

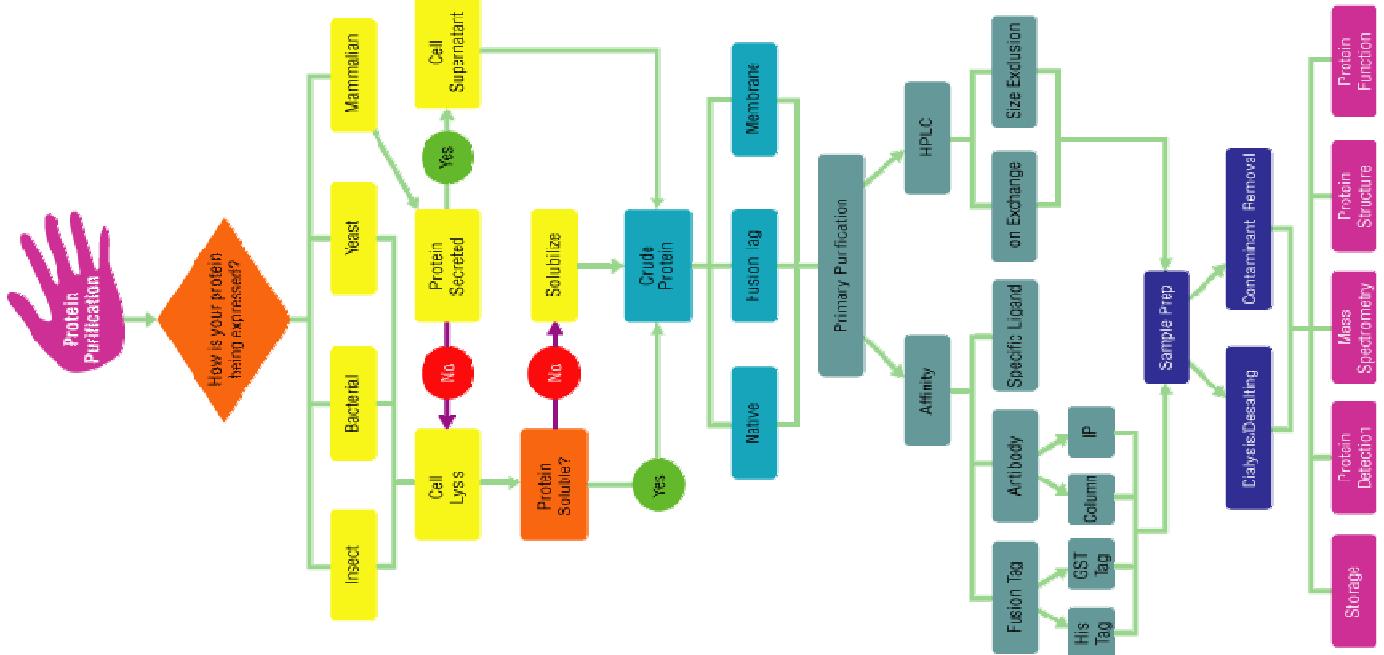
# Métodos de determinação da estrutura de macromoléculas

# *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

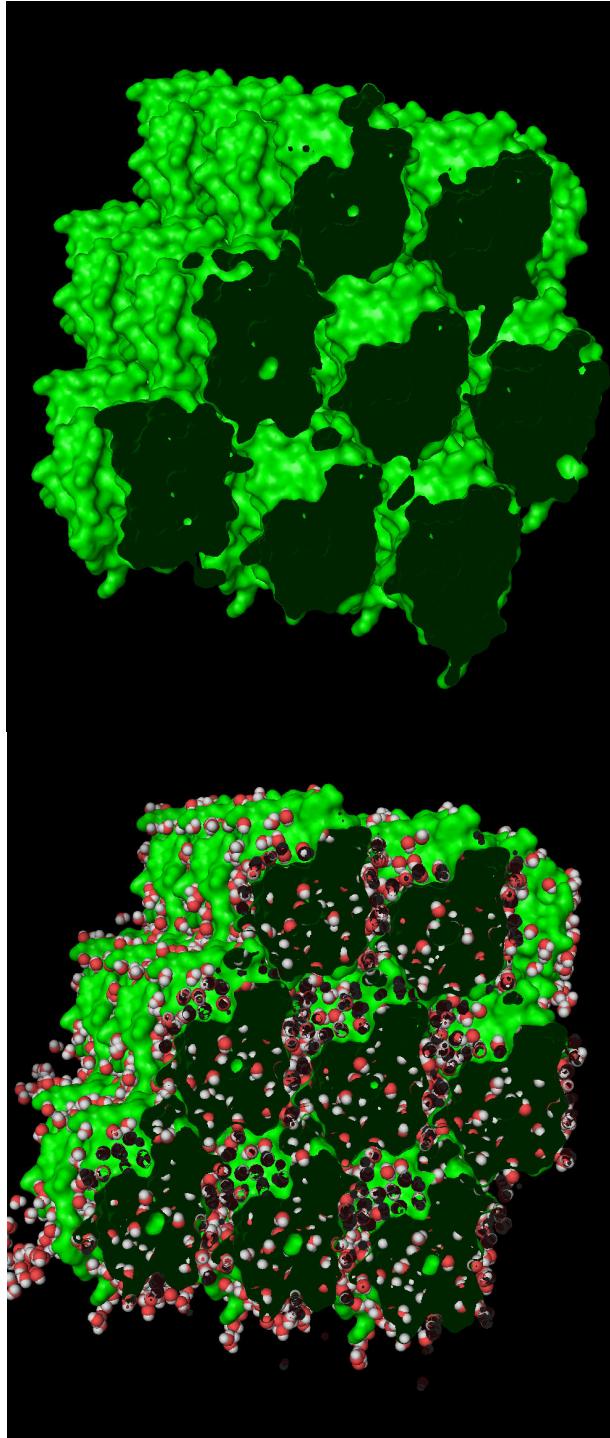
# Purificação

- 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

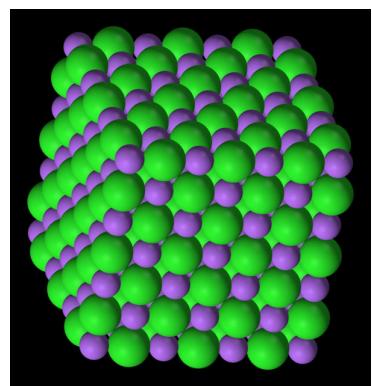


# Cristalização

- 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



# Software de controlo

**Description**   **Líquidos selección**   **Distribución**   **Summary**

Category	Name	Color Legend	Details	pH View	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Salt	Tri-Ammonium_Citrate_pH7															
Buffer	tri-Ammonium_Citrate															
Buffer	Sodium_Malonate															
Detergent	C12E8															
Precipitant	Dioxane															

