

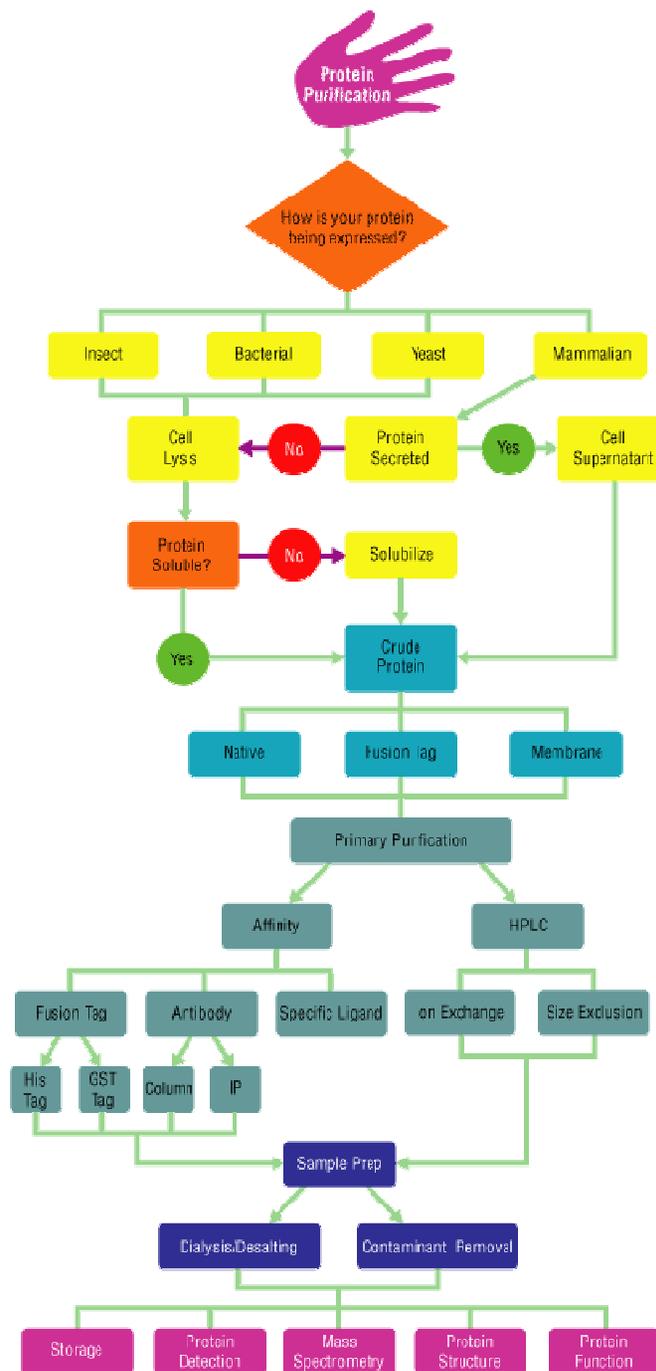
Métodos de determinação da estrutura de macromoléculas

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

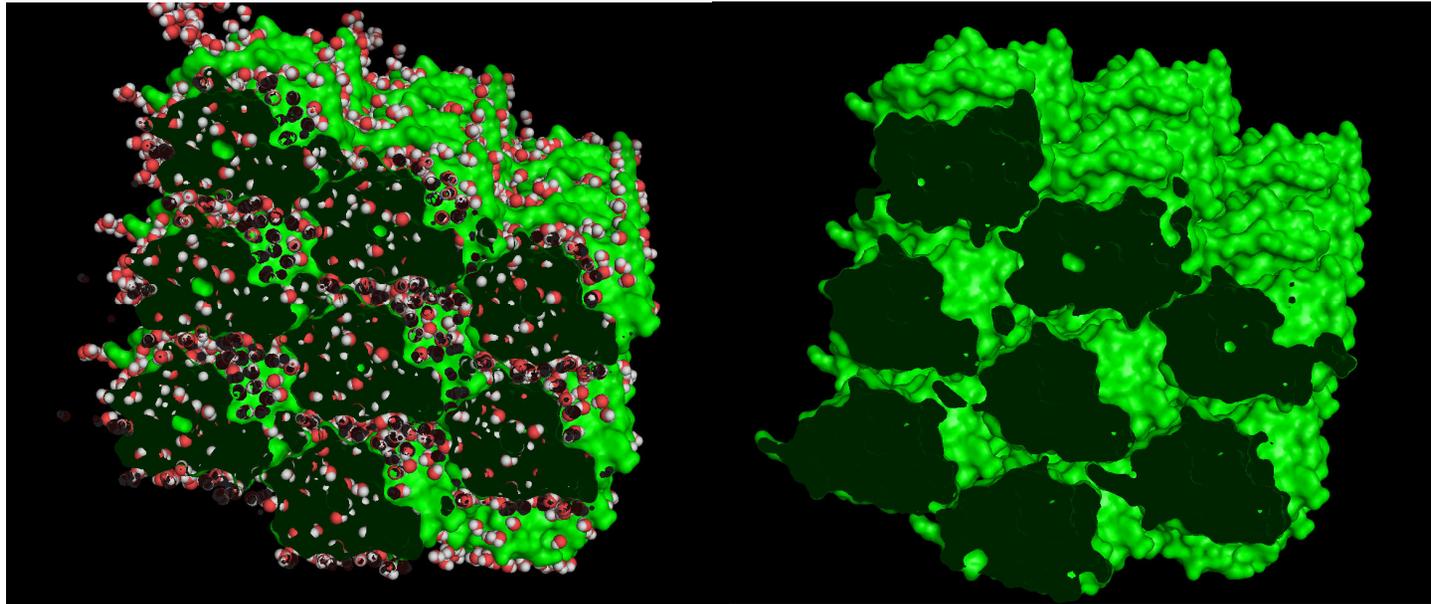
Purificação

- 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

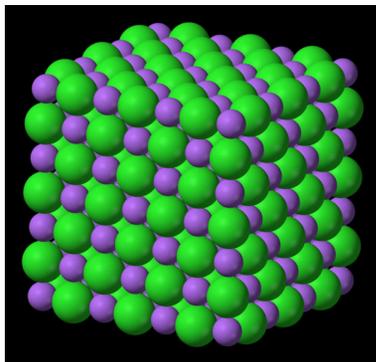


Cristalização

- **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)
- **Depedendência 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

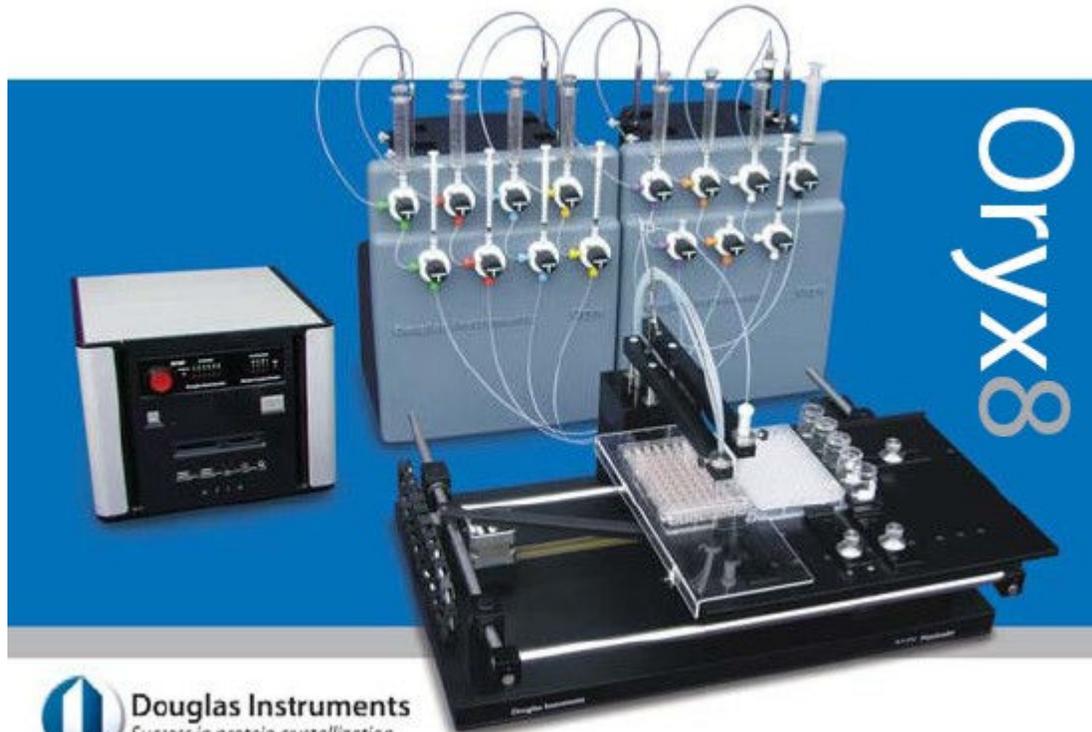


Cristal de cloreto de sódio

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

- *Cristal vs solução*

Robô de cristalização



 **Douglas Instruments**
Success in protein crystallization

Software de controllo

Software interface for plate distribution control, showing a grid of wells (A-H, 1-12) and a detailed view of the selected well (D8).

