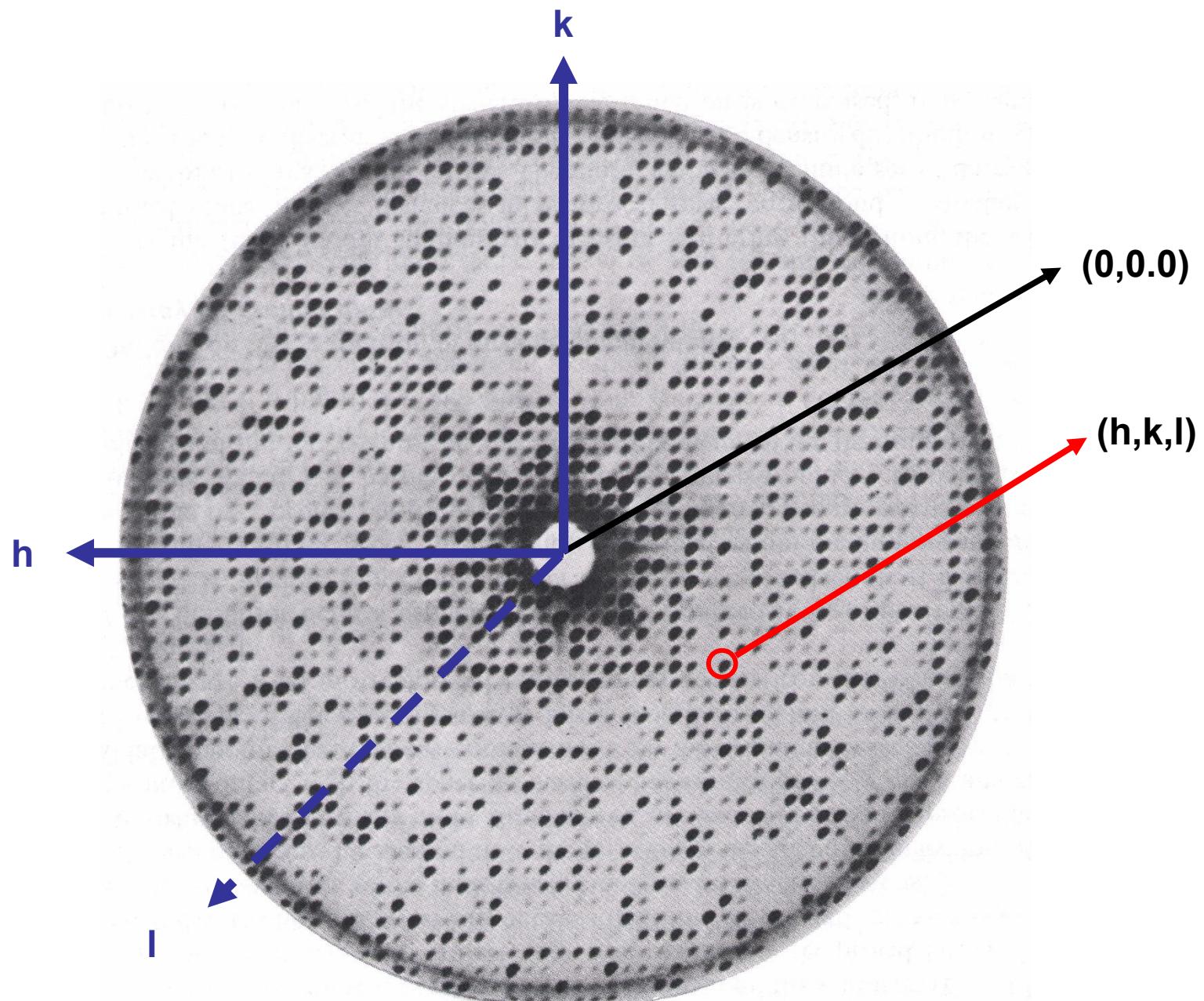
- A densidade electrónica $\rho(x,y,z)$ pode ser calculada a partir de

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i (hx + ky + lz)}$$

Note-se que os factores de estrutura F_{hkl} têm uma *amplitude* e uma *fase*!