**Modify list**

**DISTRIBUTION PARAMETER**

Scope **all lines** ▾

Pattern	-concentration	Min	0.1
		Step	0.1
-pH			7.0
		Constant	

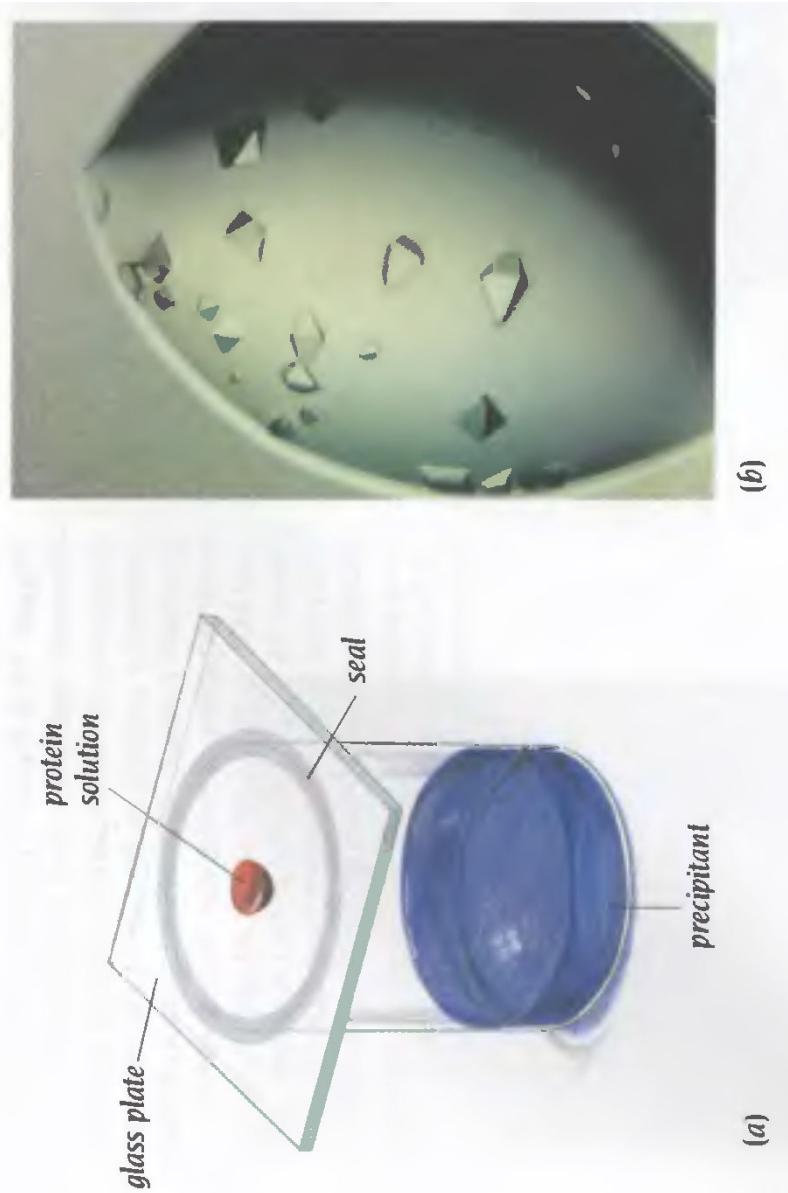
**Apply to all**

**Color Legend**

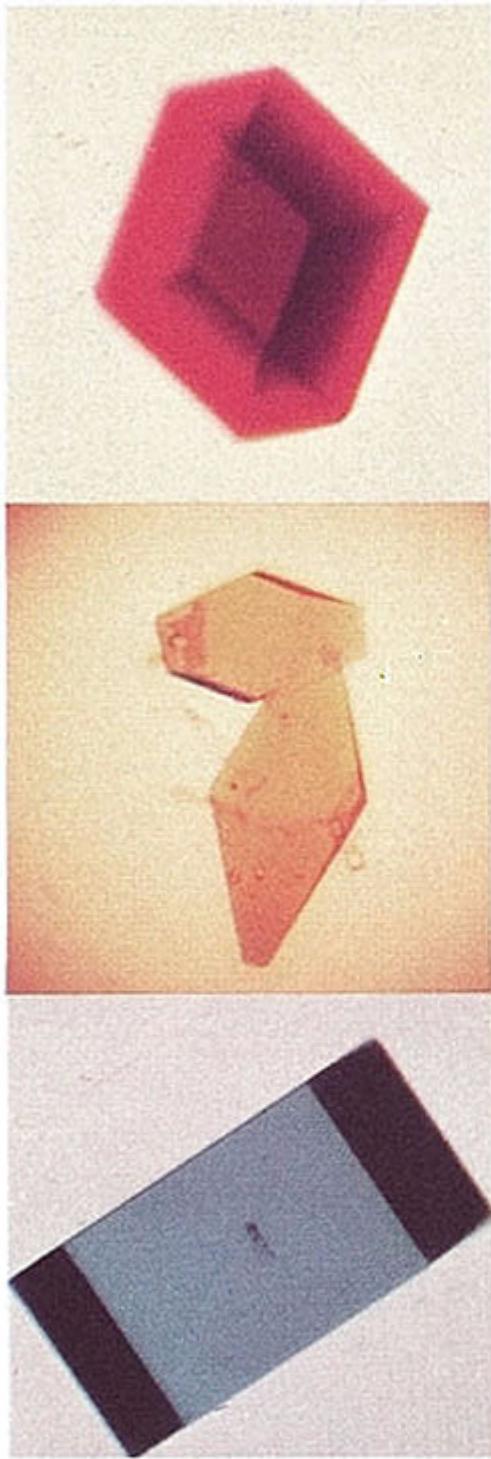
Category	Liquid name	Scope	Parameter	Pattern	Value	Value	Delete
Buffer	Sodium_Mal...	plate(conc, pH); A1->H12	Concentration	Constant	1.5	-1.0	✖
Salt	Tri-Ammoni...	all columns; A1->D6	pH	Constant	7.0	-1.0	✖
Precipitant	Dioxane	all lines; E1->H12	Concentration	Min/Max	0.3	1.25	✖
Detergent	C12E8	all lines; A7 -> D12	Concentration	Min/Step	5.0	4.0	✖
			Concentration	Min/Step	0.1	0.1	✖

## Método da gota pendente

- Cerca de 10  $\mu\text{L}$  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

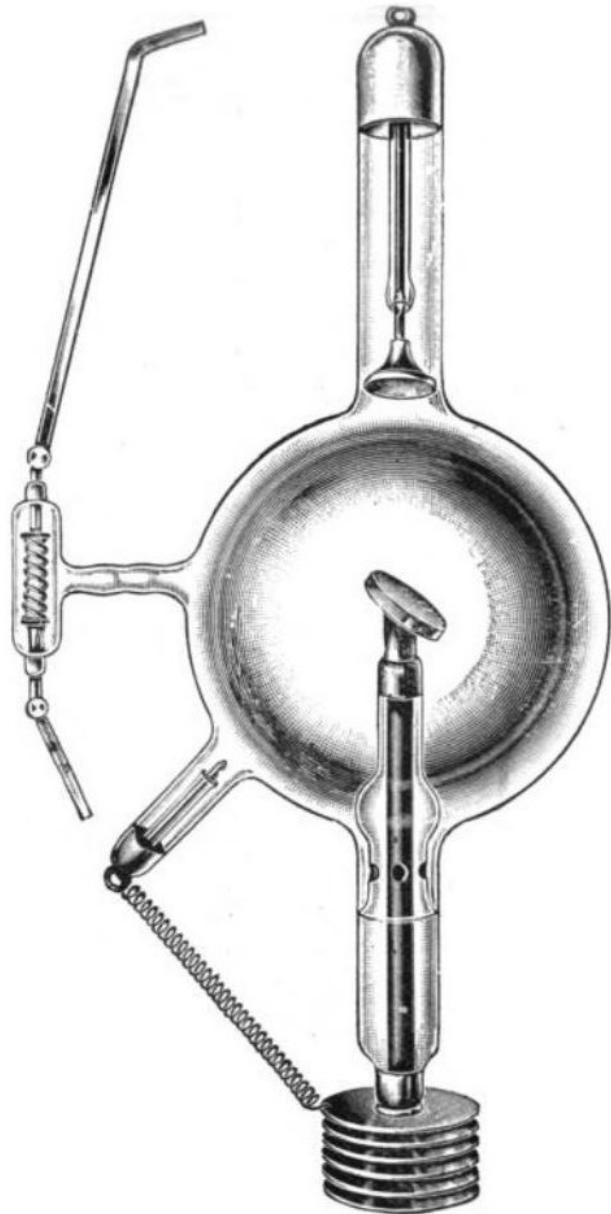


miohemeritina

hemoglobin

bacterioclorofila a

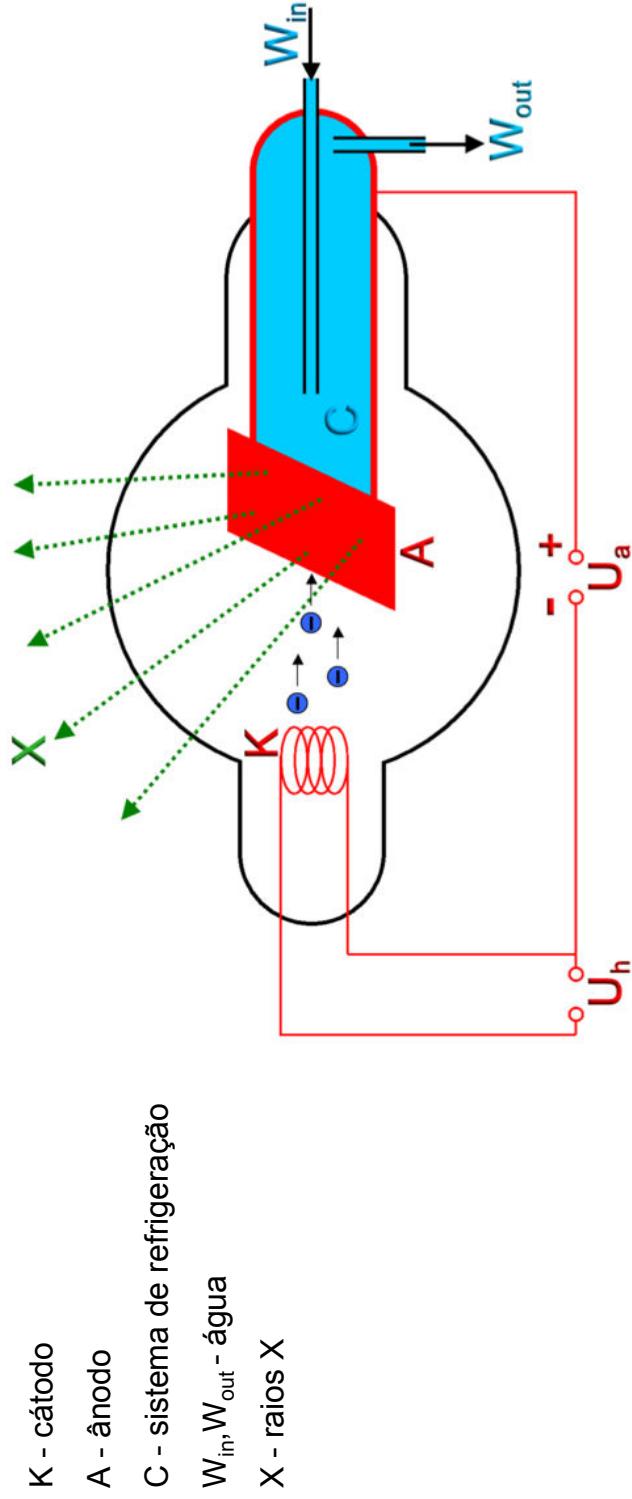
# Produção de raios X



## 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 (*Bremstrahlung*, radiação de travagem)
- O primeiro tipo de tubo de raios X, muito pouco eficiente. Opera com um vácuo de cerca de um 1 Torr

