

Janaína Conrado Lyra Fonseca

**Análise Cristalográfica Preliminar das Estruturas
das Hemoglobinas do Peixe Matrinxã
(Brycon cephalus)**



1910001048



Janaína Conrado Lyra Fonseca

Análise Cristalográfica Preliminar das Estruturas das Hemoglobinas do Peixe Matrinxã (*Brycon cephalus*)

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez

Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

São José do Rio Preto



T. 3048/02

A minha mãe pelo
apoio incondicional
em todos os dias
da minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior, pela orientação dedicada, pelo pronto apoio e, sobretudo pela paciência em todos os momentos, tornando possível a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, pela co-orientação, pela colaboração dada através de crítica e sugestões no desenvolvimento deste e no trabalho Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr João Ruggiero Neto, coordenador do Curso, pela amizade e pelo incentivo durante minha permanência no Departamento de Física.

Ao Prof. Dr.Johnny Rizzieri Olivieri, pela colaboração crítica no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr José Roberto Ruggiero, pelo apoio durante vários momentos difíceis, pela amizade e sobretudo por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Prof. Dr Marcelo Andrés Fossey pela amizade, pela acolhida imediata e pelo carinho.

Aos demais professores do departamento de Física pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos colegas do Grupo de Biocristalografia Carla, Fernanda, Henrique, João Carlos, Nelson, Patrícia, Plínio, Renato, Renato, Valmir e William, pela ajuda em vários momentos e pela amizade em todos.

Aos colegas de sala Carla e Valmir, pela ajuda em incontáveis momentos, pela paciência e pela amizade.

Ao Plínio, pela confiança e amizade, pela grande ajuda nos imensuráveis momentos (sem a qual teria sido muito mais difícil) e pela paciência mesmo nas perguntas mais descabidas.

Aos amigos Gláucia e Ocimar, pela amizade e pela acolhida desde o primeiro momento em que aqui cheguei.

Aos amigos, Ricardo Hildebrand, Renato, Flávio, Fátima, Norma, Osmar pelos bons momentos que a convivência diária nos proporciona, pela amizade e pelo carinho.

Às amigas Carla, Gláucia, Luciana e Sabrina pela amizade, pelo carinho, pelo apoio, pela paciência nos momentos de lamúria, enfim por serem AMIGAS.

Aos amigos "distantes" Ceci, Fábio, Hamilton, Neide e Rubens, pela ajuda nos mais variados momentos e pela amizade.

Aos demais colegas Alexandre, Ângelo, Bernadete, Charles, Dulcinéa, Fausto, Giovani, Leandra, Lessandra, Luiz, Luis Paulo, Márcia, Milton Raquel, Ricardo, Selma, Sérgio, Shirley pela convivência harmoniosa.

Ao Gerson por ter estado ao meu lado durante esses últimos dez anos, pelos motivos mais variados e mais fortes, que para descrevê-los faltam palavras.

À minha mãe que sempre me incentivou, me mostrando que muito mais difícil que mostrar o caminho certo, é deixar cada um escolher o seu próprio caminho.

Aos meus irmãos por só terem me dado orgulho em ser irmã deles.

Índice Geral

Aos meus tios Raul e Sonia, pelo apoio e confiança, que eu sempre recebi deles, sem os quais eu certamente não teria chegado até aqui.

À minha família por ter me dado toda base para encontrar meu lugar onde quer que eu vá.

A todos que de alguma forma participaram da formação deste trabalho ou desta pessoa.

A Deus, sem o qual nada mais seria possível.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

1.1. Propósito do trabalho	1
1.2. A origem do trabalho e o trabalho	2
1.3. O trabalho e o trabalho	3
1.4. O trabalho e o trabalho	4
1.5. O trabalho e o trabalho	5
1.6. O trabalho e o trabalho	6
1.7. O trabalho e o trabalho	7
1.8. O trabalho e o trabalho	8
1.9. O trabalho e o trabalho	9
1.10. O trabalho e o trabalho	10
1.11. O trabalho e o trabalho	11
1.12. O trabalho e o trabalho	12
1.13. O trabalho e o trabalho	13
1.14. O trabalho e o trabalho	14
1.15. O trabalho e o trabalho	15
1.16. O trabalho e o trabalho	16
1.17. O trabalho e o trabalho	17
1.18. O trabalho e o trabalho	18
1.19. O trabalho e o trabalho	19
1.20. O trabalho e o trabalho	20
1.21. O trabalho e o trabalho	21
1.22. O trabalho e o trabalho	22
1.23. O trabalho e o trabalho	23
1.24. O trabalho e o trabalho	24
1.25. O trabalho e o trabalho	25
1.26. O trabalho e o trabalho	26
1.27. O trabalho e o trabalho	27
1.28. O trabalho e o trabalho	28
1.29. O trabalho e o trabalho	29
1.30. O trabalho e o trabalho	30
1.31. O trabalho e o trabalho	31
1.32. O trabalho e o trabalho	32
1.33. O trabalho e o trabalho	33
1.34. O trabalho e o trabalho	34
1.35. O trabalho e o trabalho	35
1.36. O trabalho e o trabalho	36
1.37. O trabalho e o trabalho	37
1.38. O trabalho e o trabalho	38
1.39. O trabalho e o trabalho	39
1.40. O trabalho e o trabalho	40
1.41. O trabalho e o trabalho	41
1.42. O trabalho e o trabalho	42
1.43. O trabalho e o trabalho	43
1.44. O trabalho e o trabalho	44
1.45. O trabalho e o trabalho	45
1.46. O trabalho e o trabalho	46
1.47. O trabalho e o trabalho	47
1.48. O trabalho e o trabalho	48
1.49. O trabalho e o trabalho	49
1.50. O trabalho e o trabalho	50
1.51. O trabalho e o trabalho	51
1.52. O trabalho e o trabalho	52
1.53. O trabalho e o trabalho	53
1.54. O trabalho e o trabalho	54
1.55. O trabalho e o trabalho	55
1.56. O trabalho e o trabalho	56
1.57. O trabalho e o trabalho	57
1.58. O trabalho e o trabalho	58
1.59. O trabalho e o trabalho	59
1.60. O trabalho e o trabalho	60
1.61. O trabalho e o trabalho	61
1.62. O trabalho e o trabalho	62
1.63. O trabalho e o trabalho	63
1.64. O trabalho e o trabalho	64
1.65. O trabalho e o trabalho	65
1.66. O trabalho e o trabalho	66
1.67. O trabalho e o trabalho	67
1.68. O trabalho e o trabalho	68
1.69. O trabalho e o trabalho	69
1.70. O trabalho e o trabalho	70
1.71. O trabalho e o trabalho	71
1.72. O trabalho e o trabalho	72
1.73. O trabalho e o trabalho	73
1.74. O trabalho e o trabalho	74
1.75. O trabalho e o trabalho	75
1.76. O trabalho e o trabalho	76
1.77. O trabalho e o trabalho	77
1.78. O trabalho e o trabalho	78
1.79. O trabalho e o trabalho	79
1.80. O trabalho e o trabalho	80
1.81. O trabalho e o trabalho	81
1.82. O trabalho e o trabalho	82
1.83. O trabalho e o trabalho	83
1.84. O trabalho e o trabalho	84
1.85. O trabalho e o trabalho	85
1.86. O trabalho e o trabalho	86
1.87. O trabalho e o trabalho	87
1.88. O trabalho e o trabalho	88
1.89. O trabalho e o trabalho	89
1.90. O trabalho e o trabalho	90
1.91. O trabalho e o trabalho	91
1.92. O trabalho e o trabalho	92
1.93. O trabalho e o trabalho	93
1.94. O trabalho e o trabalho	94
1.95. O trabalho e o trabalho	95
1.96. O trabalho e o trabalho	96
1.97. O trabalho e o trabalho	97
1.98. O trabalho e o trabalho	98
1.99. O trabalho e o trabalho	99
1.100. O trabalho e o trabalho	100

Índice Geral

Índice Geral	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas.....	v
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Objetivo	3
Capítulo 1 Introdução.....	5
1.1. Introdução ao estudo das hemoglobinas.....	6
1.1.1. O grupo heme	9
1.1.2. A ligação do oxigênio à hemoglobina	12
1.1.3. Mecanismo Alostérico	17
1.1.4. Efeito Bohr.....	18
1.2. Hemoglobinas de peixes	22
1.3. Introdução ao Estudo Cristalográfico.....	25
1.3.1. Cristalografia de Proteínas.....	27
Capítulo 2 Materiais e Métodos	29
2.1. Obtenção dos animais e Coleta do Sangue.....	30
2.2. Determinação da Estrutura Primária Parcial da Fração-I.....	31
2.3. Cristalização	32
2.4. Coleta de Dados	33
2.5. Substituição Molecular	33
2.6. Refinamento.....	37