Category Legend:

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

DISTRIBUTION PARAMETER:

Scope: **all lines**

Pattern: **- concentration**

Min/Step: **Min** 0.1, **Step** 0.1

- pH: **Constant** 7.0

Apply to all

Well D8 Content:

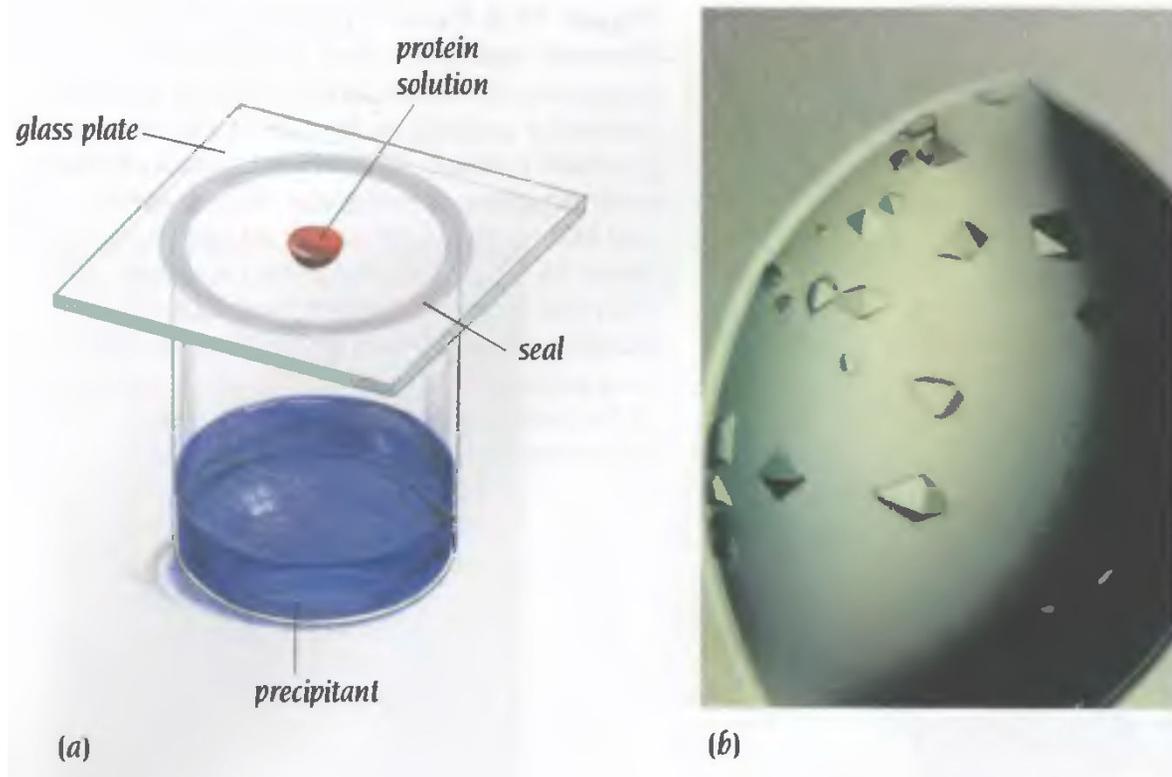
Liquid name	Volume μ l	Conc.	pH
C12E8	18.2	0.2 mM	-1.0
Sodium_Malonate	44.1	1.5 M	7.0
Water	37.7		

Color Legend Table:

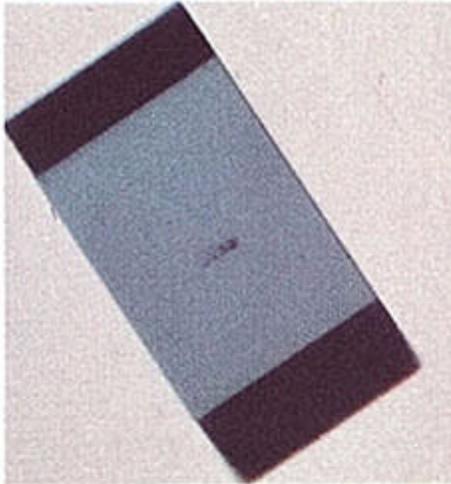
Color Legend	Category	Liquid name	Scope	Parameter	Pattern	Value	Value	Delete
Blue	Buffer	Sodium_Mal...	plate(conc, pH): A1->H12	Concentration	Constant	1.5	-1.0	<input checked="" type="checkbox"/>
Purple				pH	Constant	7.0	-1.0	<input checked="" type="checkbox"/>
Yellow	Salt	Tri-Ammoni...	all columns: A1->D6	Concentration	Min/Max	0.3	1.25	<input checked="" type="checkbox"/>
Green	Precipitant	Dioxane	all lines: E1->H12	Concentration	Min/Step	5.0	4.0	<input checked="" type="checkbox"/>
Light Blue	Detergent	C12E8	all lines: A7->D12	Concentration	Min/Step	0.1	0.1	<input checked="" type="checkbox"/>

Método da gota pendente

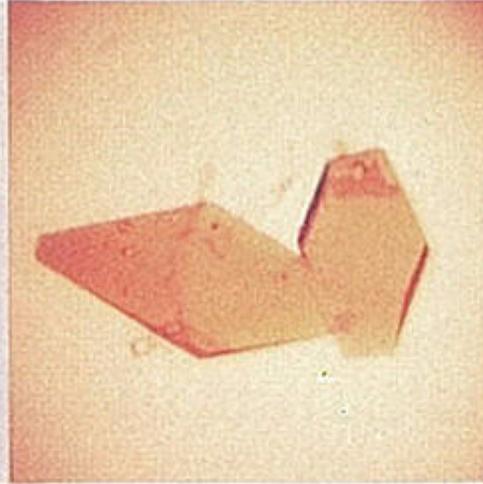
- Cerca de 10 μL de uma solução de 10 mg/ml de proteína é colocada numa placa de vidro
- A placa é invertida sobre um copo contendo ~ 1 mL de uma solução concentrada de precipitante, por exp. sulfato de amónia
- O equilíbrio entre a gota e a solução é atingido lentamente por difusão de vapor, e a concentração 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!)