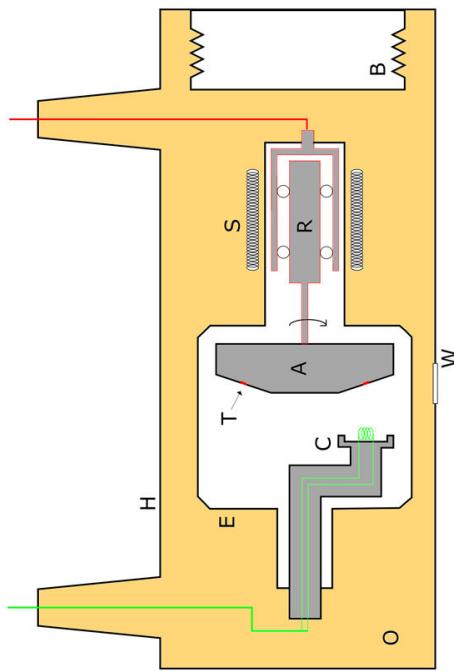
# Produção de raios X



## Tubo de Coolidge

- Os electrões libertam-se do cátodo por emissão termiônica, 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

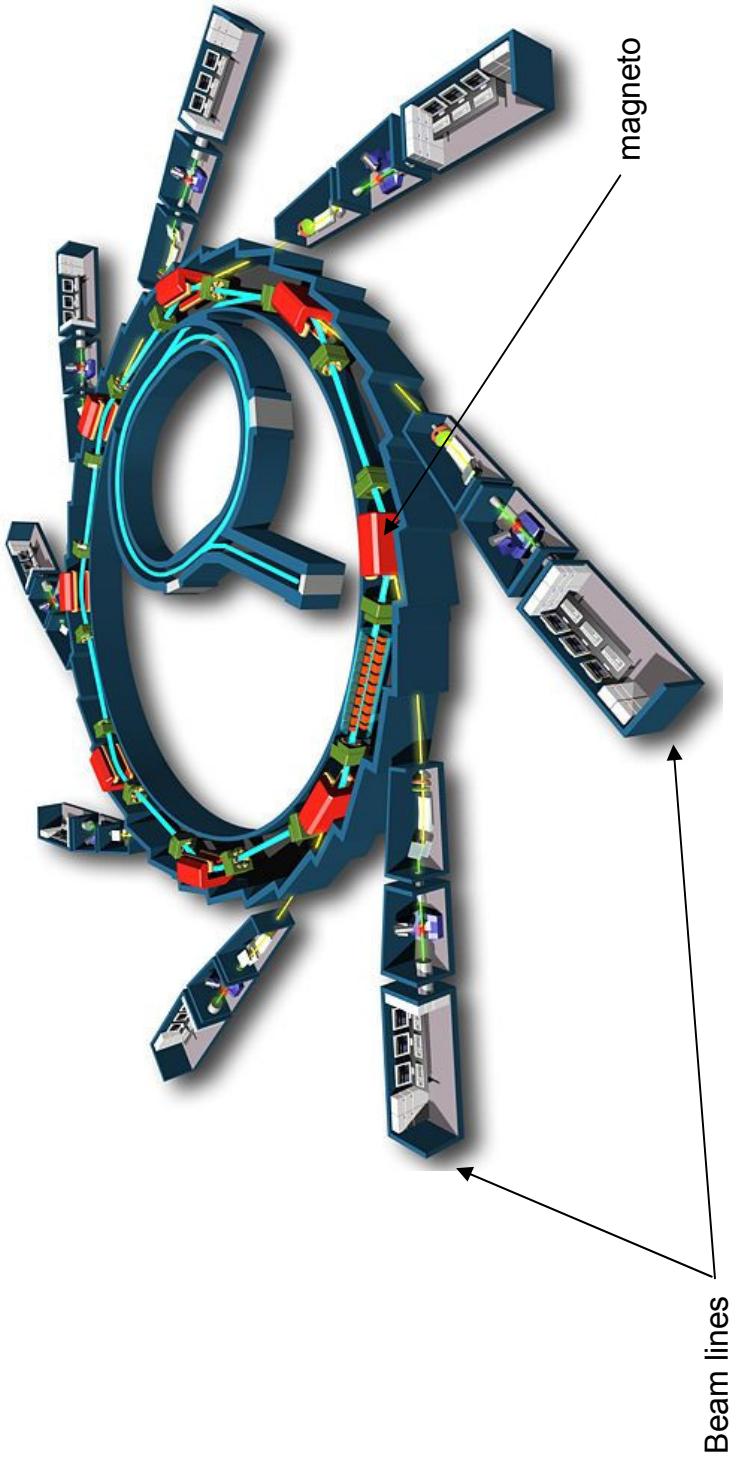
W - janela

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



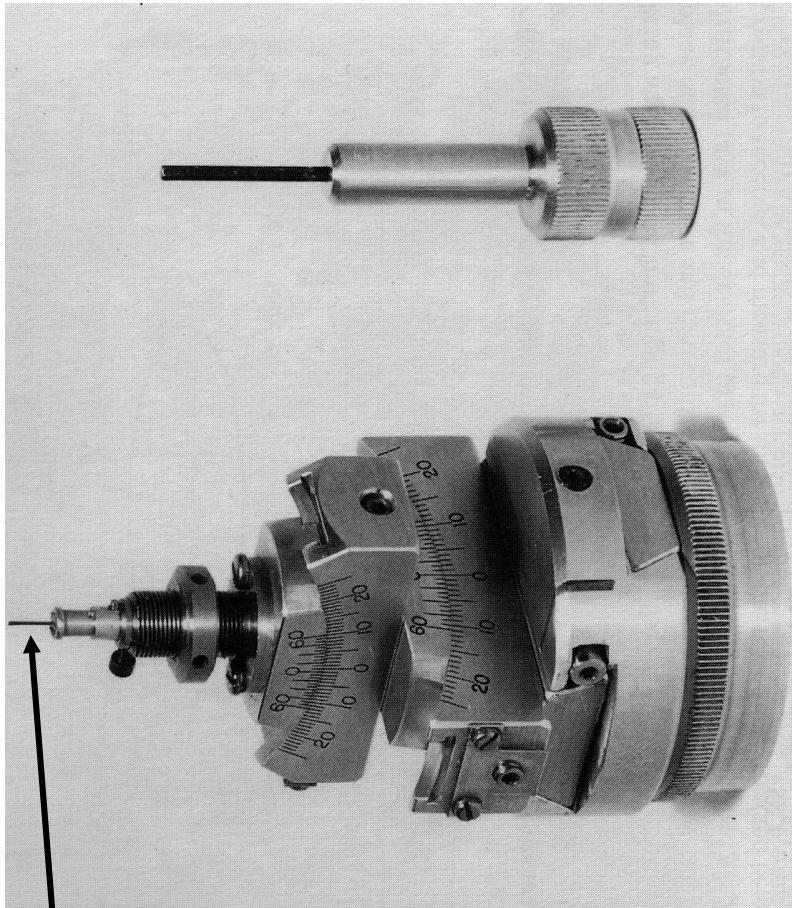
- Radiação X produzida pela aceleração de elétrões num acelerador circular (*sincrotrão*)
- Produz feixes extraordinariamente intensos, que podem ser monocromáticos ou policromáticos
- Permite tempos de medição muito mais curtos
- Instalações geridas e partilhadas por consórcios de países, p.ex o ESRF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

**ESRF**



# Recolha de dados - goniómetro

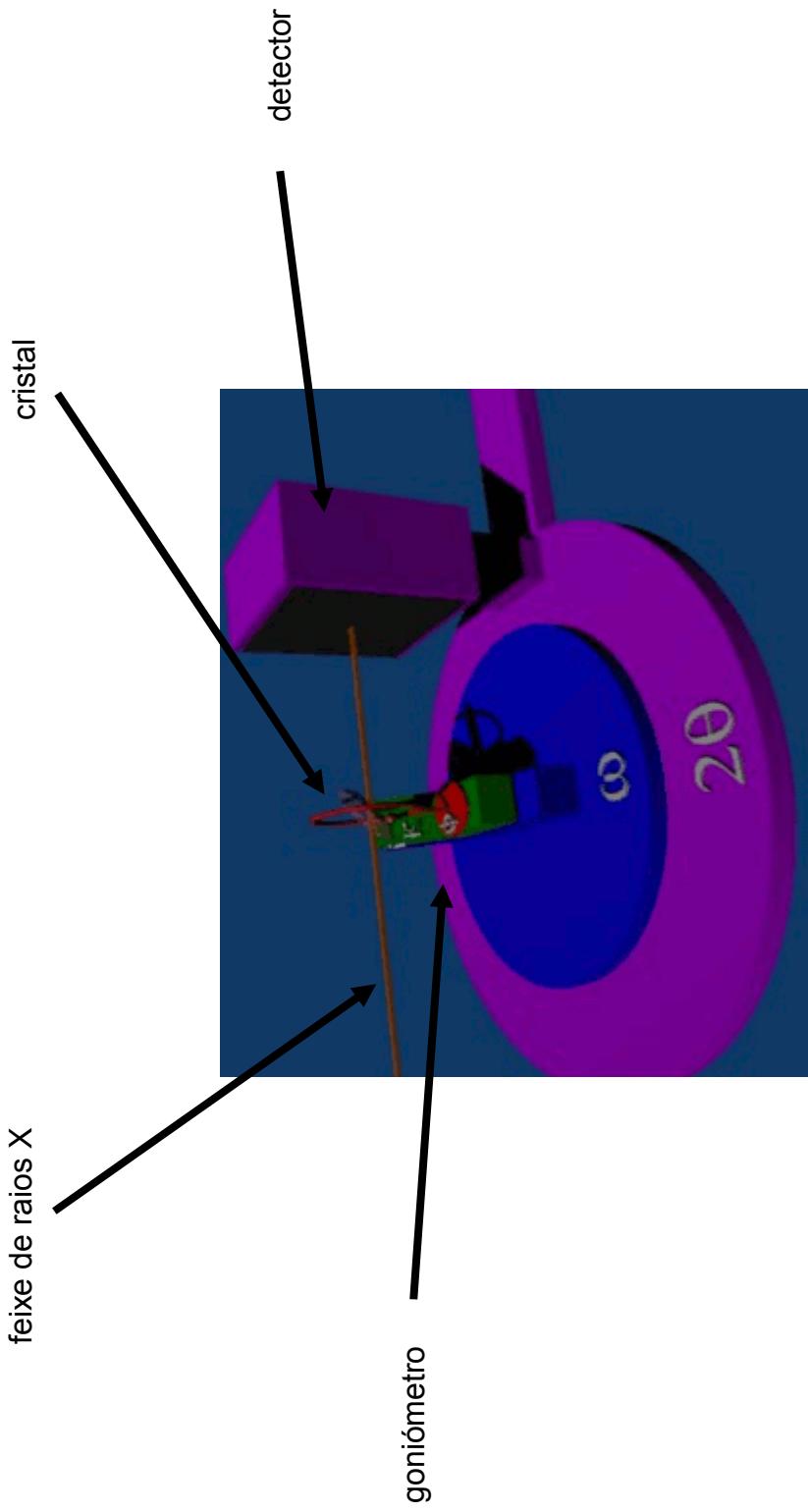
- O cristal é montado numa cabeça móvel (goniómetro), que permite a orientação do cristal de acordo com os seus eixos de simetria