Capítulo 3. Resultados e Discussão	41
3.1. Purificação da Proteína.....	42
3.2. Resultados e Discussão da fração-II.....	42
3.2.1. Cristalização da fração II.....	42
3.2.2. Coleta de Dados da fração II	43
3.2.3. Substituição Molecular da fração II	45
3.2.4. Refinamento da fração-I.....	47
3.3. Refinamento e discussão da estrutura bchb-I.....	50
3.3.1.. Alinhamentos.....	50
3.3.1.1. Determinação de resíduos de aminoácidos da fração-I.....	50
3.3.1.2. Refinamento da estrutura Bchb-.....	50
3.3.1.3. Análise e discussão da estrutura parcial..	53
3.4. Multiplicidade Funcional.....	62
Capítulo 4. Conclusão	64
4. Conclusão.....	65
Referências Bibliográficas:.....	66
Apêndices.....	71
Apêndice A. Cristalização de MAcromoléculas Biológicas.....	72
A.1. Introdução	72
A.2. Princípios gerais para cristalização de macromoléculas biológicas.....	73
A.2.1. Pureza da macromolécula biológica.....	73
A.2.2. Estabilização e armazenagem	75
A.2.3. Nucleação, crescimento e cessação de crescimento.....	76



A.3. Conceitos sobre solubilidade.....	76
A.4. Salting-in e Salting-out.....	78
A.5. Diagramas de fase de macromoléculas biológicas.....	81
A.6. Mecanismos de crescimento de cristais	83
A.6.1. Nucleação bidimensional.....	84
A.6.2. Fatores que influenciam o crescimento de cristais.....	84
A.7. Técnicas de cristalização de macromoléculas biológicas.....	85
A.7.1. Cristalização em Batch.....	85
A.7.2. Cristalização por Difusão de Vapor.....	85
A.8. O Método da matriz esparsa (Fatorial).....	86
A.9. Aplicação do método da matriz esparsa	88
A.10. Melhorias aplicadas às condições de Cristalização	89
A.11. Armazenamento e manuseio de cristais.....	90
A.12. Montagem dos cristais para a coleta de dados	91
Apêndice B Difração de Raios X.....	94
B.1. Espalhamento de raios x por um átomo.....	94
B.1.1. Espalhamento Compton.....	94
B.1.2. Espalhamento Thomson	94
B.2. Fator de espalhamento atômico.....	95
B.3. Fator De Temperatura B.....	95
B.4. Espalhamento de raios x por uma molécula.....	96
B.4.1. Espalhamento de raios x por um cristal	96
B.5. A densidade eletrônica.....	98



B.5.1. Função de Patterson	98
Apêndice C. Substituição Molecular.....	100
C.1. Introdução	100
C.1.1. A função rotação	100
C.1.2. A função translação.....	101
Apêndice D. Refinamento.....	103
D.1. Refinamento de Corpo Rígido.....	105
D.2. Refinamento Posicional.....	105
D.3. Refinamento por Dinâmica Molecular ou Simulated Annealing.....	106
D.4. Refinamento do Fator B.....	107



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de estrutura tridimensional apresentada pela mioglobina.....	7
Figura 2. Enovelamento apresentado por uma cadeia de hemoglobina.....	8
Figura 3. O grupo heme do Citocromo C.....	9
Figura 4. Grupo Heme: em laranja o átomo de ferro, em azul os nitrogênios, em cinza os carbonos e em vermelho os oxigênios.....	10
Figura 5. Grupo heme desoxigenado (côncavo) e oxigenado (planar).....	11
Figura 6. Representação das interações na interface $\alpha 1\beta 2$ e $\alpha 2\beta 1$	13
Figura 7. Representação esquemática dos estados R e T, a linha contínua representa o estado tenso ou desoxigenado, a linha pontilhada representa o estado relaxado ou desoxigenado.....	13
Figura 8. Interações que estabilizam a Hb na forma desoxigenada.....	14
Figura 9. Curva de Saturação da Mioglobina e da Hemoglobina.....	15
Figura 10. Resíduos envolvidos nas interações que respondem pelas mudanças conformacionais. (Figura escaneada do livro Garret & Grisham).....	21
Figura 11. Afinidade da Mioglobina e da Hemoglobina em função do pH.....	22
Figura 12. Diagrama do protocolo de Substituição Molecular seguindo o programa AMoRe, do pacote CCP4.....	36
Figura 13. Diagrama simplificado das etapas do Refinamento.....	39
Figura 14. Fotografia do cristal da proteína após melhorias.....	42
Figura 15a. e 15b. Mapa de densidade eletrônica do Grupo Heme da Bchb-II.....	49
Figura 16. Gráfico de Ramachandran da estrutura final do Bchb-I, calculado pelo PROCHECK.....	55
Figura 17a e 17b. Gráfico de Ramachandran das estruturas usadas no trabalho, calculado pelo PROCHECK.....	56 e 57
Figura 18. Mapa de densidade eletrônica do Grupo Heme da Bchb-I.....	58
Figura 19. Comparação entre as estruturas secundárias da Hb humana e do Matrinxã.....	59



Figura 20. RMS. Gráfico das sobreposições da cadeia principal.....	60
Figura 21. Progresso do fator R durante o processo de refinamento.....	61
Figura 22. Potencial eletrostático calculado pelo GRASP.....	62
Figura 23. Cristal crescido como massa policristalina.....	74
Figura 24. Representação de Macromolécula sem íons dissolvidos (1) e com íons dissolvidos(2), mostrando o efeito dos íons na sua solubilidade.....	79
Figura 25. Contribuição dos efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos sobre a solubilidade S1 normalizada em relação à solubilidade da água pura S0.....	81
Figura 26. Descrição esquemática de um diagrama bidimensional da solubilidade de uma macromolécula biológica.....	83
Figura 27. Representação dos processos de Difusão de Vapor.....	86
Figura 28. Seqüência de eventos para montagem de uma gota de cristalização	88

Índice de Tabelas

Tabela 1. Ângulos de Euler e coordenadas fracionárias das estruturas usadas como modelo após a Substituição Molecular.....	40
Tabela 2. Resumo dos dados de difração de raios X e substituição molecular.....	44
Tabela 3. Estatística detalhada dos dados de difração de raios X, coletados para o cristal de bchb-I.....	45
Tabela 4. Hemoglobinas usadas como modelos de pesquisa na Substituição Molecular.....	46
Tabela 5. Ângulos de rotação, distâncias fracionárias de translação, Coeficiente de Correlação e Fator R, nas diferentes faixas de resolução.....	46
Tabela 6. Ângulos de rotação, distâncias fracionárias de translação, Coeficiente de Correlação e Fator R obtidos para os grupos espaciais apresentados pelo sistema monoclinico na faixa de resolução de 10-4,5Å.....	46
Tabela 7. Resumo dos Dados de Substituição Molecular.....	47
Tabela 8. Valores de Rfator e Rlivre obtidos durante o processo de refinamento.....	48
Tabela 9. Distâncias entre Ferro-Histidina nas estruturas das hemoglobinas do Bchb-II e a Hhb. As histidinas 58 e 63 são as distais, enquanto que as 87 e 92 são as proximais, nas cadeias alfa e beta respectivamente.....	48
Tabela 10. Substituições possíveis na cadeia alfa.....	52
Tabela 11. Resíduos que apresentaram quebra na cadeia lateral.....	52
Tabela.12 Dados experimentais que caracterizam a Bchb-I como hemoglobina catódica.....	63
Tabela 13. Dados experimentais que caracterizam a Bchb-II como hemoglobina anódica.....	63
Tabela.14. Agentes Precipitantes.....	88
Tabela 15a. e 15b Soluções de Cristalização	93



Lista de Abreviações

Hb	Hemoglobina.
Oxi-Hb	Hemoglobina oxigenada
Desoxi-Hb	Hemoglobina desoxigenada.
Bchb-I	Fração I da hemoglobina do <i>Brycon cephalus</i> .
Bchb-II	Fração II da hemoglobina do <i>Brycon cephalus</i> .
pO ₂	Pressão Parcial de Oxigênio.
pCO ₂	Pressão Parcial de Dióxido de carbono.
p50	Pressão Parcial para saturar 50% dos sítios de ligação.
PDB	Protein Data Bank
CCP4	Collaborative Computational Project nº 4
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
AMoRe	Automatic Molecular Replacement
PROFIT	Protein Least Square Fitting



Lista de Programas Utilizados

- AMoRe** Automatic Molecular Replacement, integrante do pacote de programas que compõem o CCP4, pode ser encontrado
www.ccp4.sc.uk.
- DENZO** Processamento de dados de difração de raios X.
<http://www.hkl-xray.com>
- GRASP** Utilizado para a visualização da superfície e do potencial eletrostático e da macromolécula biológica.
<http://www.tincan.bioc.columbia.edu/lab.grasp>
- PROCHECK** Analisa a estrutura secundária, plotando os ângulos ϕ contra ψ do modelo em estudo, além de outros parâmetros estereoquímicos.
<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>
- PROFIT** Faz sobreposições de macromoléculas biológicas.
<http://www.coli.uni-sb.de/~erbach/formal/profit/profit.html>
- X-PLOR** Pacote de programas usado em Cristalografia e RMN.
www.xplor.csb.yale.edu/xplor-info
- Xtalview** Para visualização gráfica.
<http://www.sdsc.edu/CCMS/Packages/XTALVIEW/xtalview.html>
-



3.2.2. Coleta de Dados da fração -II

Um total de 135 imagens foi coletado e os dados de difração obtidos a 3.0Å de resolução. Após esses dados terem sido processados mostraram pertencer ao grupo monoclinico primitivo do tipo P2₁, com parâmetros de cela iguais a $a = 64,4(7)\text{Å}$; $b = 89,0(7)\text{Å}$; $c = 106,1(3)\text{Å}$; $\alpha = \gamma = 90^\circ$ e $\beta = 102,8(3)^\circ$. Os dados revelaram ainda existirem dois tetrâmeros por unidade assimétrica. O volume calculado para a cela unitária foi de $5,93 \times 10^5 \text{Å}^3$, compatível com dois tetrâmeros por unidade assimétrica, o volume de Mathews do cristal calculado como descrito a seguir resultou $2,34 \text{Å}^3 \text{Da}^{-1}$, foi considerado $0,74 \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ como volume específico e uma densidade de $1,19 \text{g.cm}^{-3}$ da proteína, resultando um volume de solvente de 47% cujos cálculos também são apresentados abaixo, esses dados podem ser vistos na tabela 2.