As intensidades medidas I são proporcionais à amplitude dos factores de estrutura:

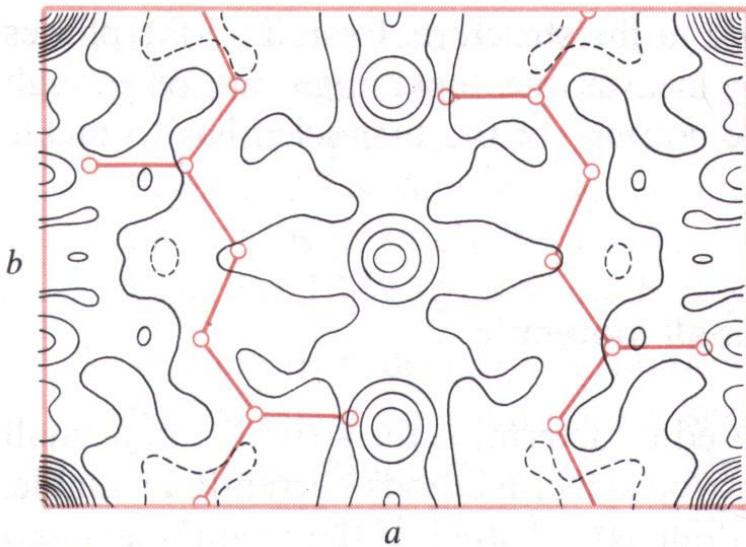
$$I \propto |F_{hkl}|^2$$



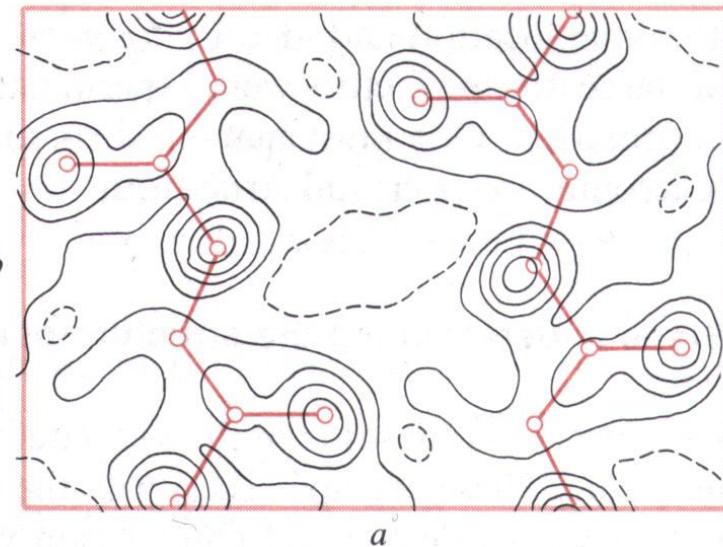
Problema das fases

- Os factores de estrutura tem fase e amplitude, mas a intensidade dos pontos dá apenas a amplitude
- A maioria da informação estrutural está na fase
- Formas de resolver as fases:
 - Síntese de Patterson
 - Substituição isomórfica (metais pesados)
 - Substituição molecular
 - MAD (multiple anomalous dispersion)
 - Métodos directos