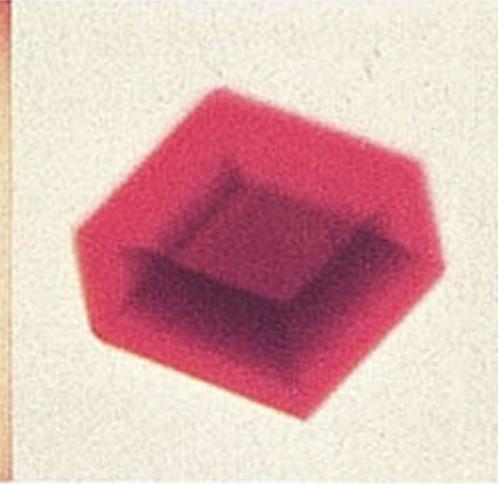
Cristais de proteína



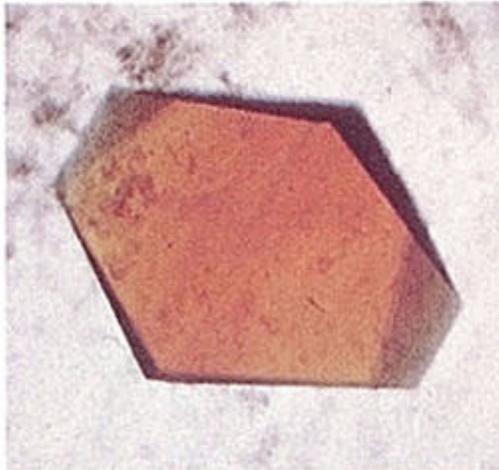
Azurina



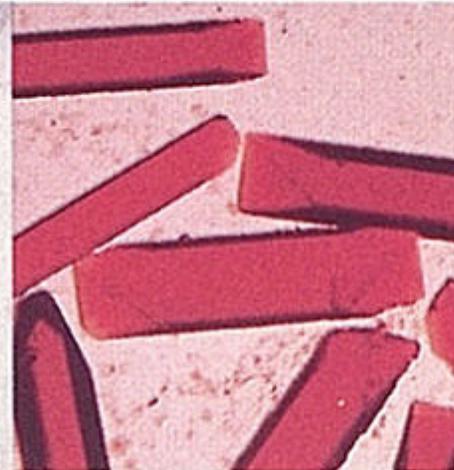
Flavodoxin



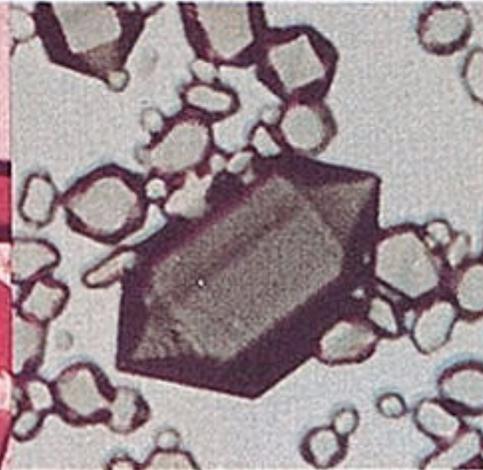
rubredoxin



miohemeritina

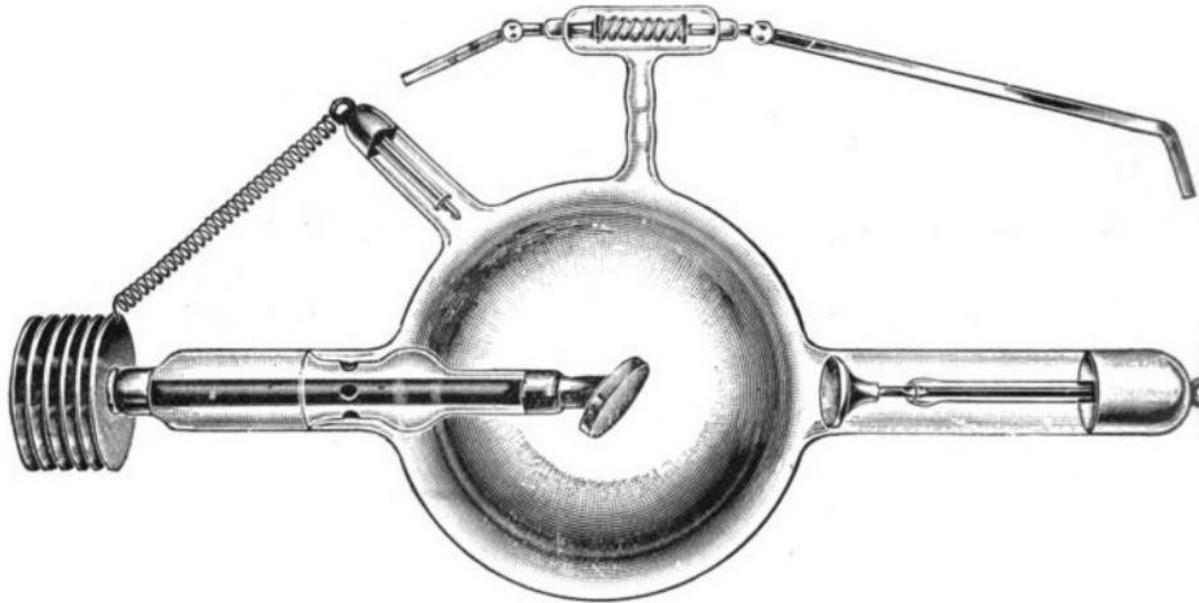


hemoglobin



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

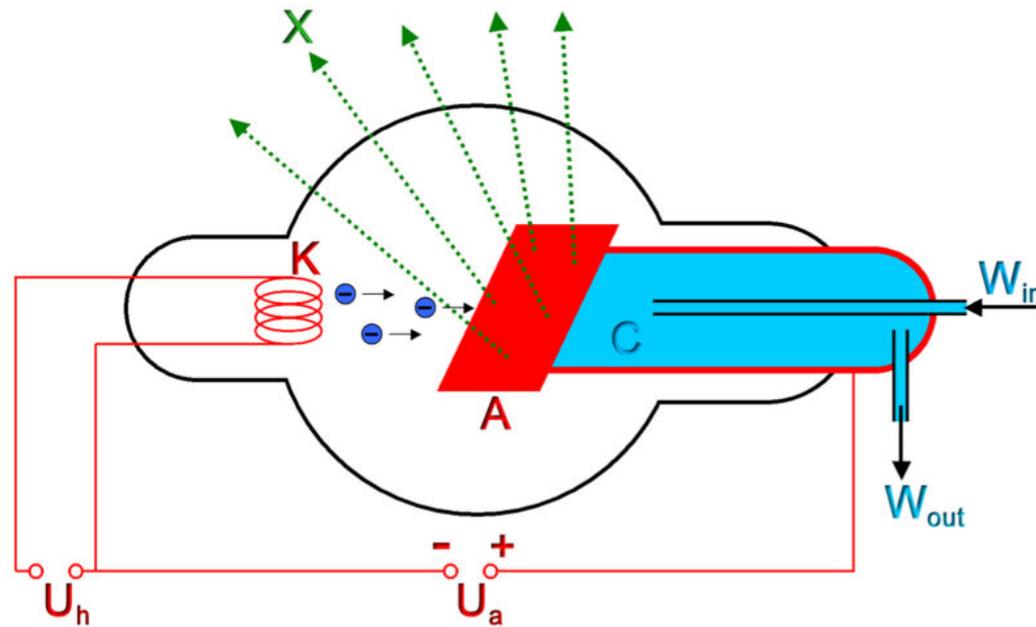
K - cátodo

A - ânodo

C - sistema de refrigeração

W_{in}, W_{out} - água

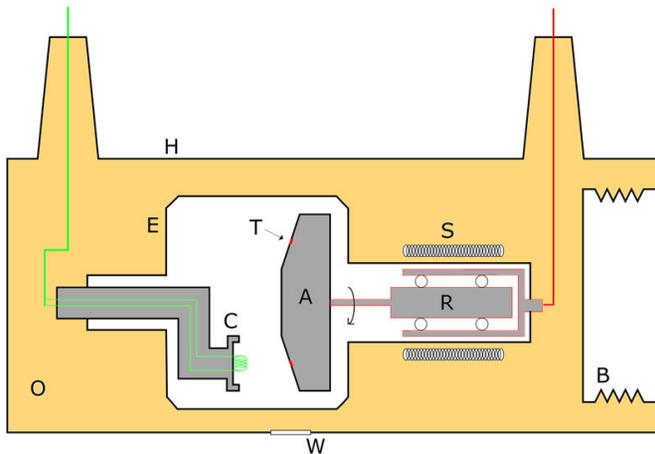
X - raios X



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

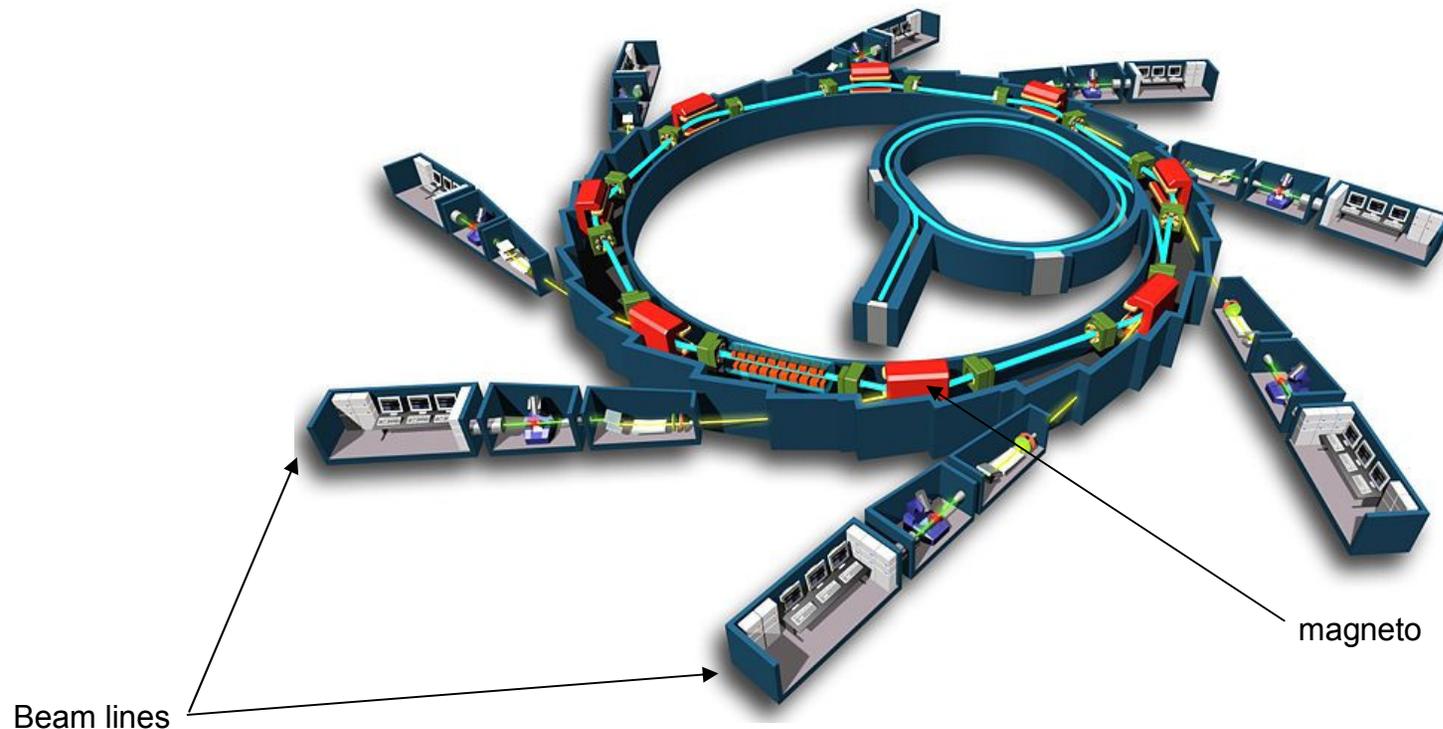


Tubo de Ânodo rotativo

- C - cátodo
- A - ânodo
- C - sistema de refrigeração
- W - janela
- T - zona alvo