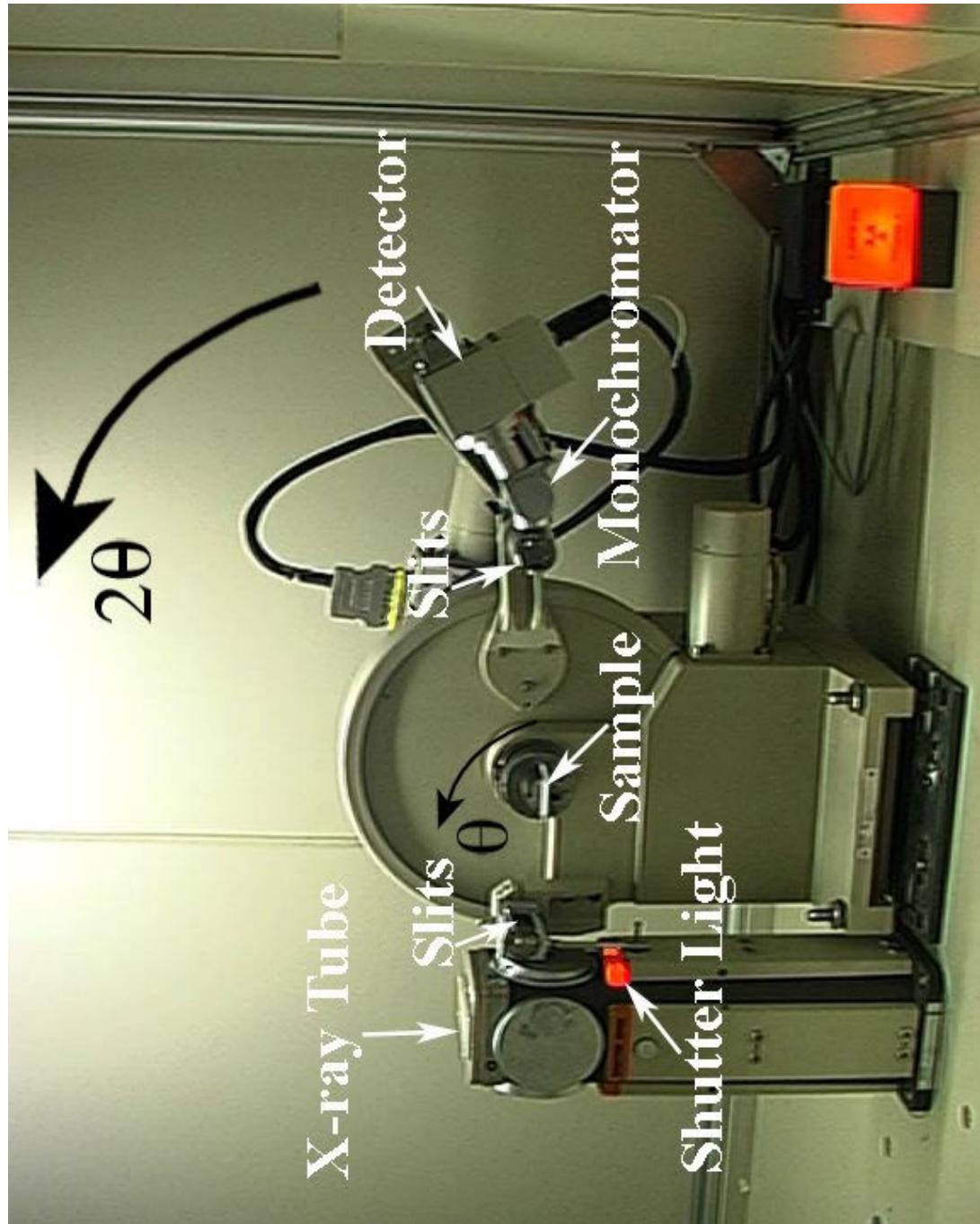
Goniómetro

# Recolha de dados

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

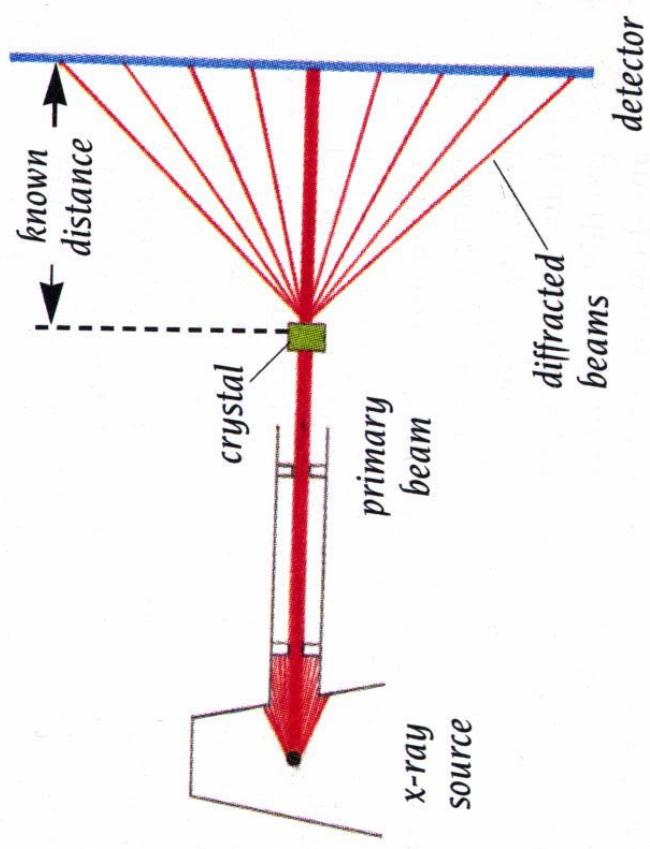
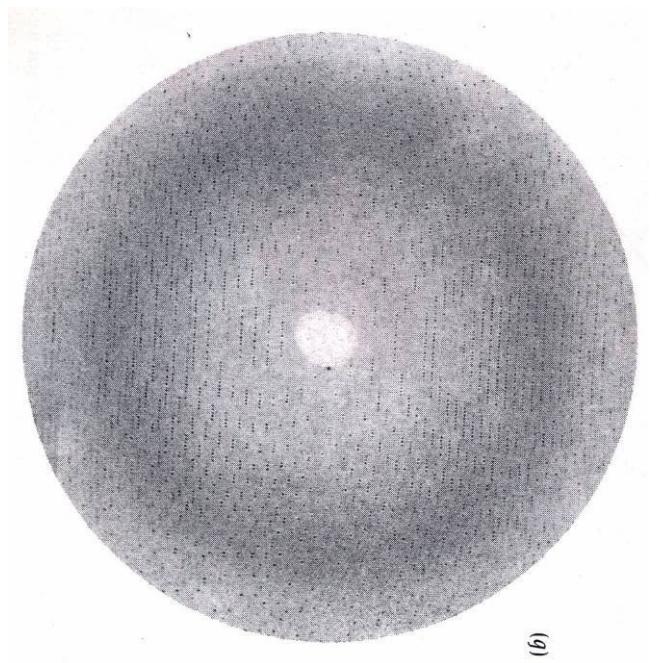


# Difractómetro de raios X

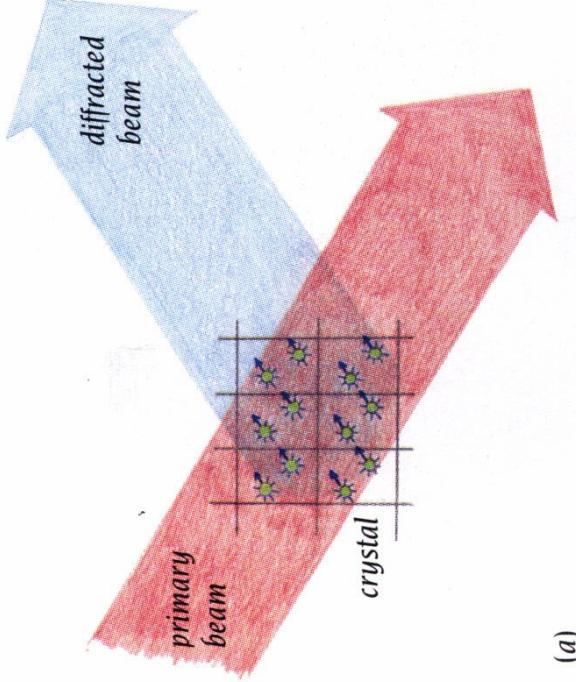


# Dados de difracção

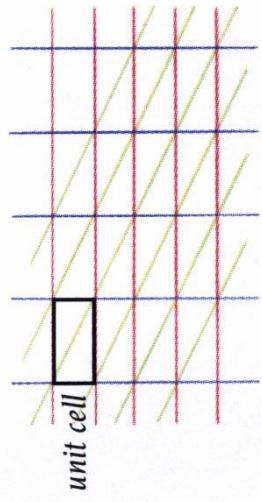
- Os raios X difractados pelo cristal produzem um padrão de pontos na superfície do detector.