Informações conhecidas

Parâmetros de cela: $a = 64,4\text{Å}$, $b = 89,0\text{Å}$ e $c = 106,1\text{Å}$.

Ângulos $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 102,8^\circ$

Z = Número de dímeros na cela unitária.

Massa Molar $(MM)_{\text{Hb}} = 65.000 \text{Da}$.

Número de dímeros por unidade assimétrica = 4.

Cálculos Realizados

Volume da cela unitária (V_{cela}) = $a \times b \times c = 64,4 \times 89,0 \times 106,1 = 608.122,76 \text{Å}^3$

$$\text{Volume de Mathews } (V_M) = \frac{V_{\text{cela}}}{Z \times MM} = \frac{608.122,76}{Z \times 65000} = \frac{9.356}{Z}$$

Testando os possíveis valores de Z

Para $Z = 2 \rightarrow V_M = 4,68 \text{Å}^3/\text{Da}$

Para $Z = 4 \rightarrow V_M = 2,34 \text{Å}^3/\text{Da}$

Resultados

Resumo

Hemoglobinas constituem um conjunto de proteínas com interessantes propriedades estruturais e funcionais, especialmente quando as atenções são direcionadas para dois grandes grupos de animais: répteis e peixes.

É verificado que oscilações no meio podem levar os organismos a desenvolver diferentes tipos de estratégias adaptativas, por exemplo as isoformas de hemoglobina. Essas estratégias, porém, não estão muito bem esclarecidas não existe nenhuma justificativa biológica, suficientemente clara, que estabeleça uma relação entre estabilidade do meio e o número de frações de hemoglobinas.

Os cristais da fração-II da hemoglobina do peixe *Brycon cephalus* (Matrinxã) mostraram pertencer ao grupo espacial $P2_1$, com parâmetros de cela de $a=64,406\text{\AA}$, $b=88,966\text{\AA}$, $c=106,121\text{\AA}$. O refinamento cristalográfico resultou num valor para R_{fator} correspondente a 26,9% e R_{livre} de 34,4%.

Foi feito ainda o refinamento parcial da fração I da proteína em estudo, resultando num modelo que contém 150 moléculas de água e valores de R_{fator} de 25,7% e R_{livre} de 22,9%.

Fica como proposta para trabalho futuro o término da determinação da estrutura, tão logo sejam obtidas as seqüências primárias das frações I e II da hemoglobina do peixe *Brycon cephalus*.



Abstract

Hemoglobins constitute a set of proteins with interesting structural and functional properties, especially when we focus on two large animal groups: reptiles and fishes.

Oscillations in environment may lead the organism to develop different kinds of adaptive strategies. In spite of the suggestions that may represent an adaptation to a variable environment their biological significance is not clear. There is no clear relationship between environment stability and the number of hemoglobin fractions.

The crystals of fraction-II of hemoglobin of fish *Brycon cephalus* belong of spatial group $P2_1$, with the parameters cell of $a=64,406\text{\AA}$, $b=88,966\text{\AA}$, $c=106,121\text{\AA}$. Crystallographic pre-refinement led to an R_{factor} and R_{free} of 26,9% and 34,4%.

It was made partial crystallographic refinement of fraction-I of hemoprotein, which led to an R_{factor} of 25,7% and R_{free} 22,9%. The partial model contains 150 water molecules.

Future work on the structure will be undertaken as soon as the primary sequence becomes available.

Abstract

Objetivo:

Os químicos sempre tiveram o desejo de serem capazes de visualizar as moléculas e átomos de um determinado sistema, o mecanismo de uma reação orgânica ou mesmo as interações que uma substância pode sofrer em meio aquoso. Em se tratando de proteínas as alternativas para fazer com que esses anseios fossem alcançados são o emprego de três ferramentas importantes: sequenciamento dos resíduos de aminoácidos, cristalografia de raios X. e ressonância magnética nuclear. Estas técnicas fornecem importantes dados para o estudo da relação entre a estrutura molecular e as características funcionais das hemoglobinas.

Algumas espécies de animais como mamíferos, répteis e peixes apresentam iso-hemoglobinas. Essas proteínas têm sido objeto de estudo de muitos grupos de cientistas que buscam uma explicação para a sua existência, ou algo que justifique a presença de tais proteínas em maior número em alguns organismos que em outros da mesma espécie. Existem aqueles que defendem a teoria da mutação neutra e outros que justificam a presença de variadas frações de proteínas pelo processo adaptativo.

Qualquer que seja a alternativa "correta", este trabalho visa aumentar os dados estruturais, buscando auxiliar no esclarecimento do comportamento bioquímico, fisiológico e no desenvolvimento evolucionário das hemoglobinas.

Aqui são apresentados a cristalização, substituição molecular e refinamento parcial da fração II e o refinamento parcial da fração I da hemoglobina do peixe Matrinxã



(*Brycon cephalus*), elevando o número de estruturas parcialmente resolvidas e lançando as bases que permitem a elucidação dessas estruturas num futuro breve.

Objetivo



CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO AO ESTUDO DAS HEMOGLOBINAS



1.1 Introdução ao estudo das hemoglobinas (Lehninger, 1995; Stryer, 1996; Garret, 1995; Voet 1990)

O metabolismo das células aeróbicas depende do recebimento contínuo de oxigênio, usado na oxidação de nutrientes. Por outro lado, o gás carbônico (CO_2) resultante desta oxidação deve ser removido constantemente. Nos organismos em que estas trocas não podem ser feitas, de maneira eficiente, diretamente com o meio por simples difusão, existem sistemas especializados incumbidos desta função. Este é o caso dos vertebrados, que desenvolveram dois mecanismos principais para suprir suas células com um fluxo contínuo e adequado de oxigênio (O_2). O primeiro é o uso de moléculas transportadoras de oxigênio para vencer as limitações impostas pela baixa solubilidade do O_2 na água. O segundo é um sistema circulatório que distribui ativamente O_2 às células.

Os carregadores de O_2 nos vertebrados são as proteínas *mioglobina* e *hemoglobina*. As mioglobinas são cadeias peptídicas formadas por uma globina, contendo cerca de 75% de conformação em α -hélice e tendo sua superfície formada basicamente por resíduos polares e seu interior por resíduos apolares, como é característico das proteínas globulares. Os seus oito segmentos helicoidais principais são designados por letras maiúsculas (A,B,C até H) e podem ser vistas regiões não helicoidais entre as hélices, que são denominadas com nome das duas hélices entre as quais estão inseridas - exemplo como CD entre as hélices C e D. Na maioria dos animais as mioglobinas funcionam como facilitador da difusão de O_2 dos capilares para as mitocôndrias. Enquanto que em animais como baleias, focas e golfinhos armazenam oxigênio nos músculos para serem utilizados durante um mergulho.



facilitador da difusão de O_2 dos capilares para as mitocôndrias. Enquanto que em animais como baleias, focas e golfinhos armazenam oxigênio nos músculos para serem utilizados durante um mergulho.

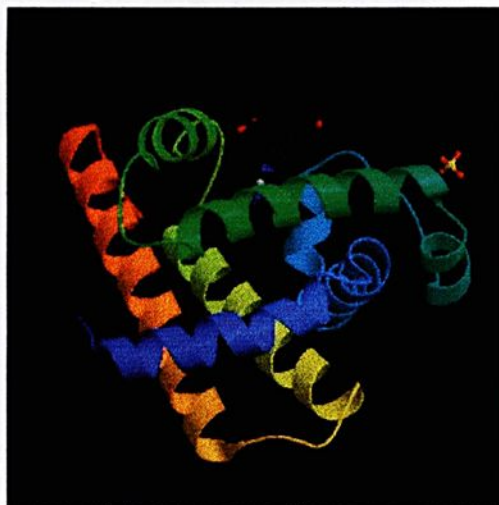


Figura 1. Modelo de estrutura tridimensional apresentada pela mioglobina, figura retirada do [site www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)

Já as hemoglobinas (Hb) existentes nas células vermelhas do sangue (eritrócitos) dos vertebrados, são formadas por quatro cadeias polipeptídicas, duas de um tipo e duas de outro e ainda pelo grupo prostético heme, composto de uma parte orgânica e um átomo de ferro. A associação das quatro cadeias formando uma estrutura quaternária nativa é estabelecida através de interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes salinas. Pode ser dito que a Hb apresenta-se sob a forma esférica, com um diâmetro de aproximadamente 55Å e as quatro cadeias formam um arranjo tetramérico. Em humanos adultos as hemoglobinas são duas cadeias alfa e duas beta. Além disso, os adultos também possuem uma outra pequena fração (cerca de 1%) de hemoglobina fetal, que possui duas cadeias alfa e duas cadeias delta substituindo as betas. As cadeias alfa possuem 141 resíduos de aminoácidos, enquanto que as cadeias betas possuem 146 resíduos. Como pode ser visto na figura 1 existe uma similaridade

Introdução

entre as moléculas de mioglobina e a cadeia beta da hemoglobina, quando comparamos suas estruturas secundárias e terciárias.