- 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



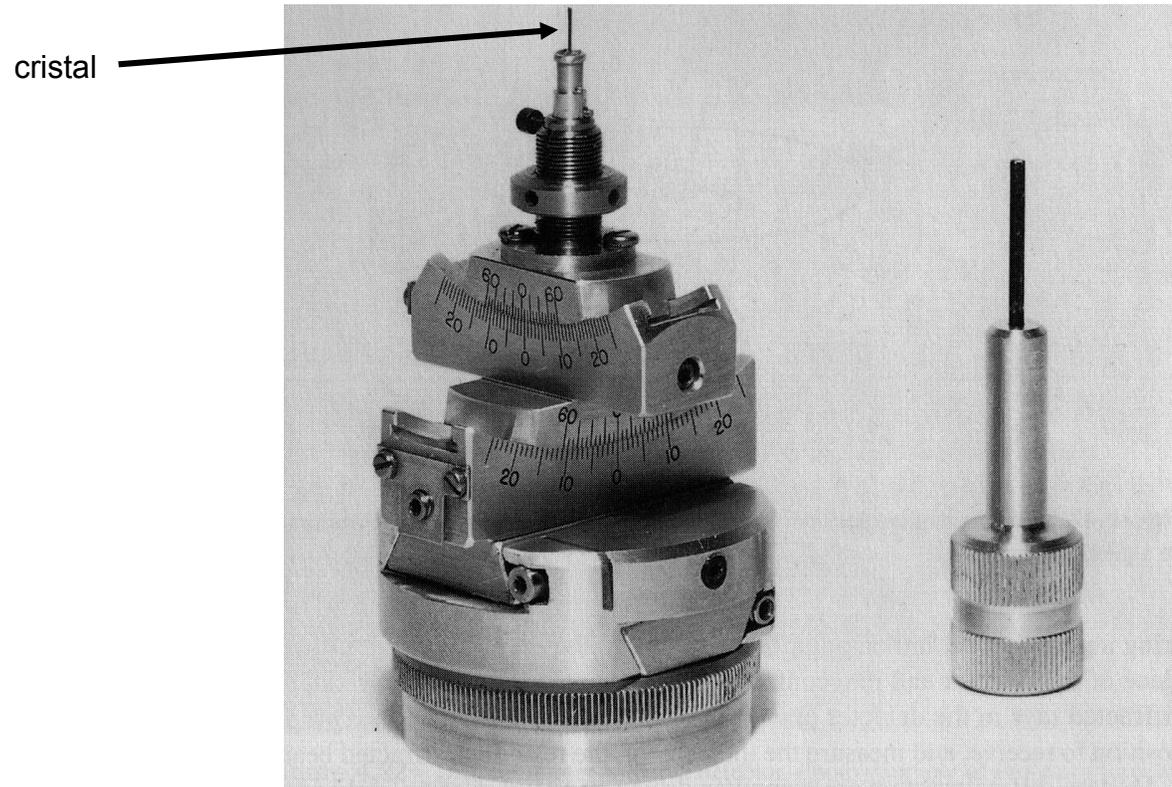
- Radiação X produzida pela aceleração de electrões num acelerador circular (sincrotrão)
- Produz feixes extraordinariamente intensos, que podem ser monocromáticos ou policromáticos
- Permite tempos de medição muito mais curtos
- Instalações geridas e partilhadas por consórcios de países, p.exp o ESRF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

ESRF



Recolha de dados - goniómetro

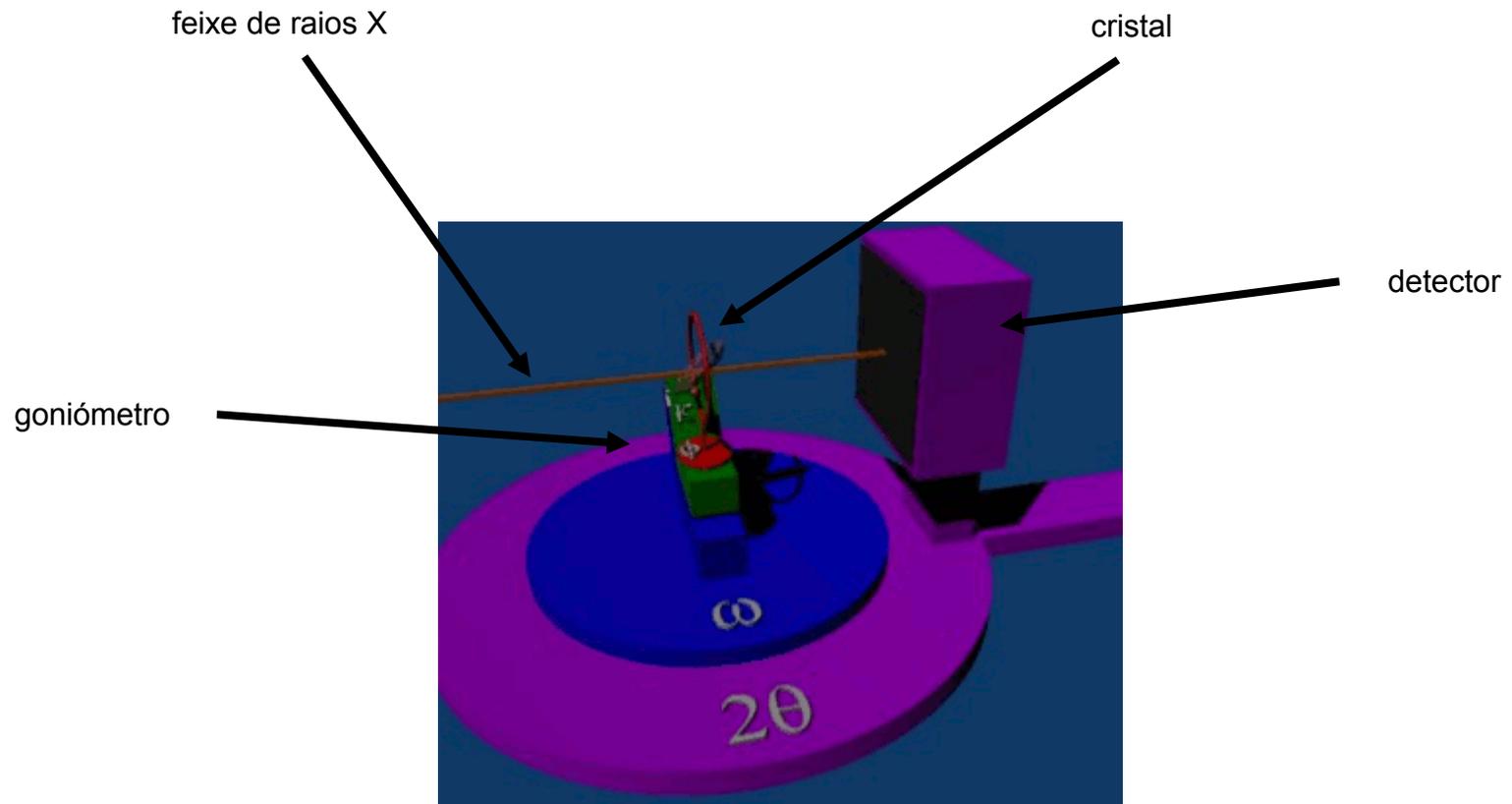
- O cristal é montado numa cabeça móvel (goniómetro), que permite a orientação do cristal de acordo com os seus eixos de simetria