Importância das fases



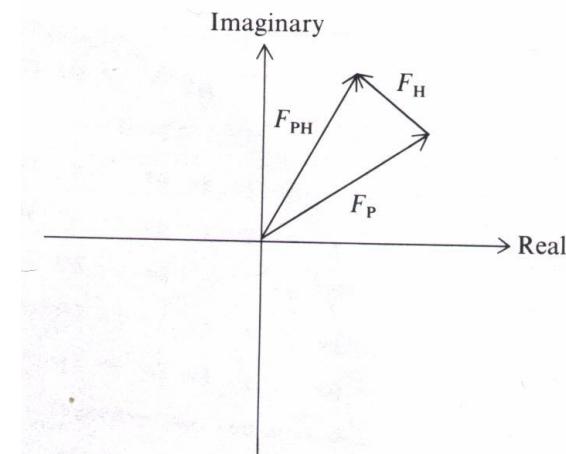
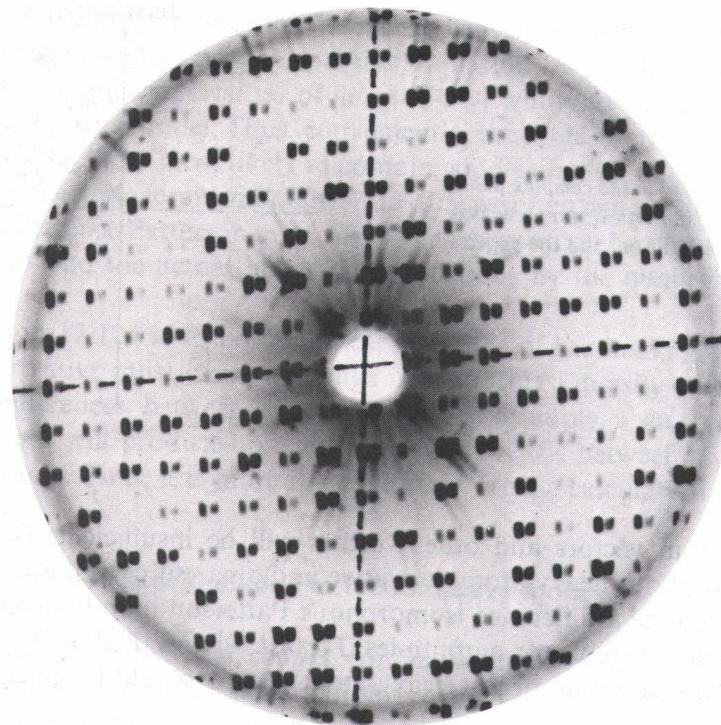
Síntese de Fourier usando apenas as intensidades



Síntese de Fourier usando apenas as fases

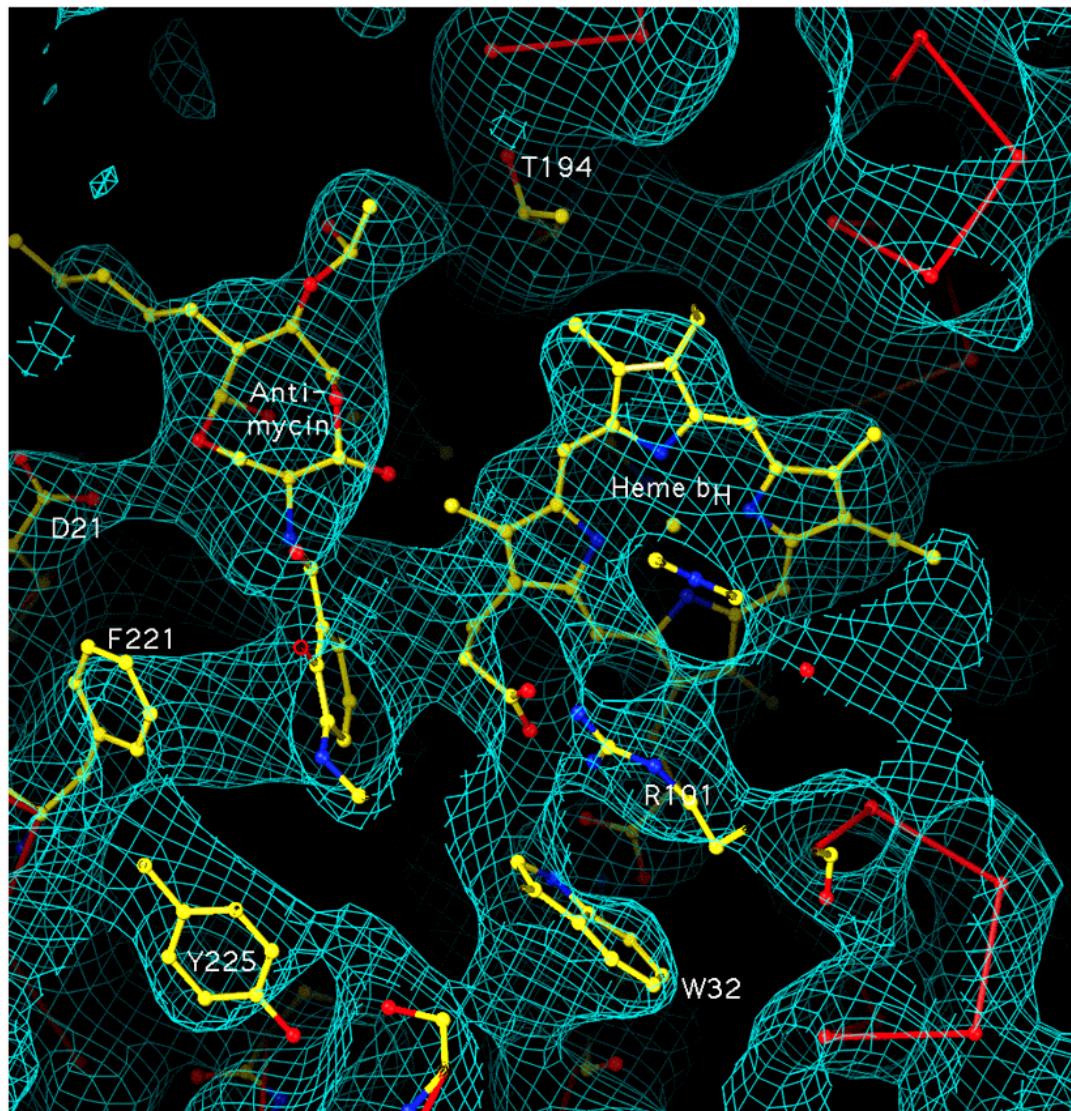
$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Substituição isomórfica