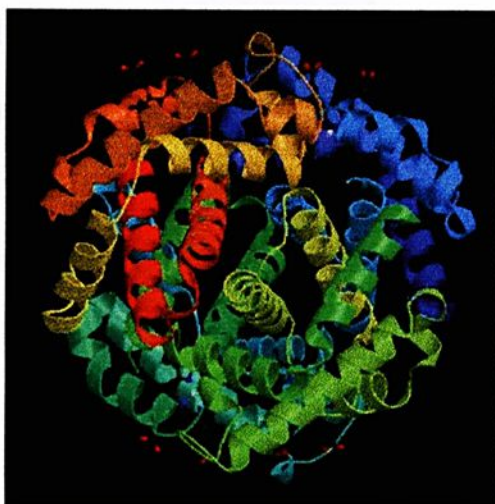


Figura 2. Enovelamento apresentado por uma molécula de hemoglobina, figura retirada do site www.rcsb.org/pdb/

As cadeias alfa e beta são formadas por estruturas secundárias compostas apenas por hélices e regiões de *random coil*, entre essas hélices e nas regiões terminais. Os oito principais segmentos helicoidais assim, como nas mioglobinas, são denominados por letras maiúsculas (A, B... H).

Para uma realização efetiva de sua função biológica a hemoglobina deve capturar o oxigênio, tão eficientemente quanto possível do ambiente, e liberá-lo nos tecidos periféricos, além de transportar 15% de todo o CO_2 envolvido na respiração e H^+ dos tecidos para os órgãos respiratórios, para posterior excreção.

Além de transportar oxigênio, a hemoglobina exerce ainda um efeito tamponante na corrente sangüínea, impedindo que os íons H^+ possam alterar o pH do sangue, com conseqüências danosas ao organismo. Este efeito soma-se ao efeito tamponante do sistema bicarbonato, principal tampão plasmático. Deste modo, embora haja grande produção de CO_2 pelos tecidos, a presença da

hemoglobina ajuda a restringir as variações de pH a apenas centésimos de unidades, mantendo o sangue e os tecidos em meio constante.

1.1.1. O grupo heme

Os grupamentos heme ou hemo podem ser encontrados em proteínas como o citocromo C, a mioglobina e a hemoglobina; na figura 3 pode ser visto o grupo heme de um citocromo C. Esses grupamentos heme são formados por porfirinas, compostas por um anel plano, e resultante da ligação de quatro núcleos pirrólicos, que podem apresentar diferentes radicais substituintes.

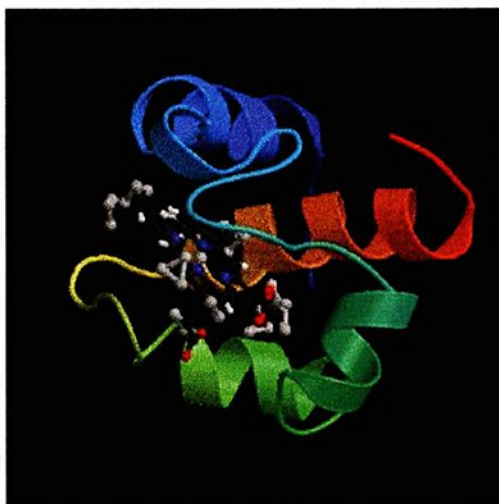


Figura 3. O grupo heme do citocromo C. figura retirada do site www.rcsb.org/pdb/

No tipo de porfirina encontrada na Hb (protoporfirina IX) estes substituintes são quatro radicais metil (1), dois vinil (2) e dois propionil (3), dispostos como na figura 4.

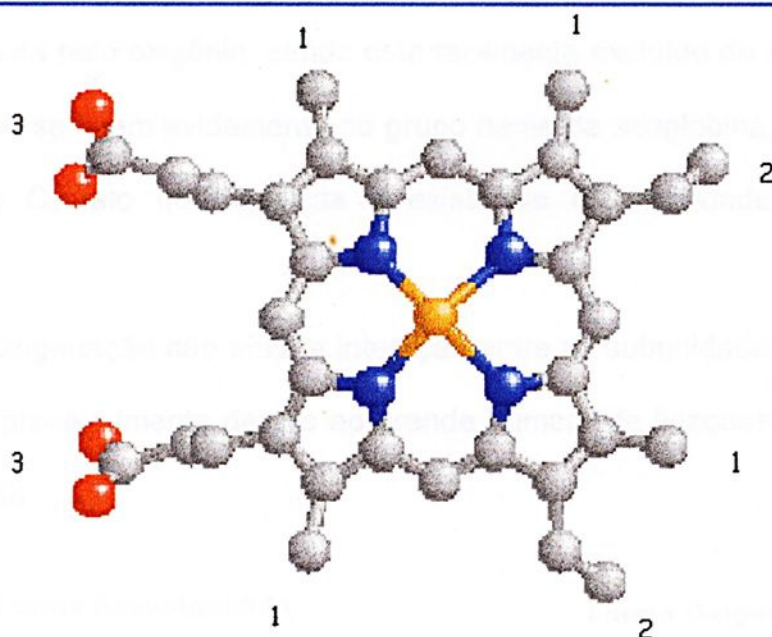


Figura 4. Grupo Heme: em laranja o átomo de ferro, em azul os nitrogênios, em cinza os carbonos e em vermelho os oxigênios.

Existe um grupo heme ligado a cada uma das cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Ele está parcialmente encerrado em uma cavidade delimitada por cadeias laterais de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, das hélices E e F principalmente. Este ambiente apolar torna possível a ligação reversível do oxigênio ao ferro (Fe^{2+}), sem que este seja oxidado a férrico (Fe^{3+}). O átomo de ferro está ligado aos quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico, à cadeia polipeptídica através de um resíduo de histidina do segmento F - a histidina F8 (His 87), chamada de histidina proximal (figura 5) e pode ser ainda ligado, reversivelmente, a uma molécula de oxigênio. Estas duas últimas ligações são perpendiculares ao plano do anel, estando cada uma delas em lados opostos do plano do heme. O oxigênio além de ligar-se ao ferro do grupo heme, estabelece uma ponte de hidrogênio com a histidina E7 (His 58), chamada de histidina distal. A este sítio pode ligar-se ainda: CO, NO e H_2S , com afinidade ainda maior que a

apresentada pelo oxigênio, sendo este facilmente excluído de sua posição. Esses compostos se ligam avidamente ao grupo heme da mioglobina, hemoglobina e do citocromo C, fato que explicita a existência da toxicidade para organismos aeróbios.

A oxigenação não afeta a interação entre as subunidades que compõem os dímeros, provavelmente devido ao grande número de ligações que mantêm essa associação.

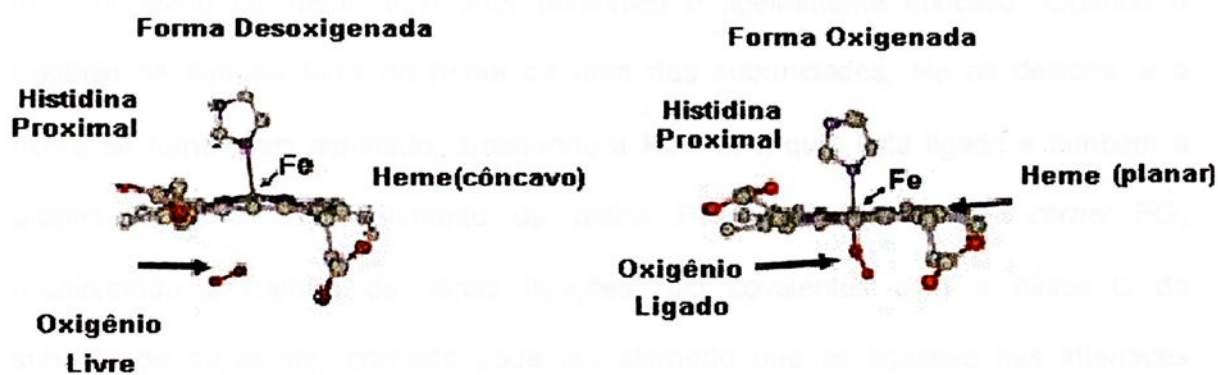


Figura 5. Grupo heme desoxigenado (côncavo) e oxigenado (planar).