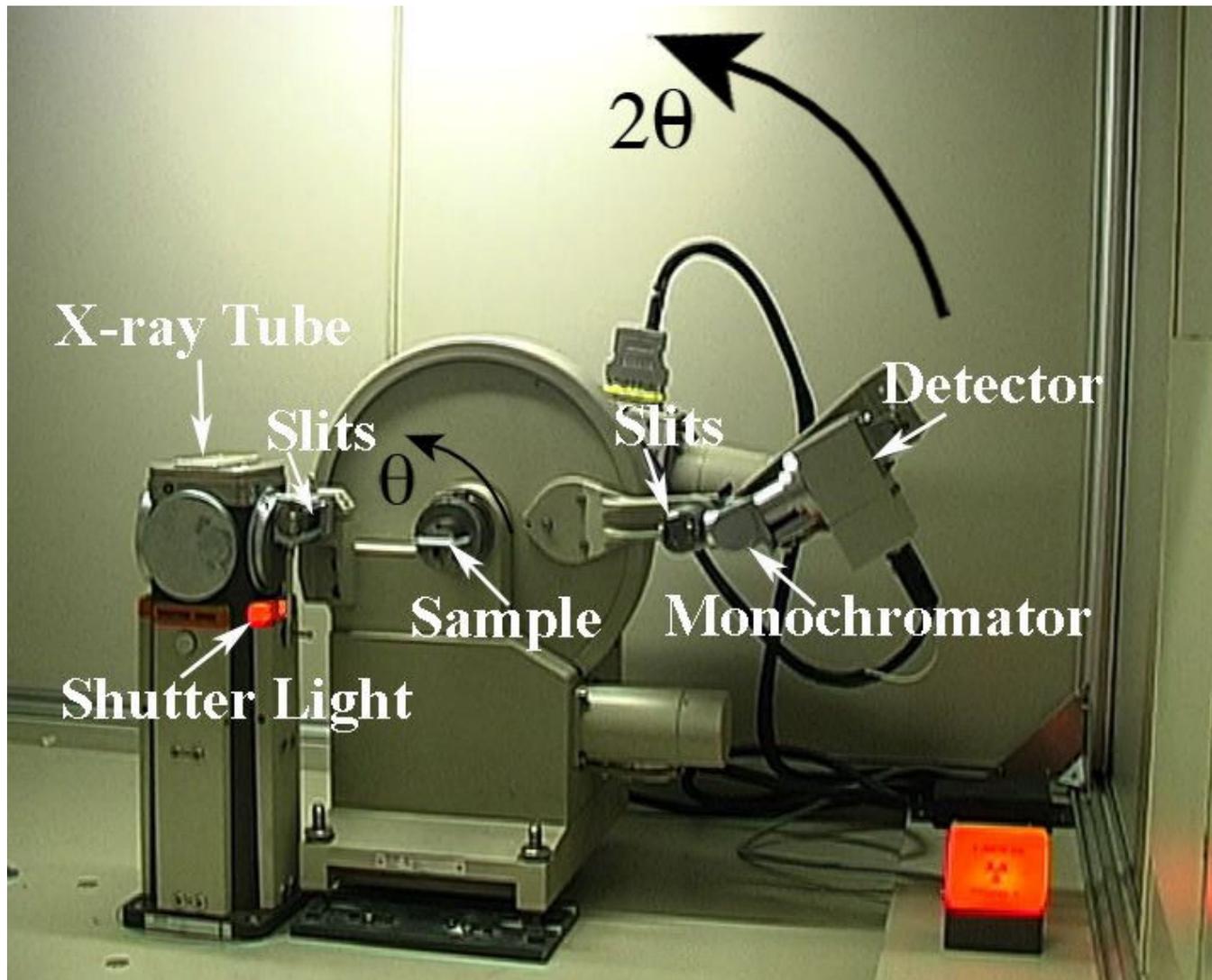
Goniómetro

Recolha de dados

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

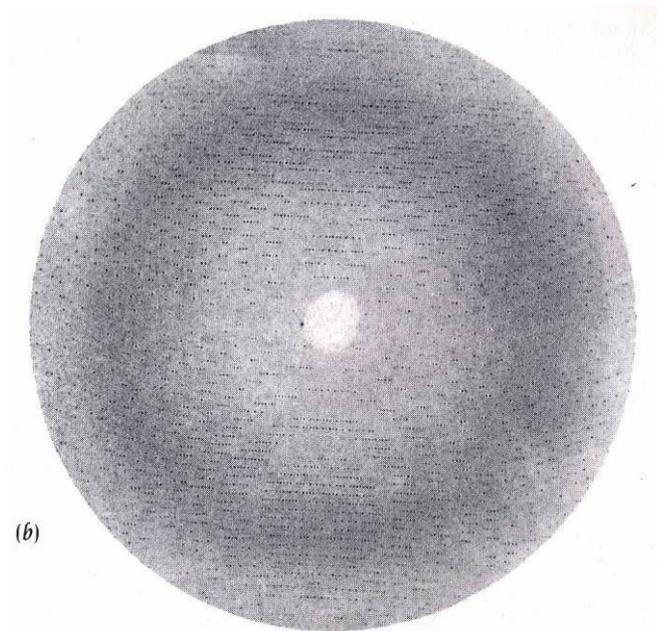
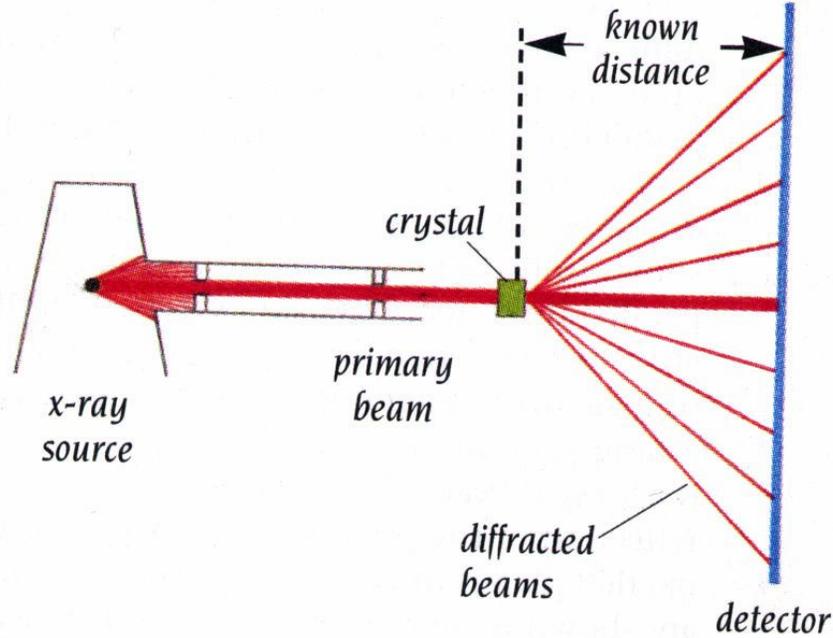


Difratómetro de raios X

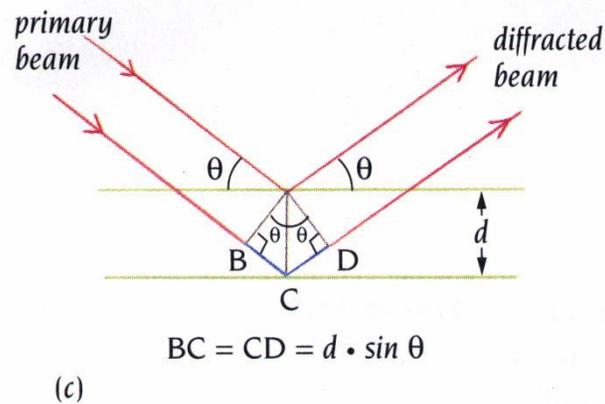
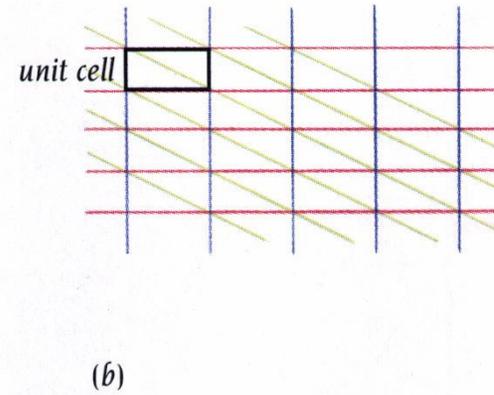
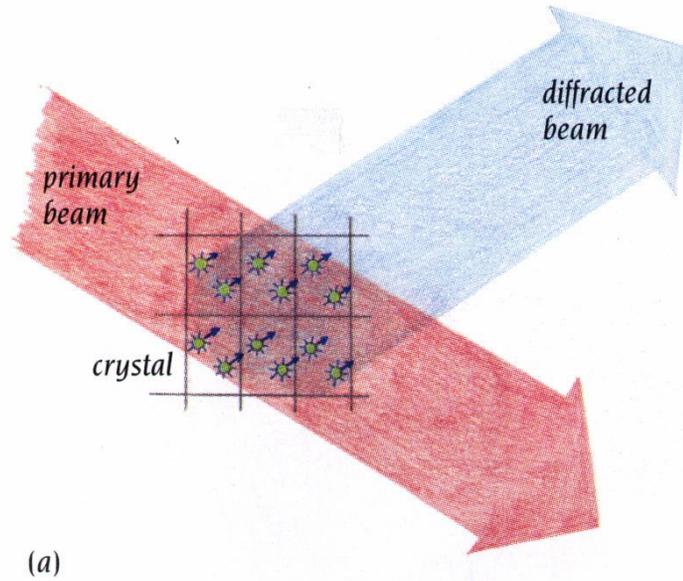


Dados de difracção

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



Lei de Bragg

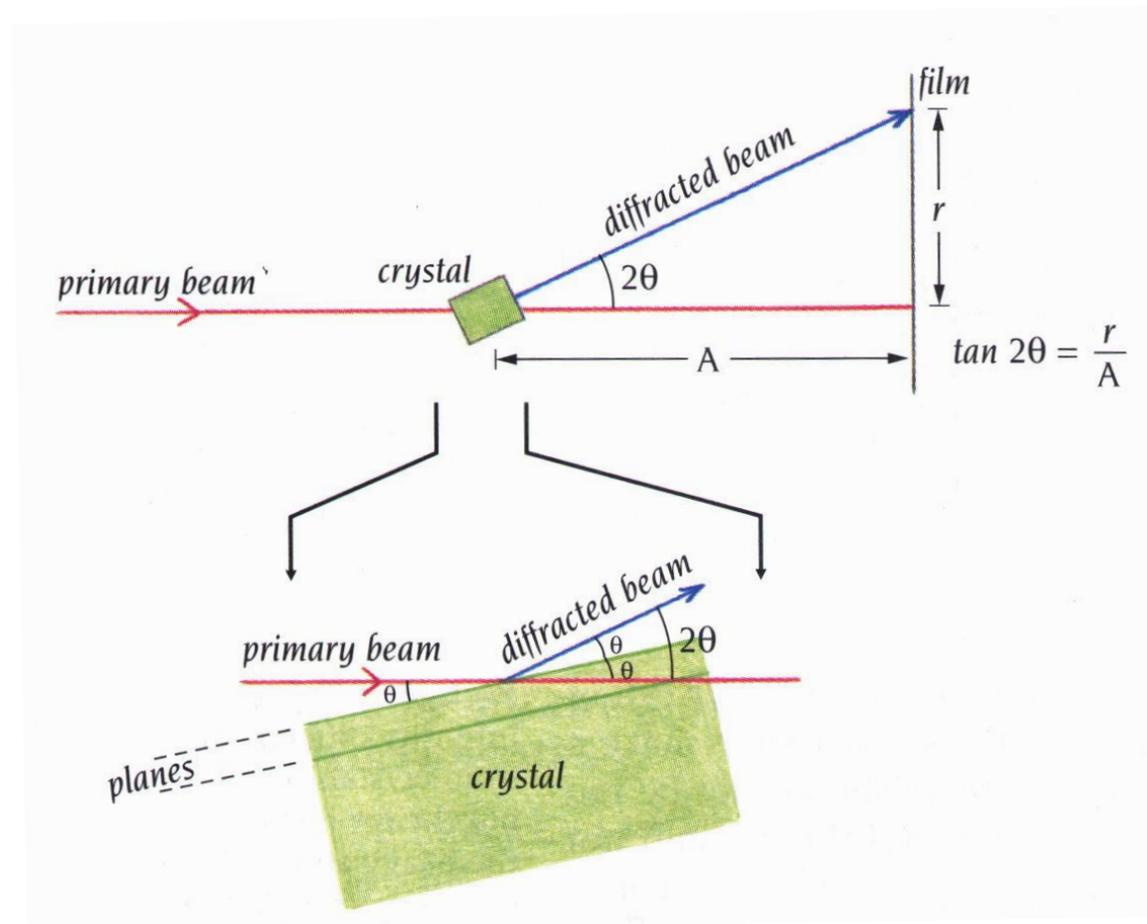


d - distância entre dois planos
 λ - comprimento de onda
 θ - ângulo de incidência

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

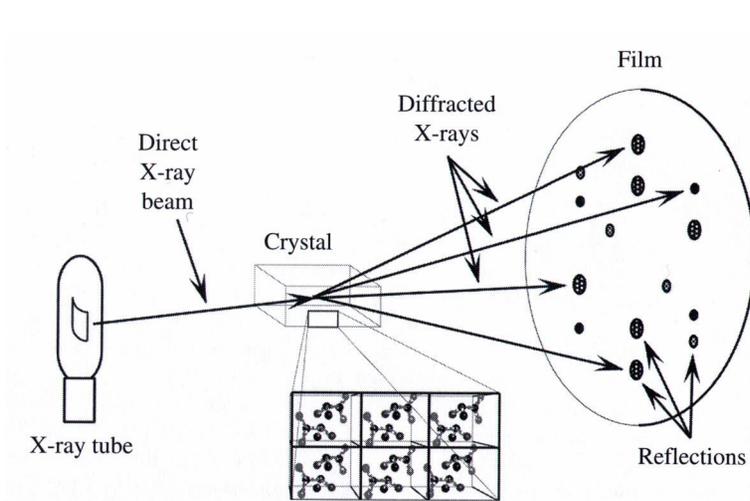
Cálculo da distância entre planos

- 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.