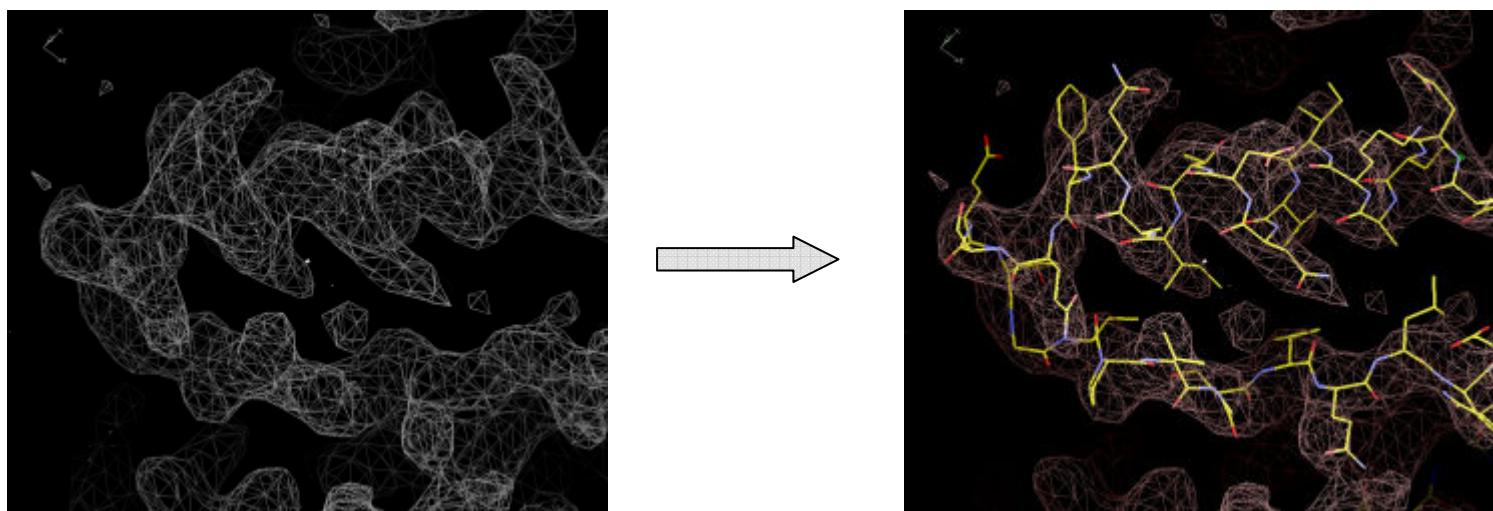


- Um único átomo de mercúrio é capaz de produzir uma diferença média de 30% entre os factores de estrutura da molécula original (F_P) e a molécula substituída (F_{PH}) para uma proteína de 40000 d !