O átomo de ferro pode apresentar-se em dois estados de oxidação diferentes, ferroso (+2) ou férrico (+3), conferindo à hemoglobina, as formas ferro ou ferri¹ hemoglobina, respectivamente, sendo que na última o oxigênio não consegue se ligar. A ligação do oxigênio ao grupo heme altera a coloração da Hb do sangue venoso para o sangue arterial, essa alteração pode ser verificada, nas amostras no laboratório, até mesmo a olho nu.

¹ Também chamada de Meta hemoglobina.

Como já citado o ferro do grupo heme é firmemente ligado à histidina proximal (His F8), as quatro moléculas de nitrogênio e tem a sexta posição disponível para ligação do oxigênio. Quando o átomo de ferro está ligado ao oxigênio a distância entre este átomo e a histidina proximal varia de 0,55Å, no estado desoxigenado, para 0,2Å no estado oxigenado.

O grupo heme, como visto anteriormente, apresenta algumas alterações quando ligado ou não ao oxigênio. Na desoxi-Hb, cada átomo de ferro está situado fora do plano do heme e o anel porfirínico é ligeiramente côncavo. Quando o oxigênio se liga ao ferro do heme de uma das subunidades, ele se desloca, e o heme se torna mais achatado, arrastando a His F8, à qual está ligado e também a própria hélice F. O movimento da hélice F desloca também o *corner* FG, ocasionando a ruptura de várias ligações não covalentes com a hélice C da subunidade adjacente, portanto pode ser afirmado que as ligações nas interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$, entre os dímeros, responsáveis pela estabilidade da estrutura desoxi-Hb são ligações iônicas e pontes de hidrogênio, como mostrado na figura abaixo.

1.1.2. A ligação do oxigênio à hemoglobina

Quando a primeira unidade polipeptídica se liga à molécula de O_2 ela comunica essa informação às subunidades restantes através de interações que ocorrem na interface delas. Essas interações, apresentadas na figura 6, são as pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas, além de ligações não covalentes como as pontes salinas.



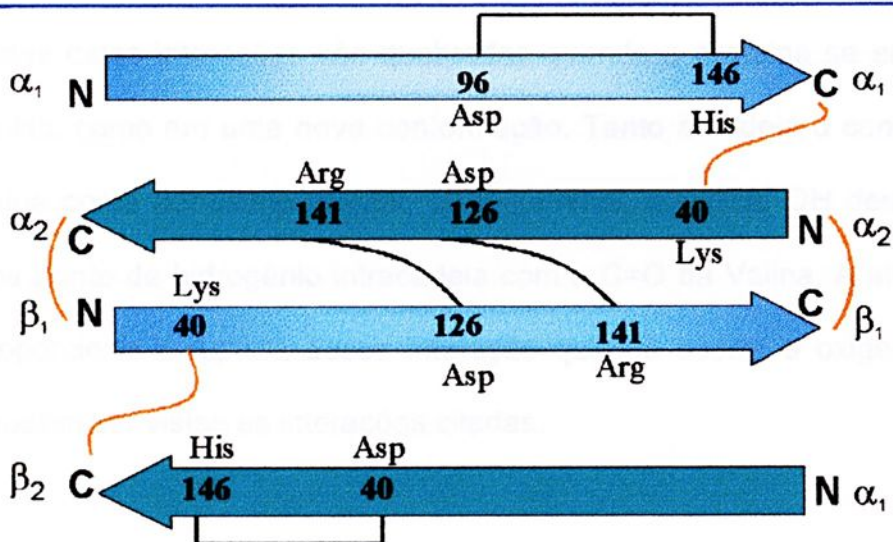


Figura 6. Representação das interações na interface $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ (Figura construída no Word).

As subunidades respondem a este estímulo, aumentando sua afinidade por oxigênio. Esta resposta envolve uma mudança na conformação da proteína, conferindo dois estados conformacionais diferentes e, designados como sendo tenso (T) e relaxado (R). As grandes mudanças ocorrem nas áreas de contato entre os dímeros, que efetivamente se deslocam um em relação ao outro em 15° . Essas conformações apresentadas pela hemoglobina podem ser vistas na figura 7, estabilizada pelas pontes salinas e pontes de hidrogênio.

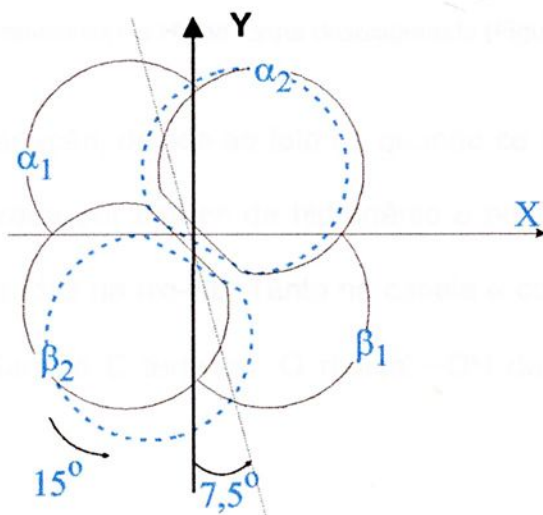


Figura 7. Representação esquemática dos estados R e T, a linha contínua representa o estado Tenso ou desoxigenado, a linha pontilhada representa o estado Relaxado ou oxigenado.

Introdução-

Todas estas interações são quebradas quando a proteína se encontra na forma oxi-Hb, como em uma nova conformação. Tanto a cadeia α como a β têm uma tirosina como penúltimo resíduo do C-terminal, o radical OH deste resíduo forma uma ponte de hidrogênio intracadeia com o C=O da Valina. A alteração na hélice proporciona a ruptura dessa interação quando ocorre a oxigenação. Na figura 8 podem ser vistas as interações citadas.

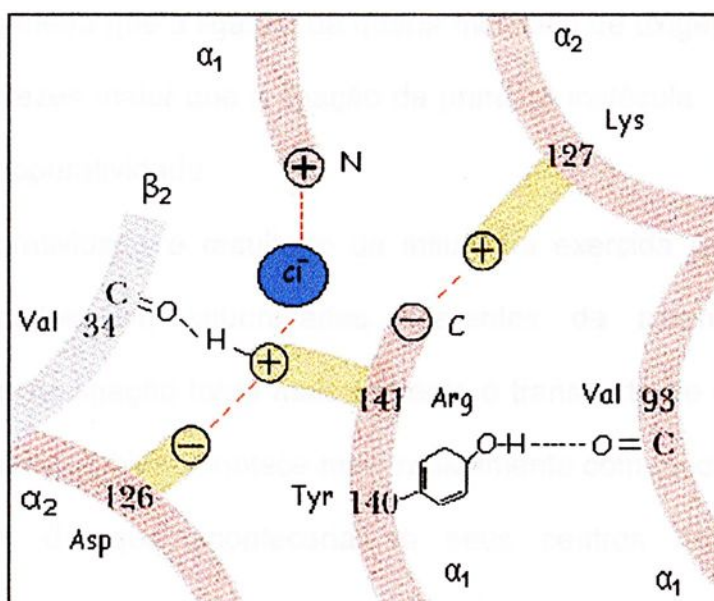


Figura 8. Interações que estabilizam a Hb na forma desoxigenada (Figura digitalizada do livro Garret & Grisham).

A Hb resiste à oxigenação, devido ao fato de quando se encontra na forma desoxigenada ser estabilizada por pontes de hidrogênio e pontes salinas. Todas estas interações são quebradas na oxi-Hb. Tanto na cadeia α como na β tem uma Tyr como penúltimo resíduo do C terminal. O radical $-OH$ deste resíduo forma uma ponte de hidrogênio.

A ligação do oxigênio à proteína, desloca o equilíbrio para a direção da estrutura de maior afinidade, o estado R ou estado oxigenado, resultando num aumento da afinidade pelo oxigênio à medida que a reação ocorre. Enquanto que no estado desoxigenado a molécula possui uma estabilidade maior devido à existência de pontes de hidrogênio e pontes salinas, sendo por isso chamado “estado tenso”. As novas conformações assumidas pela molécula de hemoglobina, devido às sucessivas ligações com oxigênio têm afinidades crescentes por este efetor, de tal maneira que a ligação da quarta molécula de oxigênio à proteína tem afinidade 300 vezes maior que a ligação da primeira molécula. Esse fenômeno é denominado cooperatividade.

A cooperatividade é resultado da influência exercida por um sítio sobre outros, localizados em subunidades diferentes da mesma molécula de hemoglobina, essa ligação torna mais eficiente o transporte de oxigênio. Assim a saturação da hemoglobina acontece mais rapidamente com mudanças na pressão parcial de O_2 , do que aconteceria se seus centros de ligação fossem independentes um do outro, como no caso da mioglobina.