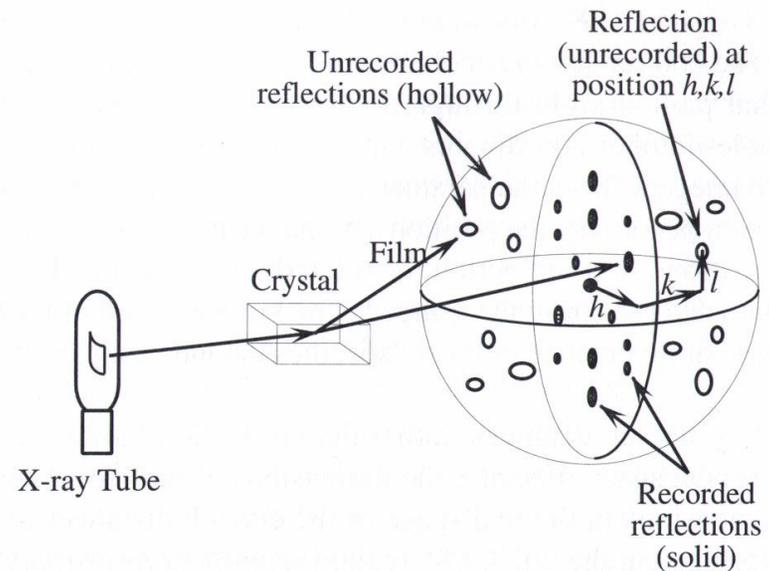


Espaço real *versus* espaço recíproco

- 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*.

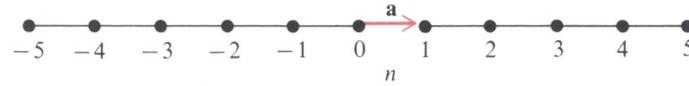


Espaço real

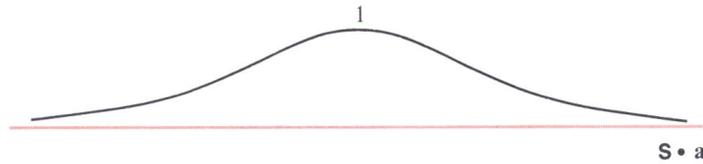


Espaço recíproco

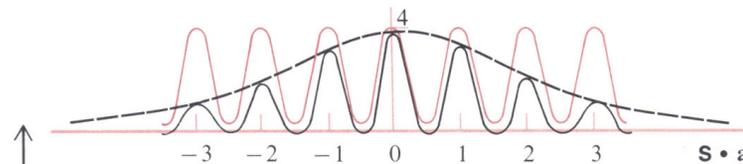
Espalhamento e periodicidade



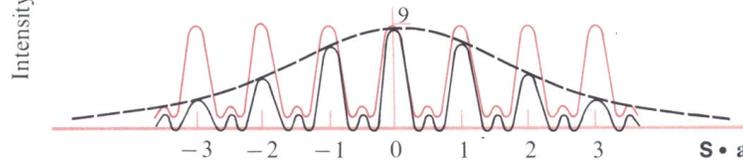
(a)



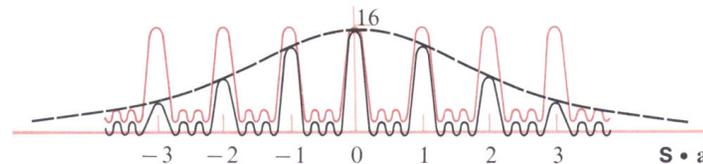
1 átomo na origem



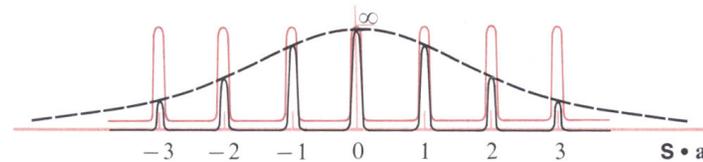
2 átomos em $-a/2$ e $+a/2$



3 átomos em $-a$, 0 e $+a$



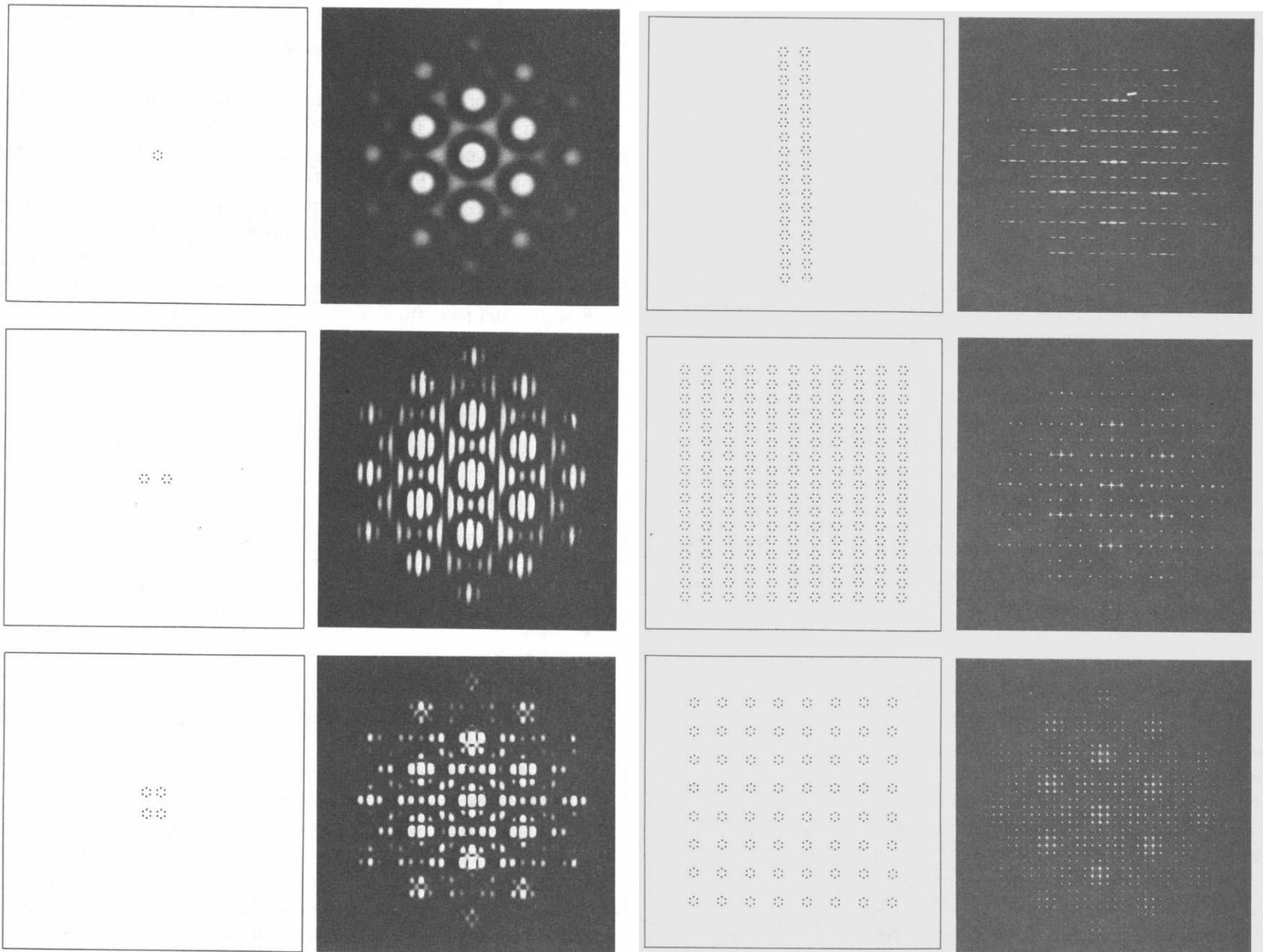
4 átomos em $-(3/2)a$, $-(1/2)a$, $(1/2)a$, $(3/2)a$



Número infinito de átomos

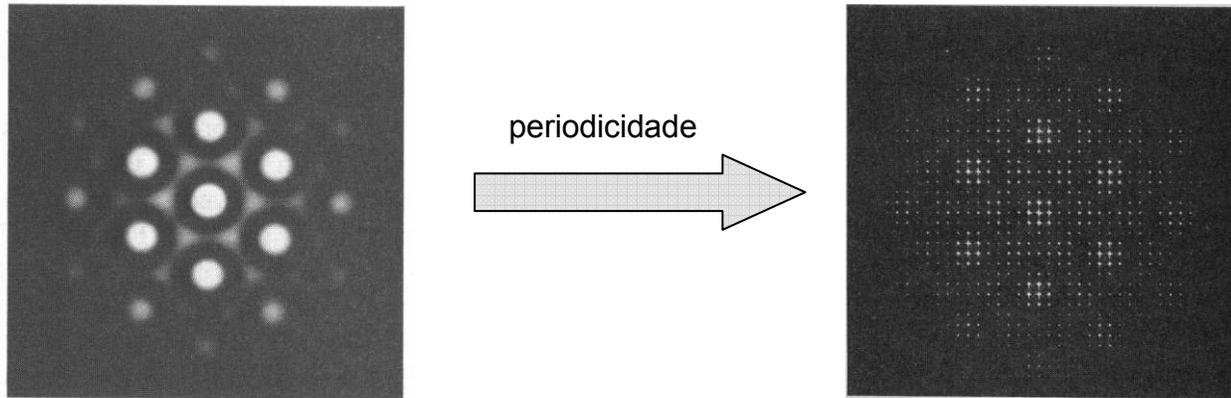
(b)