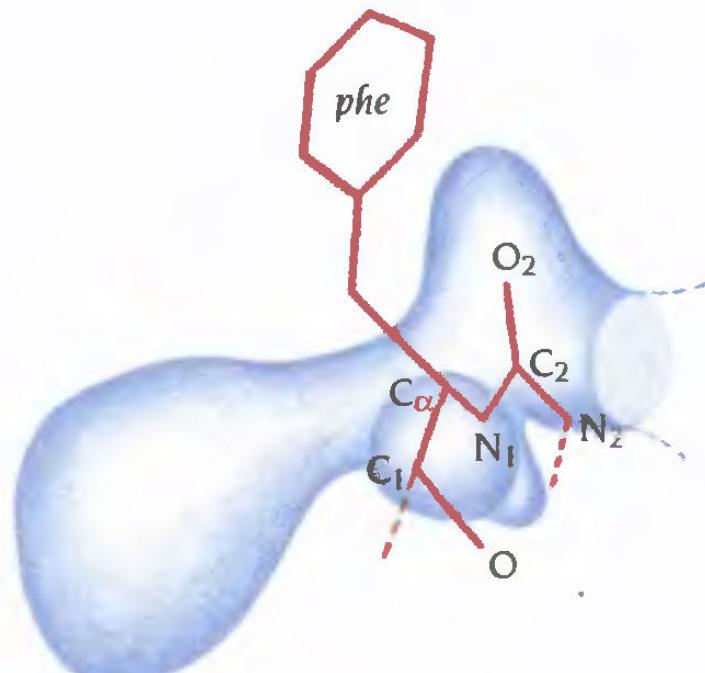
Densidade electrónica



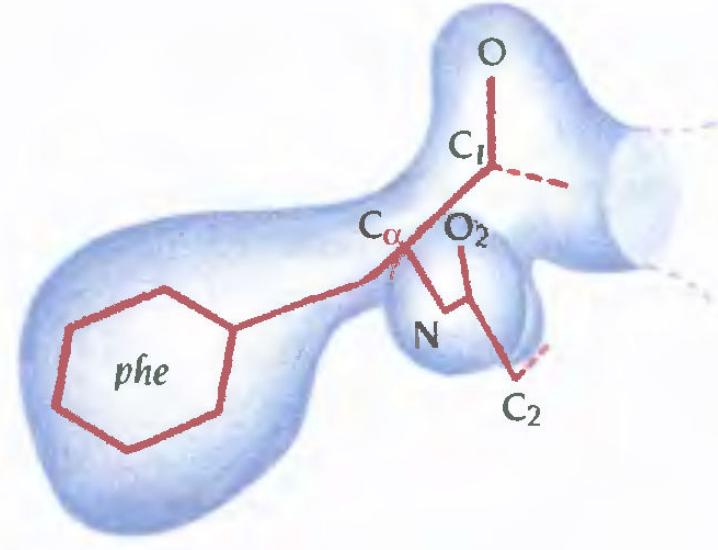
Interpretar a densidade



Modelar a estrutura na densidade electrónica



(a)



(b)

Refinamento da estrutura

1. Medição de reflexões
2. Estimativa das fases
3. Obtenção de um modelo, com ajuda de informação estereoquímica
4. Transformada de Fourier inversa para obter as intensidades e fases “teóricas” produzindo o modelo
5. Uso das novas fases teóricas junto com as intensidades para criar um novo modelo
6. Voltar a 3

$$R = \frac{\sum |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum |F_{obs}|} \quad \text{R-factor}$$

Efeito da resolução