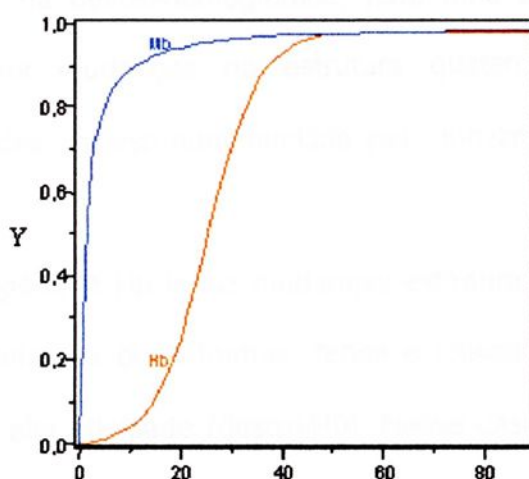


Figura 9. Curva de Saturação da Mioglobina e da Hemoglobina, fonte Castro, (1999).

Introdução

A curva de oxigenação, mostrada na figura 9, pode ser analisada de duas maneiras. O primeiro ponto a ser analisado é com relação à saturação fracional (Y), a qual é maior para a mioglobina para qualquer valor de pressão. Sendo assim, conclui-se que a afinidade da mioglobina é maior que da hemoglobina (a afinidade pode ser caracterizada por um valor P_{50} , que é a pressão parcial de O_2 para a qual 50% dos sítios de ligação estão preenchidos). Um outro ponto a ser analisado, é o formato da curva de oxigenação, hiperbólica para a mioglobina e sigmóide para a hemoglobina.

Quando a Hb passa da forma oxi→desoxi, nenhuma mudança estrutural significativa ocorre na região central do dímero $\alpha_1\beta_2$, na interface da proteína, ou nas hélices próximas (B,C,G e H) de cada subunidade. A mudança ocorre na parte mais externa do dímero, onde o heme, as hélices F e as regiões aleatórias (*corners*) FG de cada subunidade movem-se em direção ao centro da molécula. Os dois hemes e os dois *corners* FG tornam-se $\sim 2\text{\AA}$ mais próximos. Um importante efeito da mudança na subunidade é deslocar a hélice F na direção do plano do heme cerca de $1\text{\AA}$. Com isso, a histidina ligada ao heme é movida de uma posição assimétrica em relação ao nitrogênio da porfirina, na desoxi-hemoglobina, para uma posição simétrica na Hb ligada ao oxigênio. As mudanças na estrutura quaternária estão diretamente relacionadas às ocorridas na estrutura terciária pelo movimento da região aleatória (*corner*) FG.

A ligação do oxigênio à Hb induz mudanças estruturais que alteram também a energia livre relativa entre as duas formas, tensa e relaxada, mudando o equilíbrio em favor da forma de alta afinidade (desoxi-Hb). Nesse caso, o átomo de ferro está



situado fora do plano do grupo heme, mas, ligando-se ao oxigênio, ele se desloca em direção ao plano, como já citado acima. Este deslocamento se transmite aos vizinhos, produzindo uma alteração conformacional na subunidade que é transmitida para as outras subunidades, através da quebra de algumas ligações não covalentes e formação de novas ligações nas áreas de contato. Essa alteração na estrutura pode ser notada em toda molécula. Ocorre uma rotação de 15° de um dímero em relação ao outro, mostrada na figura 7, compactando o tetrâmero e aumentando sua afinidade por O_2 .

A ligação de O_2 à hemoglobina é regulada por H^+ , CO_2 e fosfatos orgânicos. Esses reguladores afetam as propriedades de ligação do oxigênio à hemoglobina, ligando-se à proteína em sítios diferentes dos sítios de ligação de O_2 . Essas interações que ocorrem à distância são chamadas interações alostéricas e por realizar este tipo de interação, a hemoglobina é conhecida como proteína alostérica.

1.1.3. Mecanismo Alostérico

Uma das características notáveis da vida é seu alto grau de controle exercido na maioria de seus processos. Existe uma grande variedade de mecanismos regulatórios e seu entendimento é o objetivo de estudo de muitos profissionais. Nesta seção será discutido um destes processos o Mecanismo de Regulação Alostérica. Essas interações cooperadas ocorrem quando a ligação de um ligante a um sítio específico é influenciada (ou gera influência) na ligação de outro ligante num sítio diferente da proteína. Se os ligantes são iguais temos efetores homotrópicos, se são diferentes heterotrópicos.



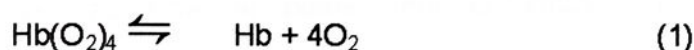
A ligação do O_2 a um sítio de ligação da Hb resulta no aumento da sua afinidade por mais O_2 , caracterizando a ação de efector homotrópico. Mas a hemoglobina também apresenta alteração na afinidade pela ação de efetores heterotrópicos (Cl^- , CO_2 , H^+ , DPG) que ao serem ligados à proteína diminuem a sua afinidade por O_2 , e que por serem diferentes da Hb são chamados de efetores heterotrópicos.

Como foi citada na seção 1.1.2 a afinidade da Hb por O_2 depende das mudanças no seu estado conformacional e a cooperatividade da ligação do O_2 à Hb é considerada regulação alostérica.

O coeficiente de Hill é uma medida dessa cooperatividade. Através da curva de equilíbrio, é possível descrever as constantes de associação (K_T) e dissociação (K_R) do oxigênio e a constante de ligação (K), na ausência de oxigênio. Os efetores alostéricos influenciam fortemente as constantes K_T e K , mas exercem apenas uma fraca influência sobre K_R .

1.1.4. Efeito Bohr

O transporte de O_2 é regulado pela concentração de H^+ e pela pCO_2 do meio. Este fenômeno é conhecido como *efeito Bohr*. O conjunto de fenômenos relacionados com aumento do caráter ácido da Hb, quando ela se liga ao O_2 , e o aumento do caráter básico causado pela desoxigenação, constitui o que se conhece como efeito Bohr alcalino ou normal:



estão ligadas a variações no mecanismo respiratório, além da respiração convencional utilizando-se do pulmão (*Lepidosiren*), o peixe ainda pode contar com as bexigas natatórias (*Arapaima*) ou vascularização dos lábios (*Electrophorus*), estas estratégias foram primeiramente desenvolvidas para pegar o oxigênio do ar e não para livrar o sangue do CO_2 . De fato é observado no *Electrophorus*, que enquanto o oxigênio é capturado através da vascularização dos lábios, 81% do dióxido de carbono é liberado pela pele do animal (Val & Almeida-Val, 1988).

Mas as peculiaridades no transporte de oxigênio dos peixes não acabam aqui, os peixes foram os primeiros vertebrados a usarem a hemoglobina para transportar oxigênio (Di Prisco & Tamburrini, 1991). E ainda possuem um sistema de transporte de oxigênio realizado por múltiplas hemoglobinas (também conhecida como isoformas de Hb ou iso-Hb) que são caracterizadas por apresentarem ou não propriedades funcionais diferentes (Riggs, 1970).

A grande variedade encontrada na multiplicidade e nas propriedades dessas hemoproteínas, tanto em número como em propriedades, é uma evidência de que as hemoglobinas de peixes despertam um grande interesse pelo seu estudo, além do fato de terem dado origem a duas hipóteses, que tentam explicar sua existência.

A primeira delas, chamada de Seleccionista, comenta o aparecimento de outras frações de hemoglobina, como sendo a seleção de características com "valor adaptativo", enquanto a segunda, chamada de Neutralista, a biodiversidade das Hbs como fruto de mutações neutras e de deriva genética.

Em vários casos, as Hbs de peixes têm isoformas que não possuem diferenças funcionais entre si. Um exemplo característico é o relatado por Gille e



Riggs (1972) para *Cyprinus carpio* e Weber *et al* (1976) para *Amia calva*. Mas, pode ser comprovada a existência de isoformas com funções distintas, o que aumenta o número dos adeptos da teoria adaptativa. Podem ser citados os exemplos da truta (Brunori, 1975) e do atum (Rossi-Fanelli e Antonini, 1960) que dão sustentação a esta corrente.

Quando o assunto é heterogeneidade funcional, existe a hipótese de que no caso de espécies que possuam isoformas de Hbs essas isoformas atuem juntas, obtendo assim uma otimização da capacidade de transporte de gás durante variações ambientais, diferente das situações onde exista apenas uma forma de Hb nos eritrócitos. Assim poderia ser dito que a heterogeneidade das Hbs tem um valor seletivo em ambientes instáveis.

Considerando as diversas estratégias apresentadas na literatura (Delatorre *et al*, 2000) para a adaptação ambiental de proteínas, como variações na estrutura primária, na concentração da proteína em si e no ambiente no qual atuam fisiologicamente, as Hbs apresentam a combinação das três.

A evolução das diferentes Hbs, a partir de um antepassado comum (Hb "primitiva"), deve ter sido guiada pela necessidade de encontrar um mecanismo que supra a demanda metabólica em relação às demandas fisiológicas (Brunori, 1973). Este processo tem levado ao desenvolvimento de um delicado e complexo mecanismo de controle molecular, envolvendo interações de vários tipos para otimizar a função necessária: a obtenção de iso-hemoglobinas e controle por efetores alostéricos.