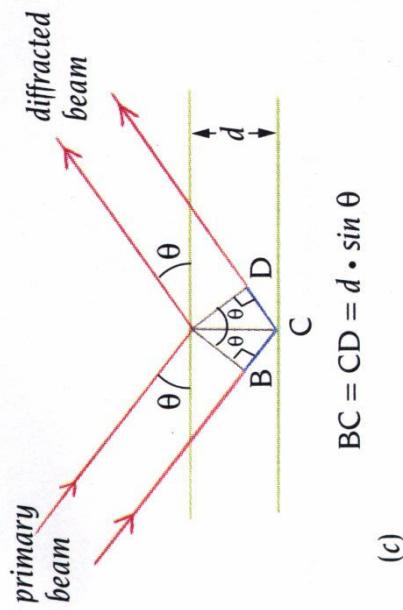
# Lei de Bragg



(a)



(b)

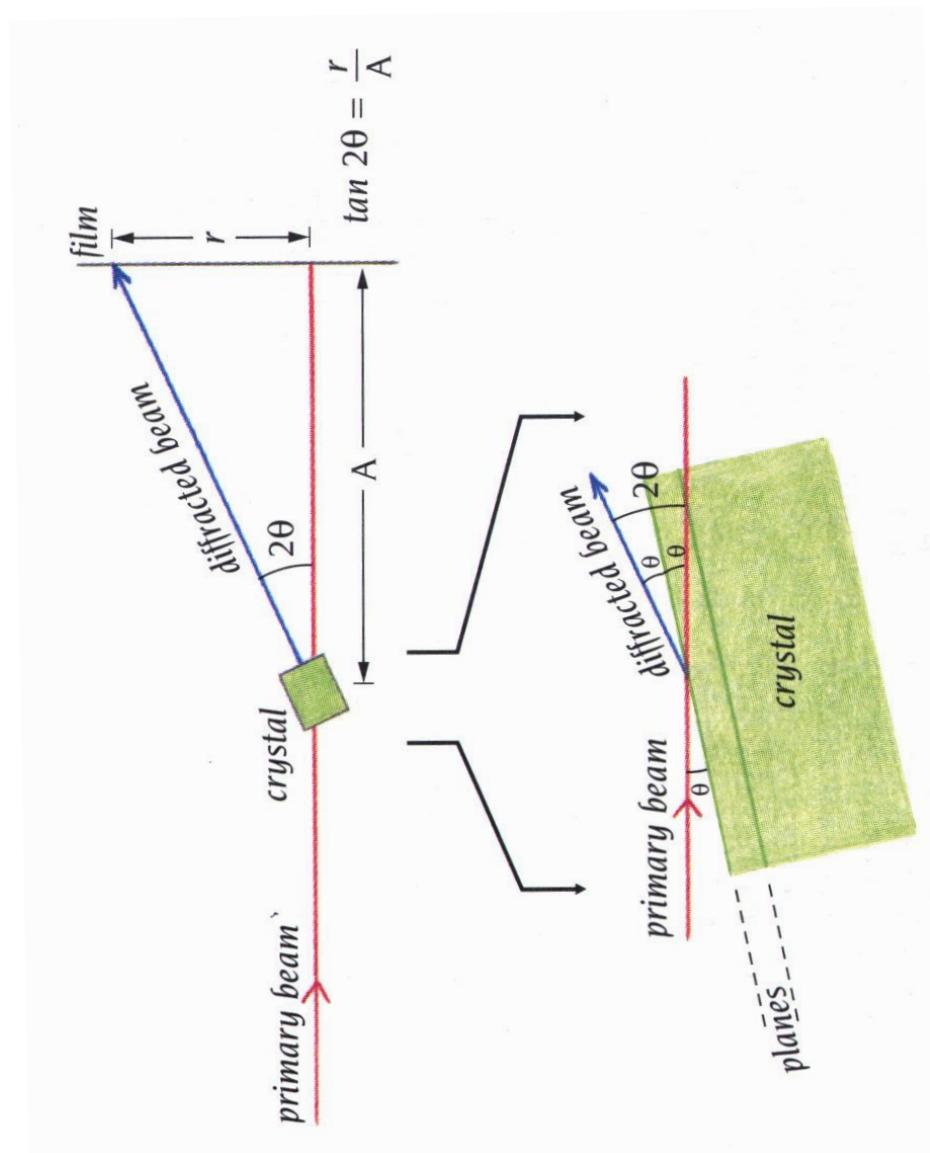


(c)

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

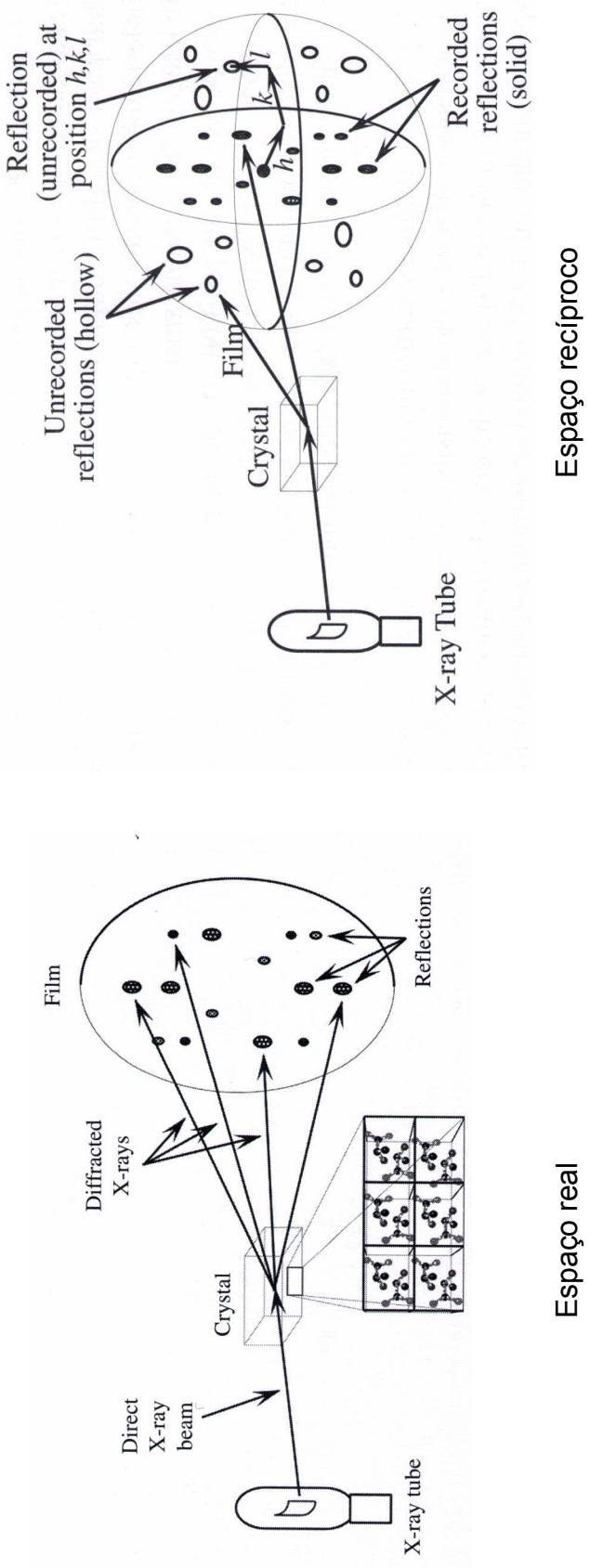
# Cálculo da distância entre planos

- 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.