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}

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

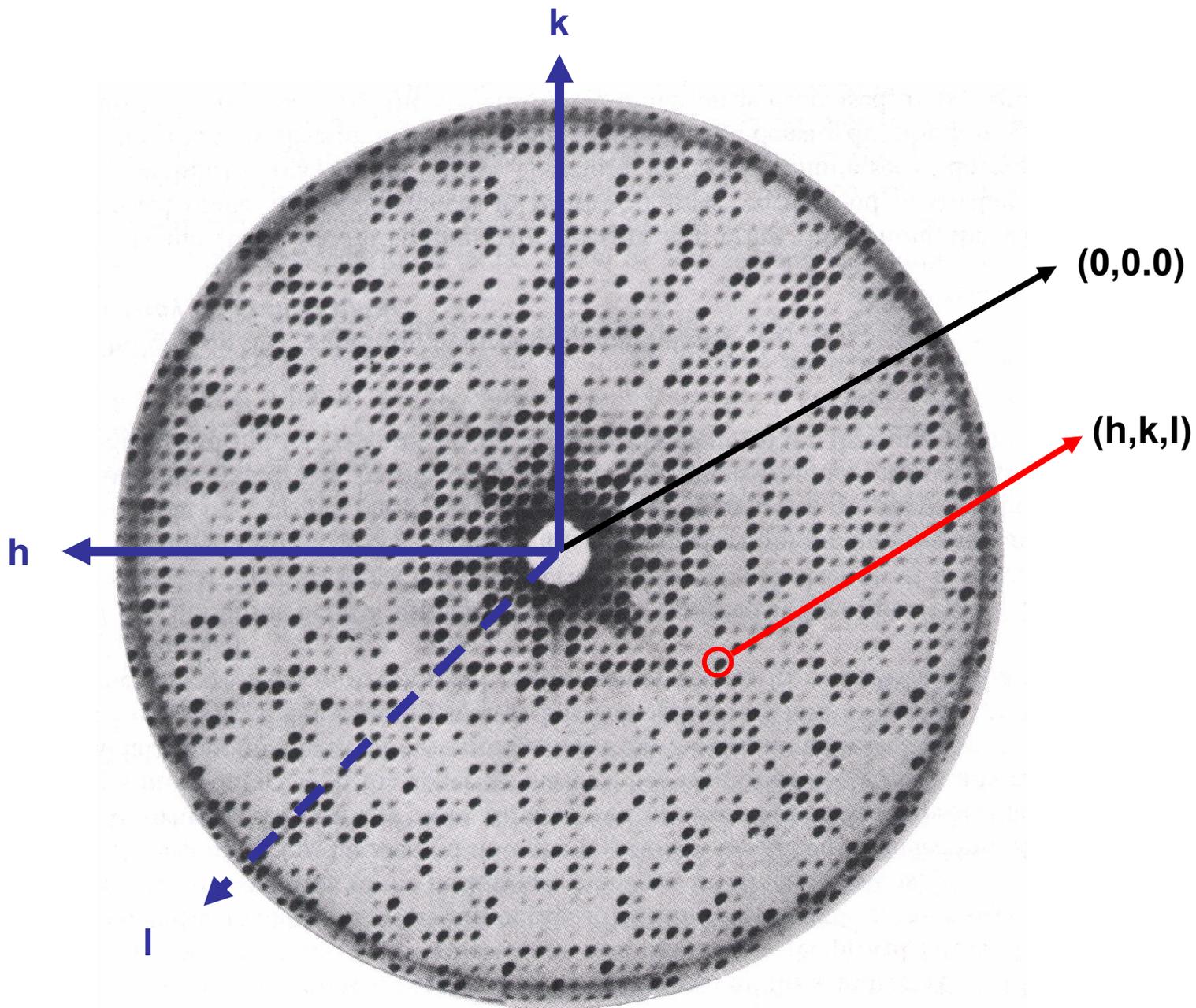
- A densidade electrónica $\rho(x,y,z)$ pode ser calculada a partir de

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

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:

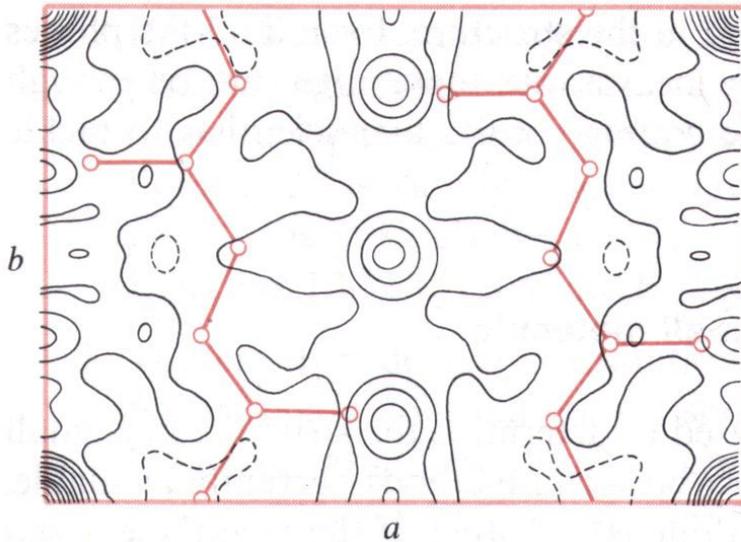
$$I \propto |F_{hkl}|^2$$



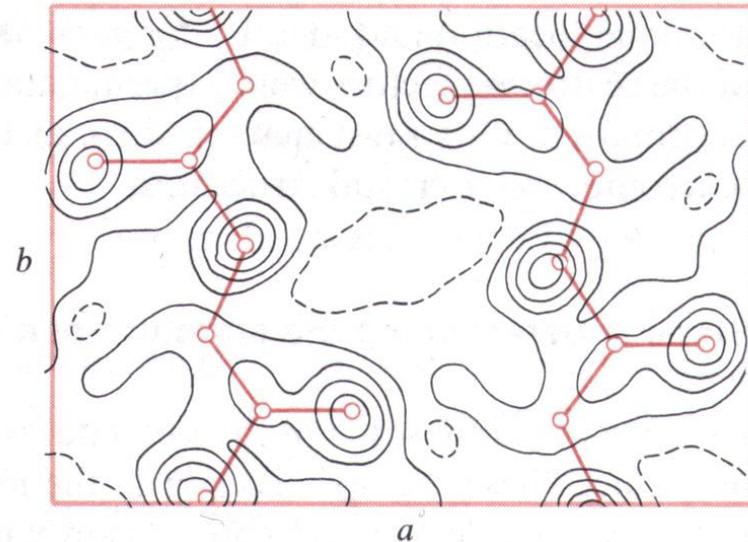
Problema das fases

- 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



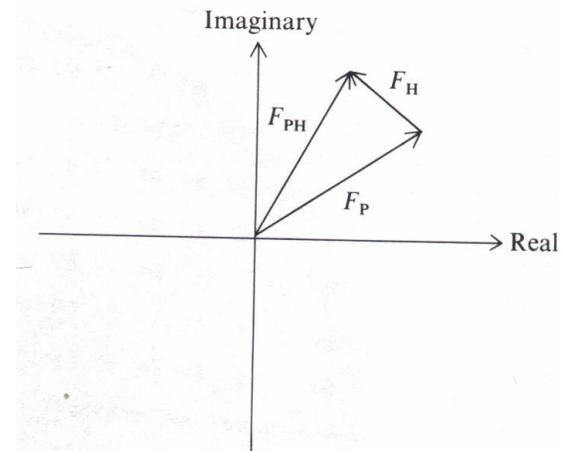
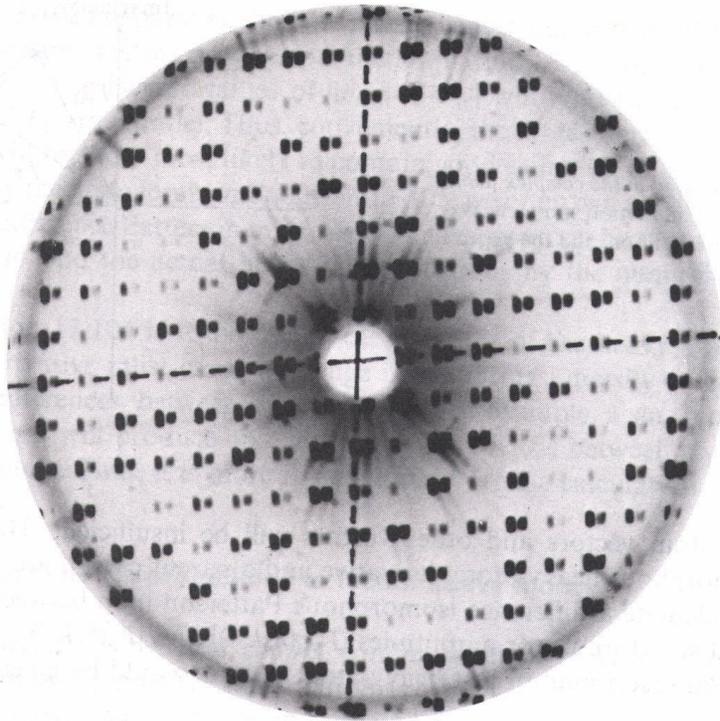
Síntese de Fourier usando apenas as intensidades