1.3. Introdução ao Estudo Cristalográfico

Até 1911 a Cristalografia tinha por objetivo o estudo dos cristais atendo-se à determinação da simetria, dos índices de Miller de suas faces, das dimensões relativas da cela unitária e de algumas propriedades físicas, tais como índices de refração e densidade. Após 1911 a Cristalografia passa a ter por objetivo essencialmente o conhecimento da estrutura dos materiais, independentemente do seu estado físico e de sua origem, e das relações entre essa estrutura e suas propriedades. Esta nova definição se tornou possível em virtude da primeira experiência de difração de raios X realizada no laboratório de Max von Laue que teve como resultado duas descobertas fundamentais: a natureza ondulatória eletromagnética dos raios X e a natureza descontínua da matéria, estabelecendo dessa forma o fato de todos os materiais serem constituídos por átomos e/ou moléculas que, nos cristais, apresentam distribuição periódica tridimensional definindo uma rede tridimensional de difração para raios X de comprimento de onda da ordem de $1\text{\AA}$ (<http://www.lnls.br/sbcr>; Lenhninger, A.L., 1995).

Os métodos cristalográficos permitem determinar as posições relativas de todos os átomos que constituem a molécula (estrutura molecular) e a posição relativa de todas as moléculas na cela unitária do cristal. A primeira é, em grande parte, preservada em solução, e dela dependem as propriedades químicas do material. Da segunda dependem, fundamentalmente, as propriedades físicas.

O estudo por difração, de raios X, nêutrons ou elétrons, dos mais diferentes tipos de materiais levou, durante o decorrer do século XX, a métodos experimentais e teóricos específicos para cada um. De um modo geral podemos classificar os



materiais em amorfos, semicristalinos e cristalinos. Estes últimos ainda se distinguem quanto ao fato de serem monocristalinos e policristalinos.

Materiais amorfos – tais materiais, apesar de não serem cristalinos, sempre apresentam uma certa regularidade estrutural média de curto alcance ao redor de qualquer átomo.

Materiais semi-cristalinos – Tais materiais apresentam ordem parcial, em geral apenas em uma ou duas dimensões. Exemplos muito importantes são materiais biológicos como DNA e as proteínas fibrosas, tais como colágeno, queratina e polímeros vegetais, como celulose, e vários polímeros sintéticos. O estudo desses materiais é realizado através de metodologia específica denominada Difração por Fibras.

Materiais Policristalinos – Tais materiais constituem o estado físico da maioria dos materiais orgânicos ou inorgânicos.

Monocristais – A utilização dos dados de difração de raios X obtidos utilizando-se monocristais são os mais indicados para a determinação precisa das estruturas cristalinas e moleculares. Entretanto foi necessário desenvolver métodos adequados para a determinação de estrutura cristalina e molecular de moléculas de até cerca de 150 a 200 átomos exceto hidrogênios e de proteínas, que podem ter milhares de átomos. Distingue-se então duas áreas com metodologias próprias: Cristalografia de Pequenas Moléculas e Cristalografia de Proteínas. Como o escopo deste trabalho é cristalografia de proteínas, este será melhor descrito na seção seguinte.



1.3.1. Cristalografia de Proteínas

Os primeiros estudos da Cristalografia tratavam, obviamente, sobre o aspecto externo dos cristais. A natureza do estado cristalino ou a ordem interna de uma substância não é um fato tão evidente como a visão das faces perfeitas ou formas cristalinas de um mineral. A primeira ligação entre forma externa e faces de um cristal e sua ordem interna não se realizaram até o século XVII. Mas adiante se viu que a ordem interna poderia existir embora não houvesse evidência externa deste fato e somente, mais recentemente e com a aplicação de técnicas de raios X e de difração de elétrons, se determinou cristais de materiais biológicos.

Existem vários passos operacionais em uma análise por raios X e a quantidade de informação obtida depende do grau de ordem estrutural na amostra. Informações mais detalhadas sobre a estrutura tridimensional das proteínas requerem cristais da mesma, ou seja, estruturas em estado mais altamente ordenado. A cristalização de proteínas é uma ciência muito empírica e as estruturas de muitas proteínas importantes ainda não foram determinadas, porque tais proteínas são muito difíceis de cristalizar. Uma vez obtido o cristal este é submetido a raios X. Ao arranjo regular de pontos chamamos padrão de difração e aos pontos, reflexão. Cada átomo na molécula dá sua contribuição na formação de cada ponto. A intensidade das reflexões está relacionada à estrutura da proteína através de um artifício matemático: Transformada de Fourier.

A realização de trabalhos de difração exige como inicialmente a obtenção dos materiais sob forma pura. A coleta dos dados de difração e a sua utilização exigem



equipamentos fortemente automatizados e a utilização desses dados na determinação estrutural necessitam da utilização de métodos que envolvem conhecimentos de física e de estereoquímica e o uso de recursos computacionais avançados. Por todas essas razões, a cristalografia se constitui em uma ciência extremamente interdisciplinar, exigindo a participação de químicos, bioquímicos, biólogos moleculares, físicos de estado sólido, especialistas em computação e em modelagem molecular.



CAPÍTULO 2

2. MATERIAIS E MÉTODOS



2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos animais e Coleta do Sangue

Os animais² usados nesse trabalho foram obtidos junto ao Centro de Aquicultura da Unesp Caunesp - Jaboticabal e num pesqueiro na região de São José do Rio Preto. A identificação das espécies foi feita pelo Prof. Dr. Francisco Langeani Neto do Depto de Zoologia da UNESP de São José do Rio Preto.

Espécimes adultos do *Brycon cephalus* foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (1g para 15 litros de água) por aproximadamente cinco minutos.

O sangue dos animais foi coletado usando seringas heparinizadas e agulhas descartáveis, contendo 1ml de solução salina tamponada (tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl a 1%, EDTA 1mM e D-Glicose 0,2%). O sangue foi transferido imediatamente para tubos de centrifuga contendo solução salina, com quantidade suficiente para 50mL.

Em seguida os tubos foram centrifugados por quatro vezes a 380g durante 7 minutos numa temperatura de 4°C, no final de cada centrifugação o sobrenadante foi retirado e a ele adicionado o tampão salino já citado anteriormente, porém sem glicose (Honda et al 2000).

O hemolisado foi preparado em tampão contendo: 50mM Tris pH 8,5 e 1mM de EDTA (tampão A), seguido por centrifugação (1520g por 20 minutos), sendo o sobrenadante concentrado e submetido a uma filtração através de membranas

² cedidos pela Profª. Dra. Elisabeth Urbinati, Diretora do citado centro.



Millipore para remoção de impurezas. Para remoção de fosfato do hemolisado, foi feita uma diálise contra o tampão A, seguido de uma filtração em gel em Sephacryl S-100HR (2,6x18cm) em uma coluna equilibrada com o mesmo tampão.

A purificação da hemoglobina foi feita por cromatografia de troca iônica usando DEAE-Sephadex A-50 e um gradiente linear entre tampão Tris 50mM pH 9,2 e tampão bis-Tris 50mM pH 6,5. Os componentes isolados foram deionizados através de várias passagens através de MIXED-BED Amberlite MB-1 (Sigma), concentrados por centrifugação e armazenados em nitrogênio líquido para posterior uso.

A análise da amostra de proteína foi feita por eletroforese com o uso de gel não desnaturante de poliacrilamida.

2.2 Determinação da Estrutura Primária Parcial da fração-I

A técnica utilizada na determinação foi a Degradação de Edman, executada no laboratório do Prof. Lewis Greene. Sendo realizado um novo refinamento posicional e também uma nova dinâmica molecular. Foram determinados alguns trechos da seqüência primária do carbono terminal e da amina terminal, usando degradação de Edman, totalizando 51 resíduos de aminoácidos determinados, os quais irão substituir os resíduos de aminoácidos da estrutura usada como modelo.

Tanto o descrito nesta seção quanto a anterior foram fazer parte do trabalho de mestrado do aluno Rubens Honda (Honda, 2001).



2.3. Cristalização

Cristalização é um processo de ordenação, no qual os átomos ou moléculas assumem posições regulares no estado sólido. Um processo de cristalização pode ser considerado como um equilíbrio dinâmico entre as partículas no estado líquido e no estado sólido. Sendo assim o cristal cresce quando o equilíbrio é deslocado no sentido da solidificação.

Para a obtenção de cristais adequados para estudos de cristalografia de proteínas é necessário controlar fatores que influenciem a cinética de crescimento da macromolécula como: pH, temperatura, pureza e concentração da amostra, com objetivo de evitar o crescimento rápido de vários núcleos pequenos e indesejáveis (Drenth, 1994).

Dentre os métodos normalmente usados para a obtenção de cristais, batch, diálise e difusão de vapor, este último foi empregado nesse trabalho, mais precisamente através do sistema de gota pendurada (*hanging drop*) segundo o método da matriz esparsa (Jancarik & Kim, 1991).

Para a aplicação do método citado acima, a fração-II da hemoglobina purificada foi então diluída em água deionizada até a concentração de 20mg/mL. Esta solução foi colocada em presença das 50 soluções sugeridas pela literatura (Jancarik & Kim, 1991), tais soluções apresentam concentrações e reagentes variados para serem aplicados na cristalização de proteínas na proporção 1:1. O objetivo é expor a proteína a diferentes concentrações dos possíveis reagentes que levariam a amostra a cristalizar-se.