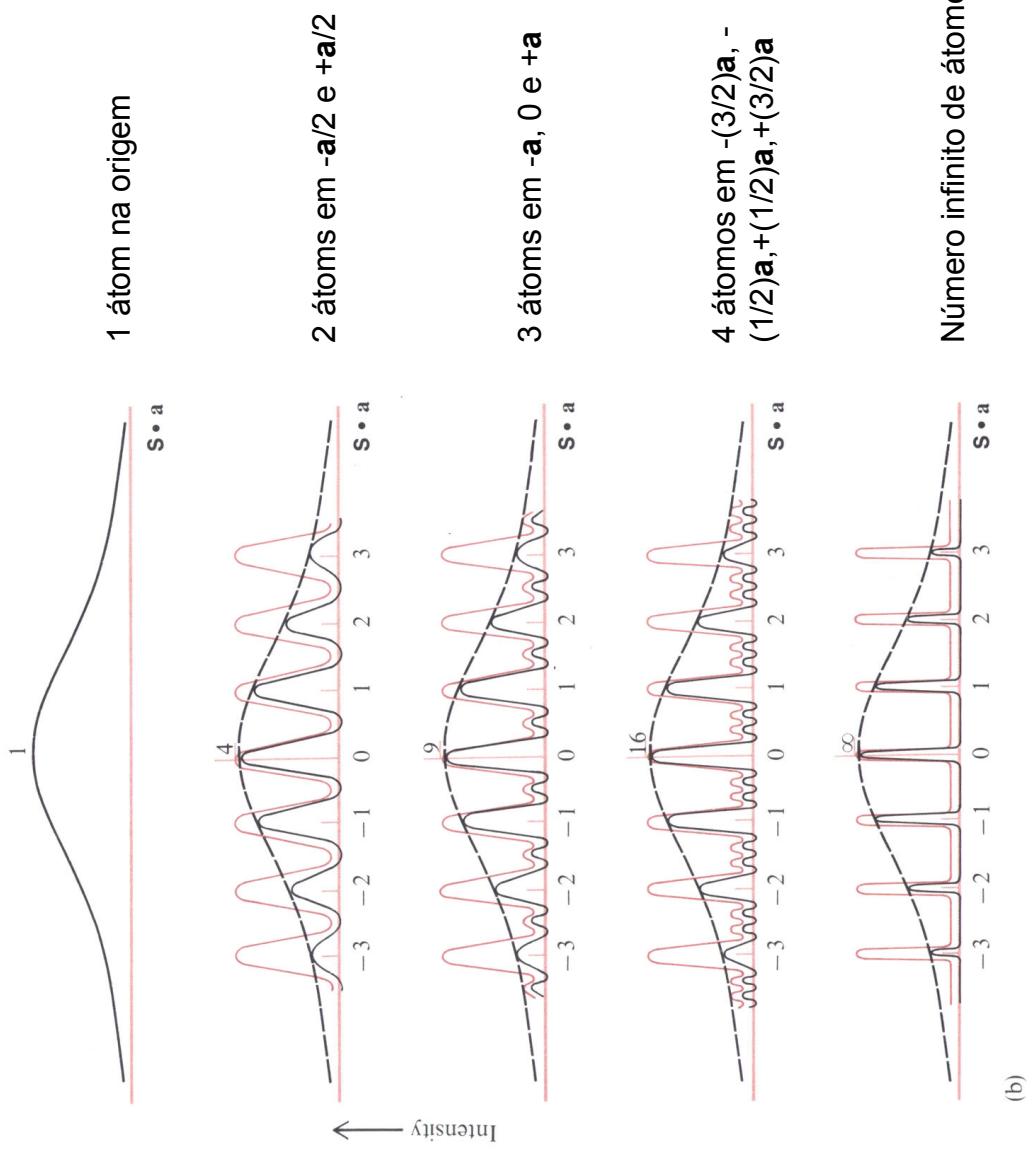
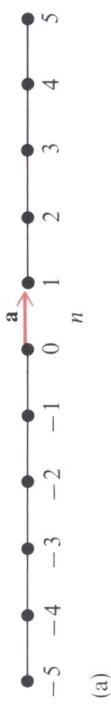


# Espaço real versus espaço recíproco

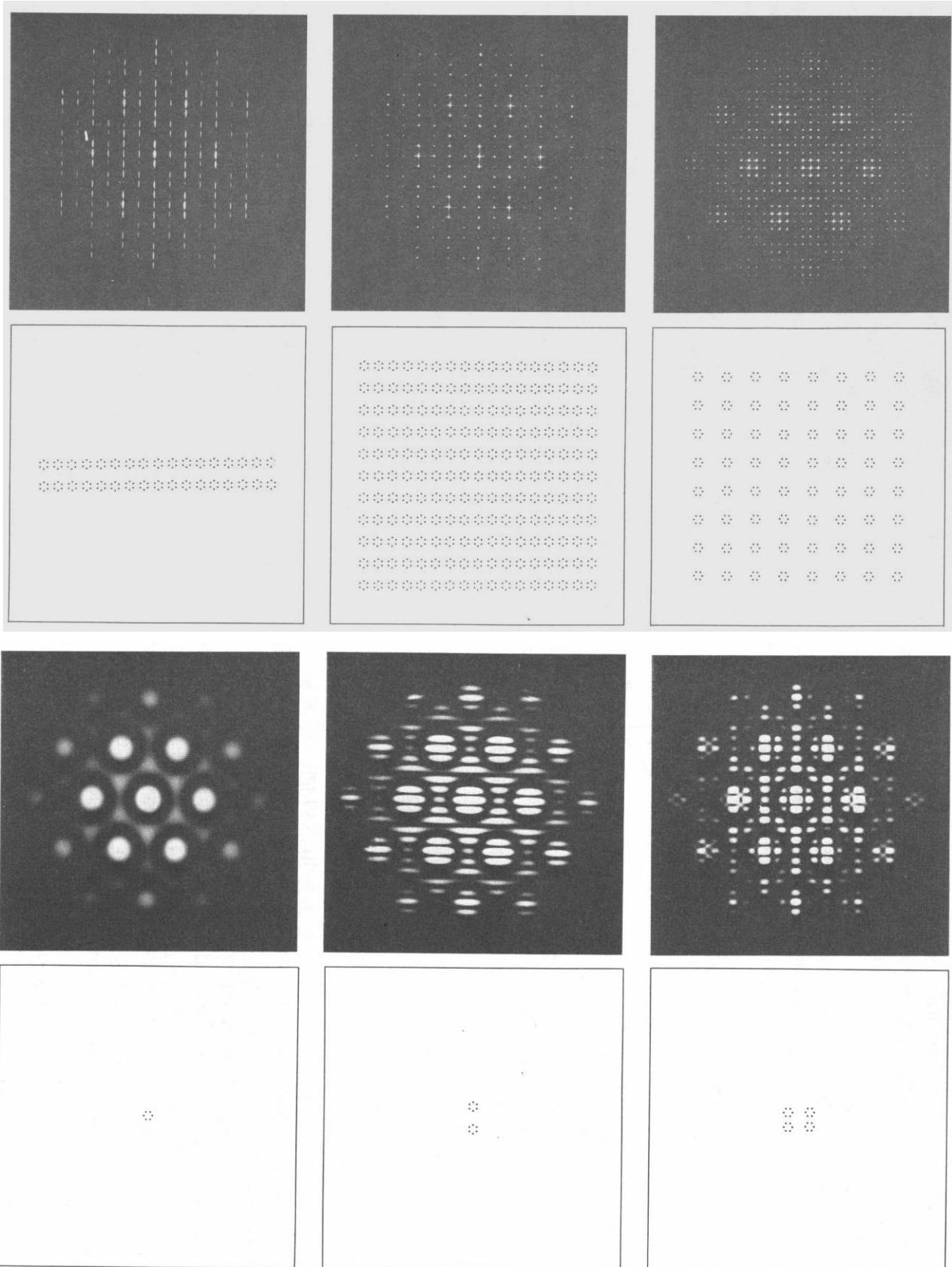
- Os dados recolhidos pelo detector podem ser encarados como sendo uma secção numa rede tridimensional de pontos igualmente espaçadas. A cada conjunto de planos no cristal corresponde um ponto do espaço recíproco.



# Espalhamento e periodicidade

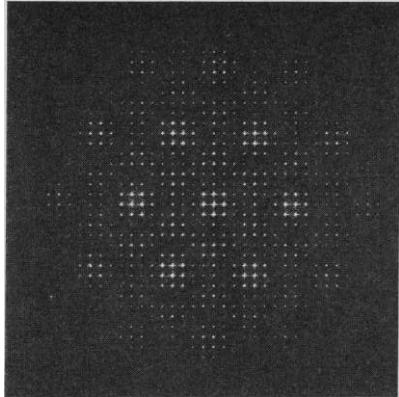


# Espalhamento numa rede bi-dimensional

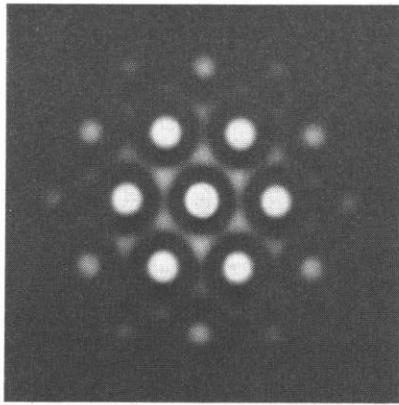
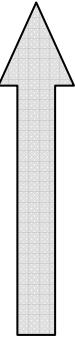


# Reconstrução da estrutura

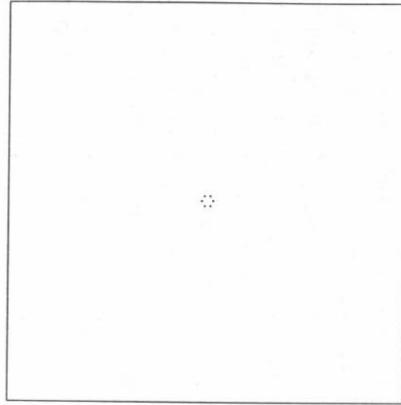
O padrão produzido por um retículo periódico de moléculas é idêntico ao da molécula isolado, mas apenas mensurável num conjunto discreto de pontos:



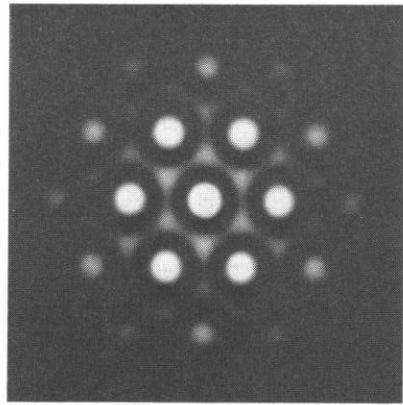
periodicidade



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



Transformada de Fourier



# Reconstrução da estrutura

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

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

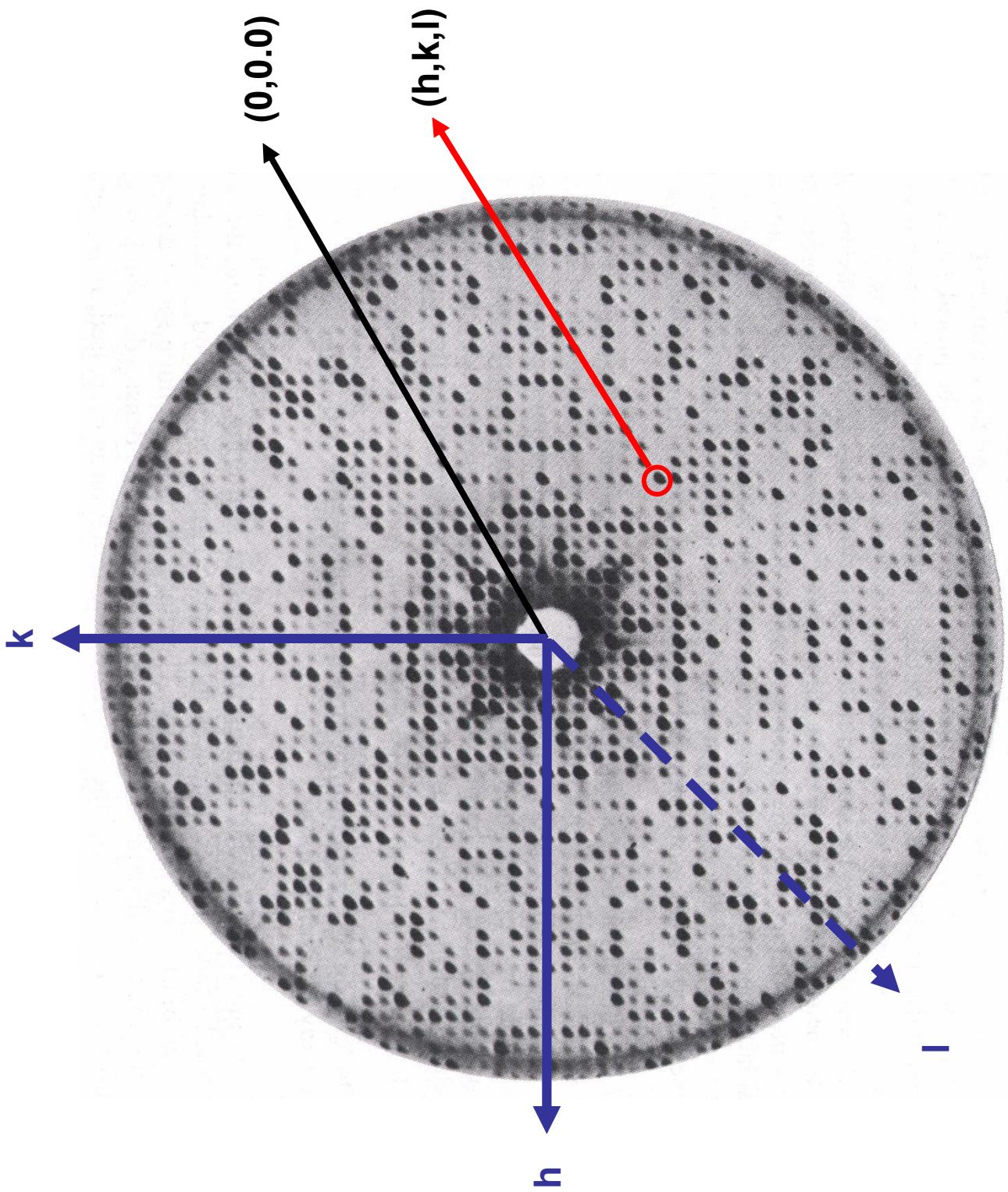
- A densidade electrónica  $\rho(x,y,z)$  pode ser calculada a partir de

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

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:

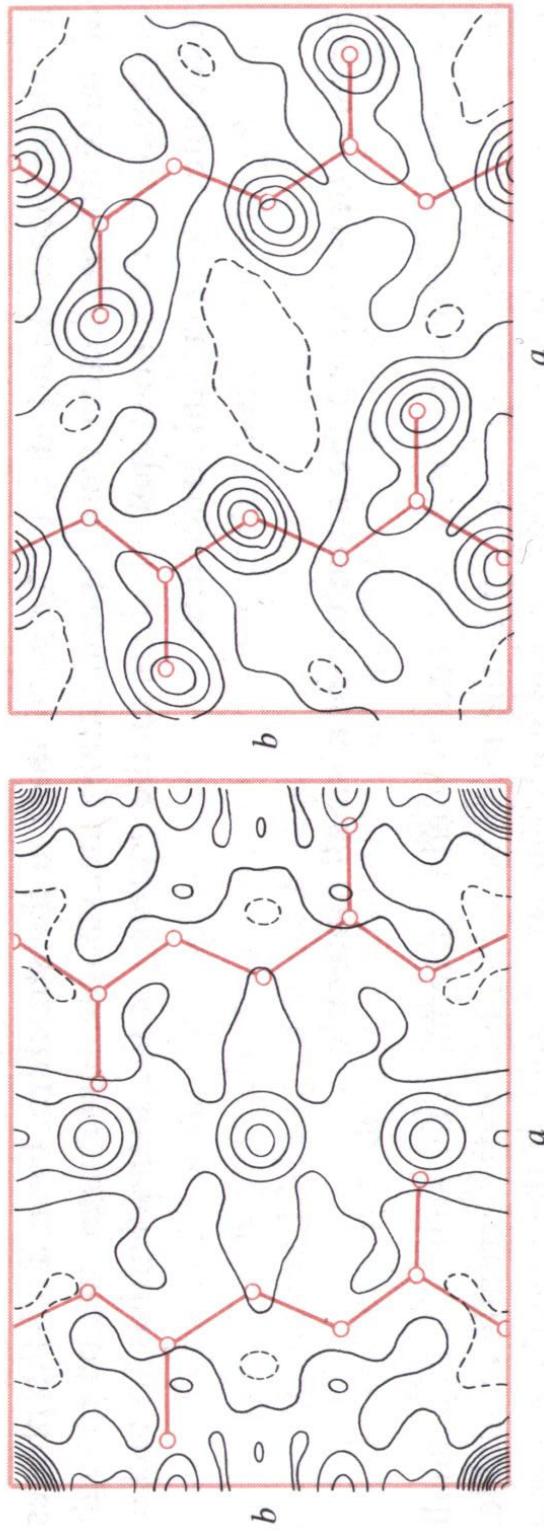
$$I \propto |F_{hkl}|^2$$



## 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

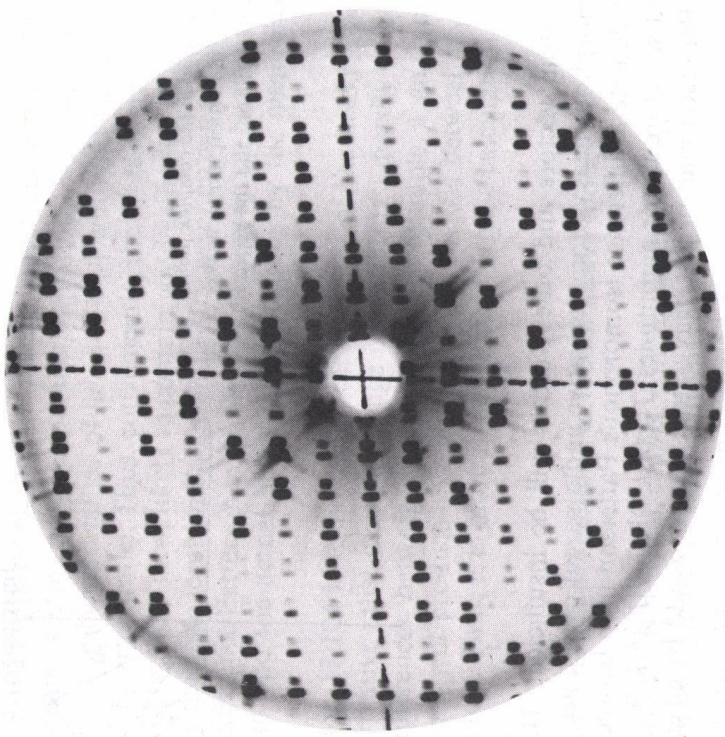
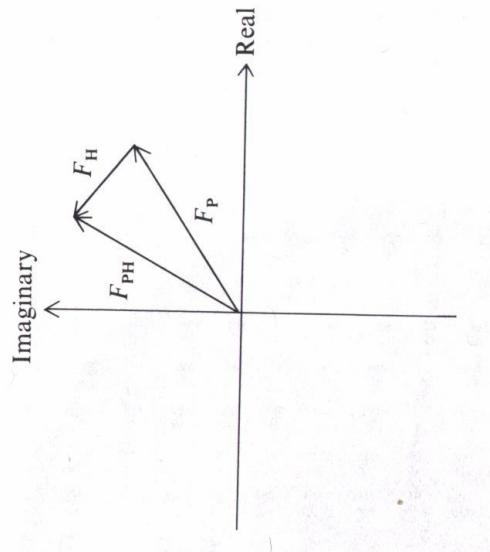
# Importância das fases



Síntese de Fourier usando apenas as intensidades  
Síntese de Fourier usando apenas as fases