Síntese de Fourier usando apenas as fases

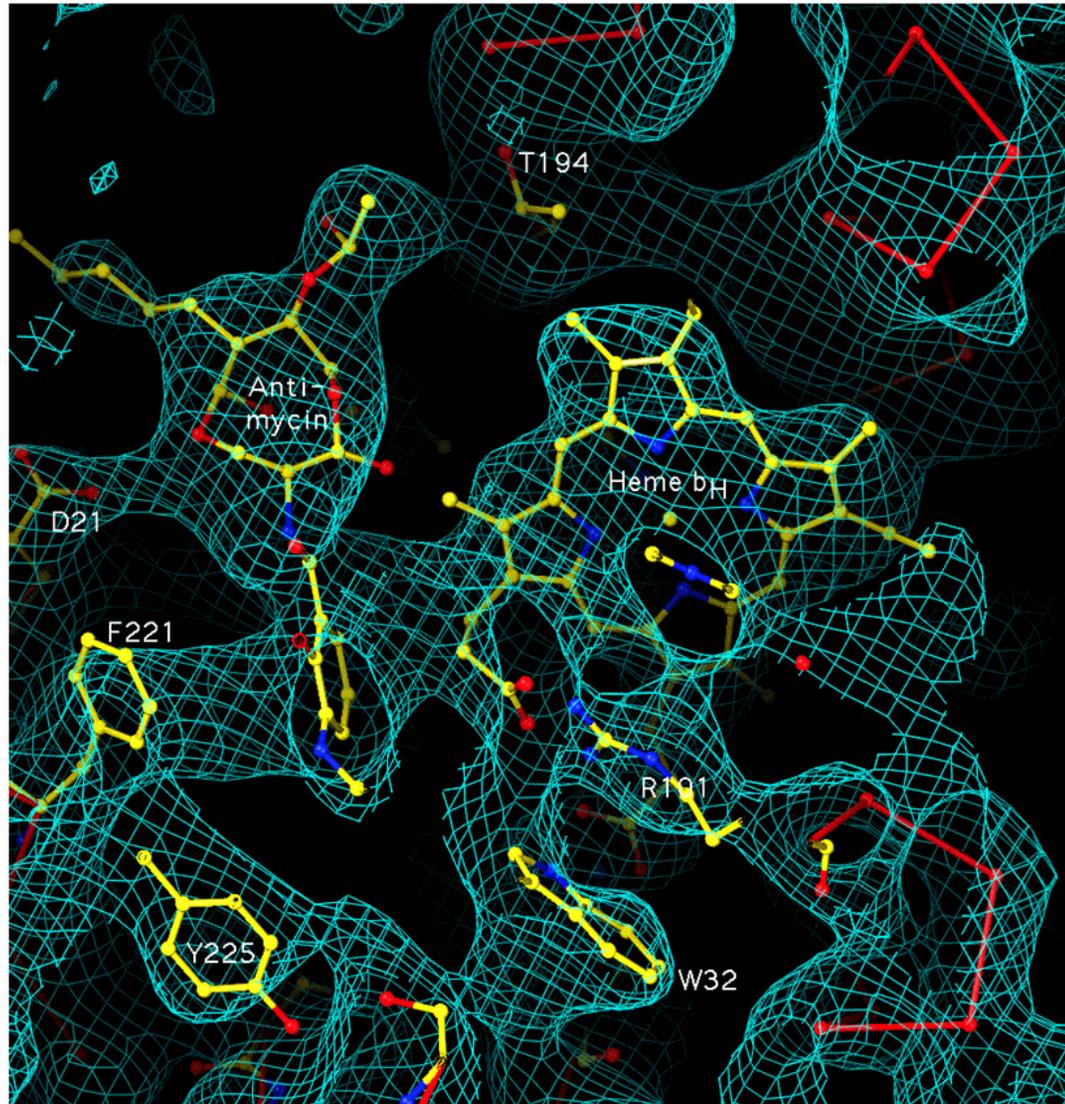
$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Substituição isomórfica

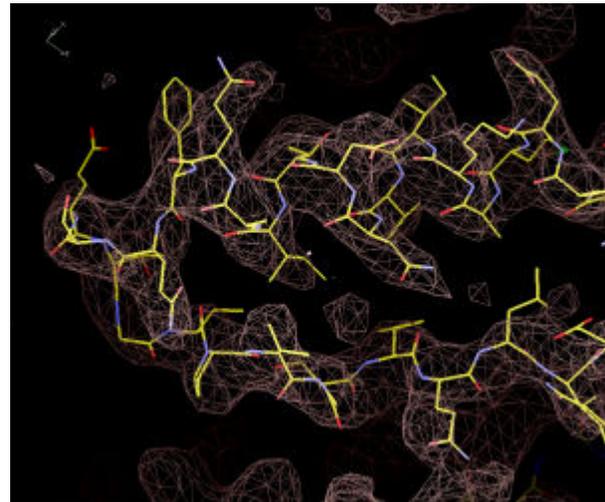
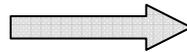
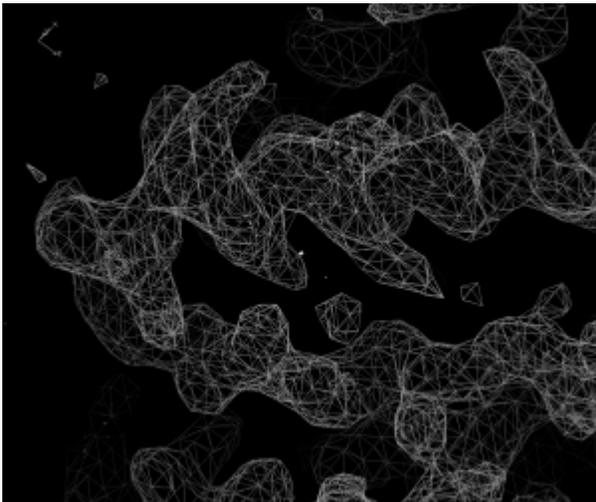


- Um **único** átomo de mercúrio é capaz de produzir uma diferença média de 30% entre os factores de estrutura da molécula original (F_P) e a molécula substituída (F_{PH}) para uma proteína de 40000 d !

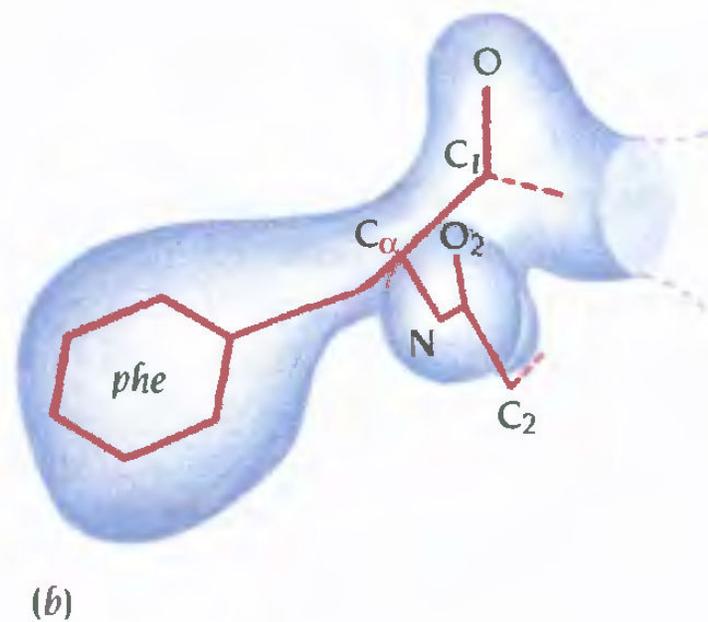
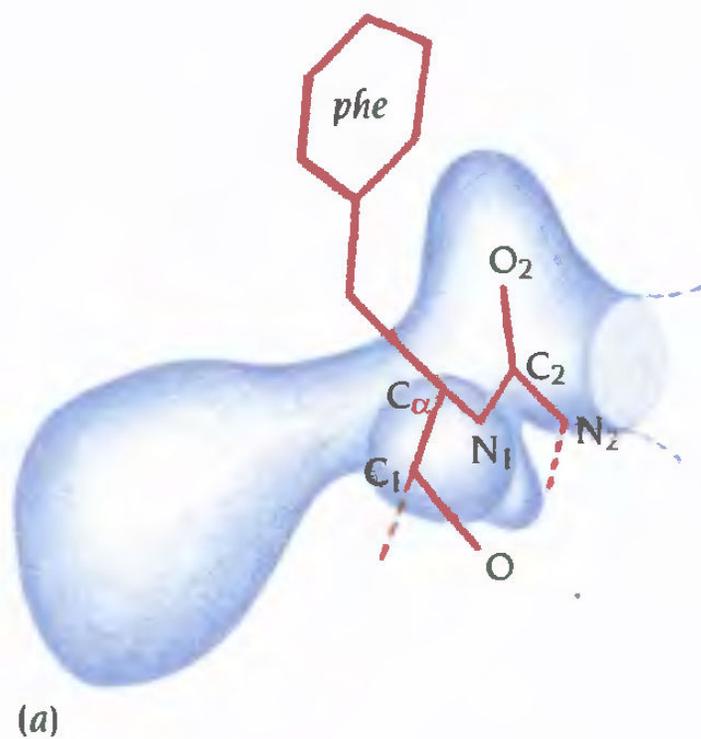
Densidade eletrônica



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

$$R = \frac{\sum |\mathbf{F}_{obs}| - |\mathbf{F}_{calc}|}{\sum |\mathbf{F}_{obs}|} \quad \text{R-factor}$$

Efeito da resolução