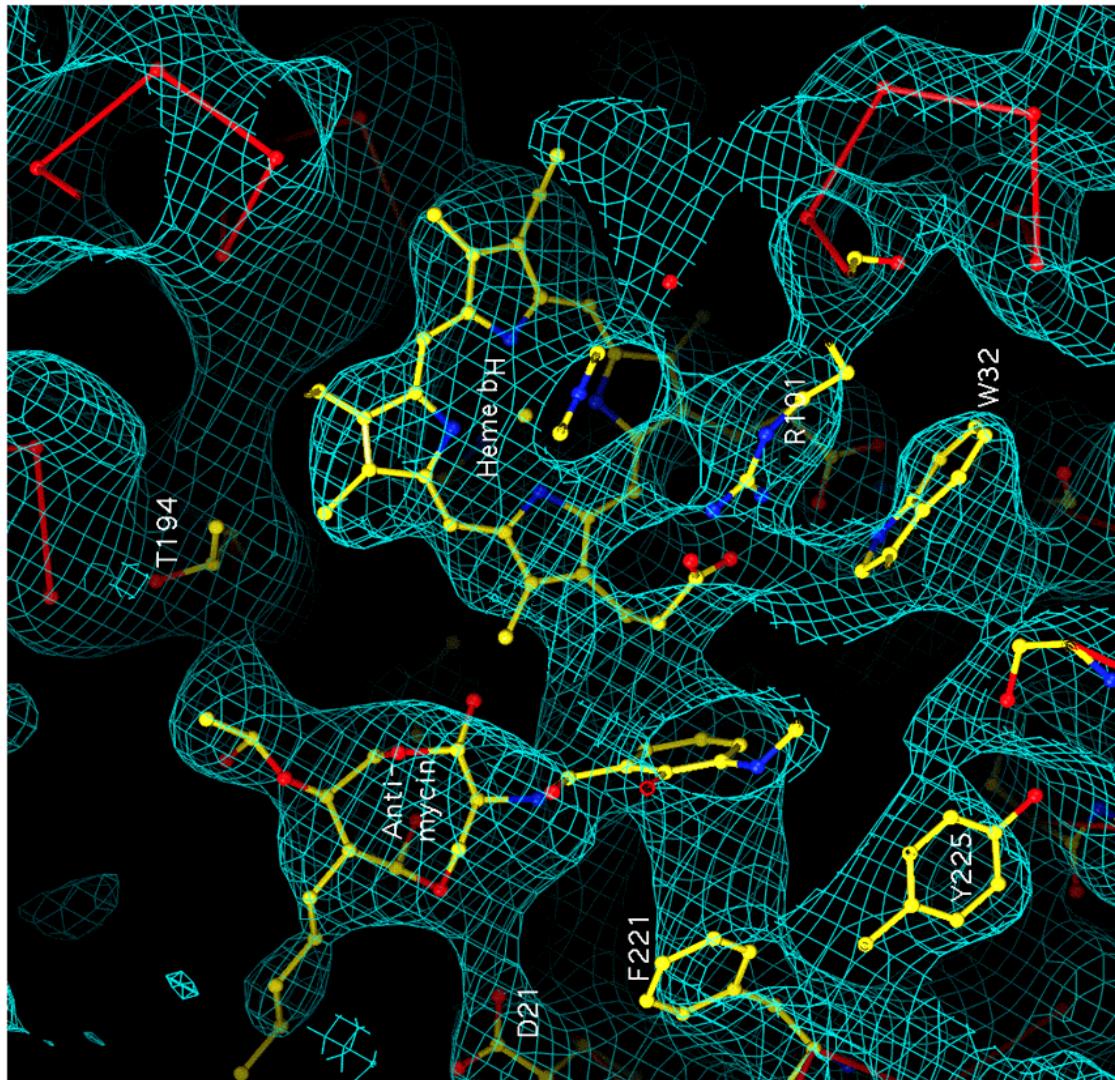
$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

# Substituição isomórfica

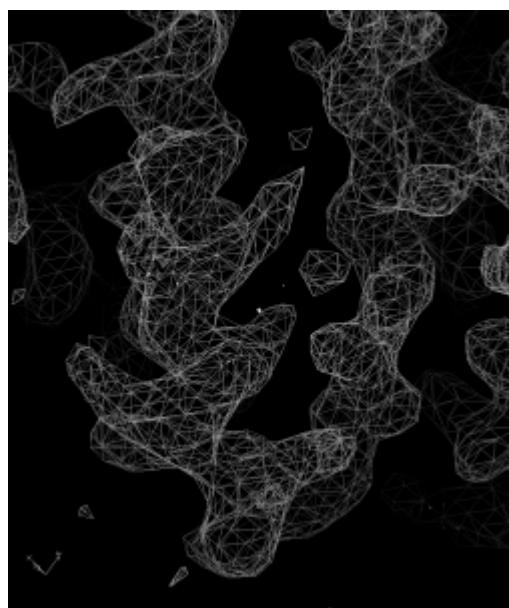
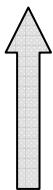
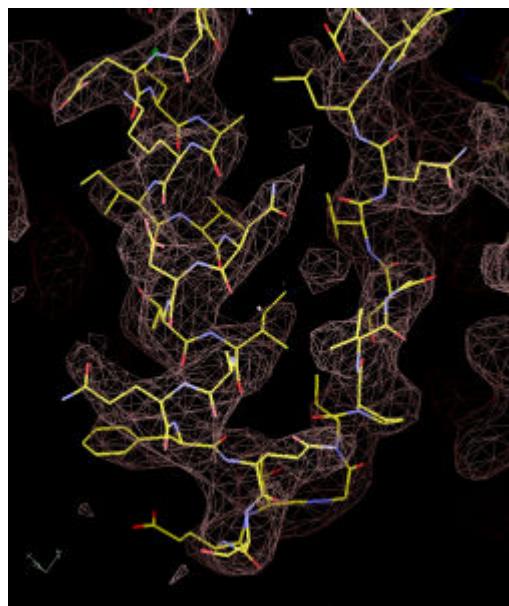


- Um único átomo de mercúrio é capaz de produzir uma diferença média de 30% entre os factores de estrutura da molécula original ( $F_p$ ) e a molécula substituída ( $F_{pH}$ ) para uma proteína de 40000 d !

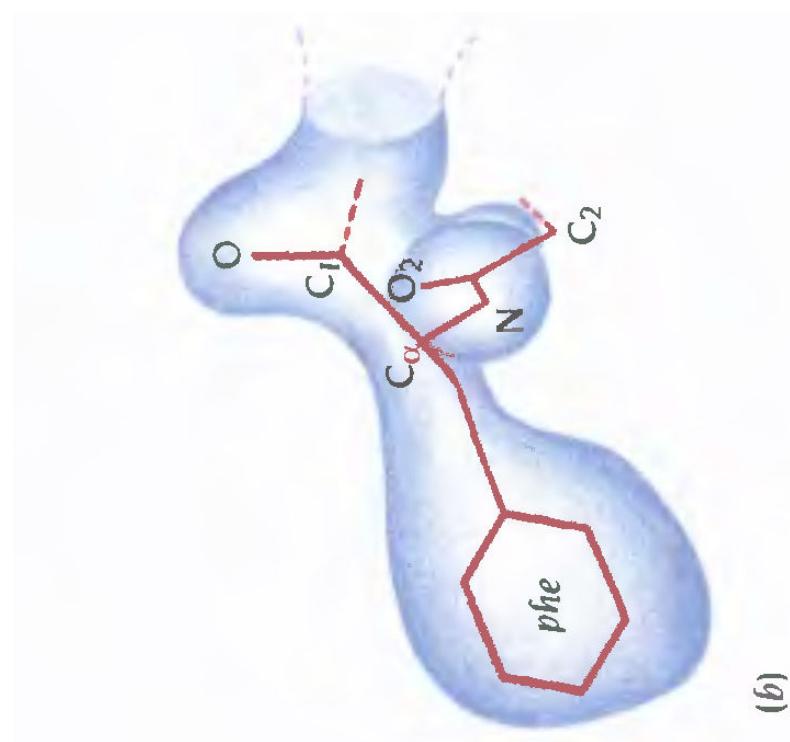
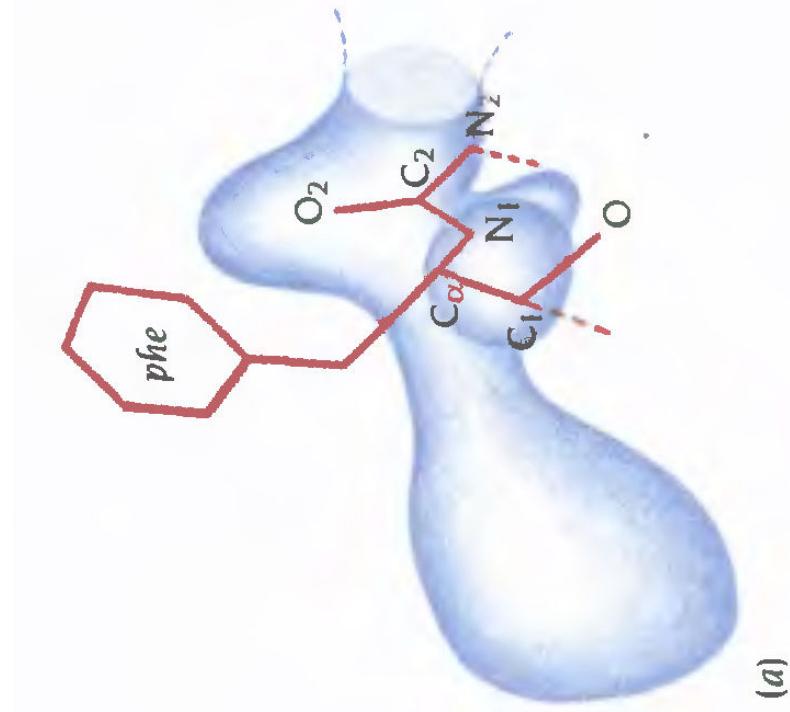
# Densidade electrónica



# Interpretar a densidade



# Modelar a estrutura na densidade electrónica



## 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

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

# Efeito da resolução