Os cristais foram obtidos em diferentes condições, sendo que os melhores apareceram após dois dias de crescimento, em gota contendo 2 μ L de solução de proteína misturada a 2 μ L de solução de PEG 4000 a 30% (p/v), tampão TRIS 0,1M e pH 8,5 e Cloreto de Magnésio 0,2M. Estas condições foram aprimoradas e os cristais submetidos à difração foram obtidos quase nas mesmas condições variando apenas a concentração do precipitante PEG 4000 para 25% (p/v). As melhorias foram feitas usando como embasamento teórico o apêndice A.

2.4. Coleta de Dados

Esses cristais obtidos segundo a descrição da seção anterior, foram montados em capilares de quartzo e submetidos à radiação Síncrotron, na estação PCr do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Polikarpov, Perles *et al*, 1986 e Polikarpov, Oliva *et al*, 1998). Dados de difração de raios X foram coletados utilizando placas de imagem de 34,5cm de diâmetro do MAR Research, com radiação de comprimento de onda de 1,544Å e sendo mantida uma distância de 200mm entre cristal e detetor. As 135 imagens foram obtidas a 3,0Å de resolução, com 1,2° de oscilação a uma temperatura de 8°C. Para o processamento dos dados foi usado o programa Denzo e para o escalonamento o programa Scalepack (Otwinowski, 1993).

2.5. Substituição Molecular

Após a coleta de dados dos cristais da hemoglobina onde são obtidos os módulos dos fatores de estrutura ($F(h,k,l)$), é necessário determinar as fases. Como



as fases relativas não são determinadas pela coleta de dados é preciso determiná-las. Uma das alternativas é o emprego da Substituição Molecular.

A determinação da estrutura preliminar da proteína foi feita utilizando um dos programas computacionais integrantes do pacote CCP4 (*Colaborative Computational Project* nº 4) o AMoRe (Navaza, 1994). Este programa utiliza a estrutura tridimensional do modelo escolhido segundo alguns critérios³, para gerar as fases da estrutura em estudo. O método da substituição molecular pode ser entendido se relacionarmos a função de Patterson da proteína com a função de Patterson do modelo de procura, usando como parâmetros de comparação os coeficientes de correlação (CC)⁴ e os fatores R (R_{fator})⁴ encontrados para cada modelo testado.

A obtenção de um bom modelo segue os passos que são listados abaixo e podem ser melhor visualizados no diagrama mostrado na figura 12.

Primeiramente os dados de difração de raios X são convertidos para um formato específico reconhecido pelo programa através da rotina **f2mtz** e ordenado pela rotina **sorting**. Como foi possível inferir, através dos dados de raios x coletados, que o grupo espacial no qual a proteína cristalizou-se era o P2, essa informação também foi utilizada durante essa primeira etapa. Todas as moléculas de água e fosfato do modelo inicial foram removidas com o intuito de simplificar o modelo de busca.

O próximo passo é executado pela rotina **tabling** onde as coordenadas atômicas do modelo são transladadas para que seu centro de massa coincida com a origem. E essa rotação é feita de tal forma que seus eixos de inércia principais

³ Enovelamento (ou forma de enovelamento), família a que pertence a proteína, homologia de sequência primária.

⁴ Essas definições são mostradas no apêndice C.



permaneçam paralelos aos eixos ortogonais. Para tanto se faz necessário a escolha do modelo de procura, e a escolha desse modelo é baseada na identidade estrutural da proteína em estudo e da proteína modelo. Essa identidade envolve parâmetros de comparação entre a sequência primária e a família a que pertence a proteína modelo e a proteína estudada.

Nesse trabalho foram utilizados como modelos de procura oito estruturas de hemoglobinas de peixes e uma de hemoglobina humana depositadas no PDB (Protein Data Bank) (Tabela 1). Tendo os possíveis modelos de procura a etapa seguinte é aplicar a função de rotação, isso foi feito através da rotina **rot_{ing}** usando os seguintes intervalos de resolução: 10-4,5Å, 10-3,5Å, 8-3,5Å, 6-3,5Å com passos de 2.5° e raio de integração de 28,5Å. As rotações que apresentaram os maiores valores de coeficiente de correlação foram selecionadas para serem utilizados na etapa seguinte a rotina **tra_{ing}**, onde é feita a procura da translação ideal, dentro do mesmo intervalo de resolução. Para se obter a confirmação do grupo espacial, as rotinas **rot_{ing}** e **tra_{ing}** foram executadas novamente para o grupo espacial P2₁ na melhor faixa de resolução encontrada. O refinamento de corpo rígido é a próxima etapa a ser realizada na qual é desenvolvido um processo de refinamento das posições de grupos rígidos de átomos contra as intensidades observadas. Este processo foi feito através da rotina **fit_{ing}**, tendo sido escolhido como o melhor modelo aquele que apresentou os melhores resultados de coeficiente de correlação (CC) e fator R (R_{factor}). Tendo sido este modelo aplicado na etapa de refinamento.



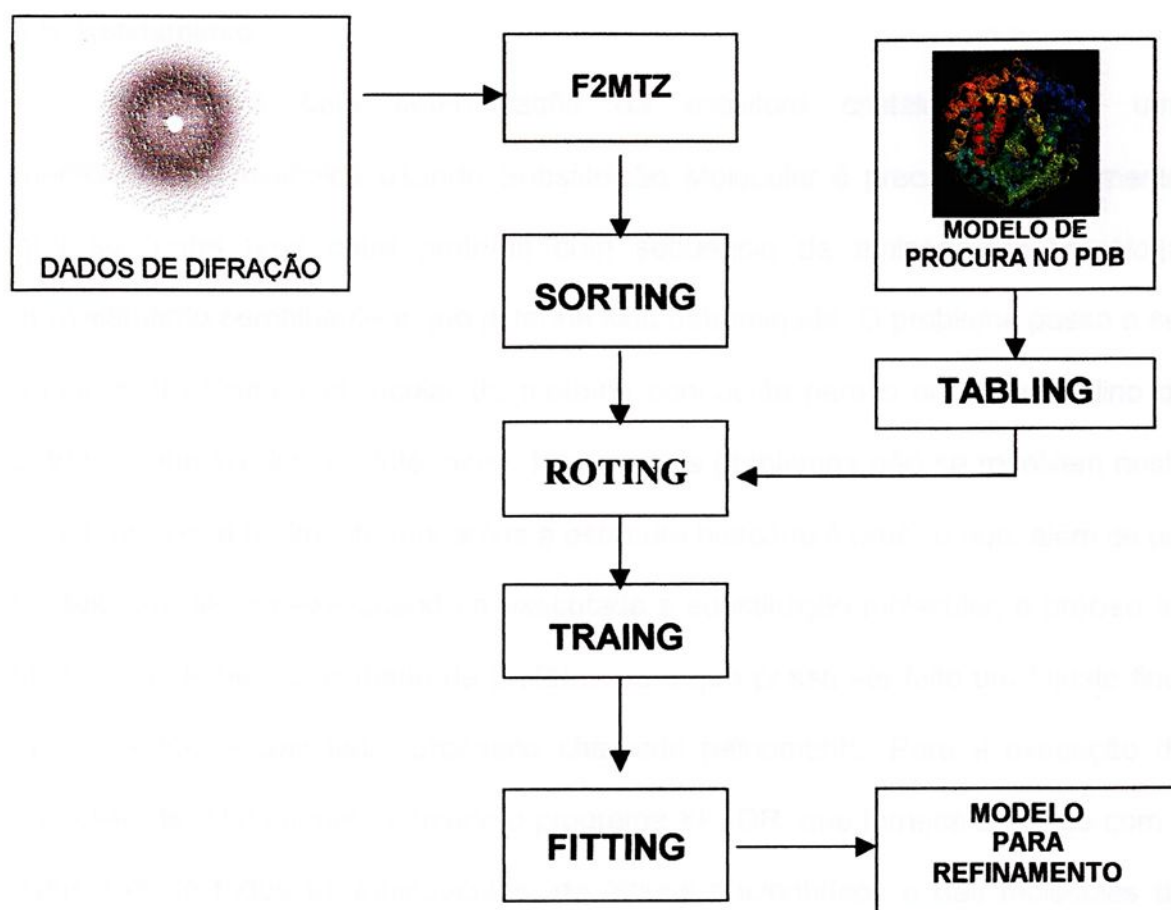


Figura 12. Diagrama esquemático do protocolo de Substituição Molecular seguindo o programa AMoRe, do pacote CCP4.

2.6. Refinamento

Na busca pela determinação da estrutura cristalográfica de uma macromolécula biológica usando Substituição Molecular é preciso, primeiramente, que se tenha uma outra proteína com seqüência de aminoácidos homóloga, enovelamento semelhante e que já tenha sido determinada. O problema passa a ser transferir a estrutura molecular da proteína conhecida para o arranjo cristalino da estrutura que se deseja determinar. Mas nossos problemas não se resolvem neste ponto, para que realmente tenhamos a estrutura buscada é preciso que, além de um modelo que se encaixe quando é executada a substituição molecular, é preciso ter também a seqüência primária da proteína para que possa ser feito um “ajuste fino” deste modelo aproximado, processo chamado refinamento. Para a execução do processo de refinamento foi usado o programa XPLOR, que fornece arquivos com a geometria de todos os aminoácidos, de alguns nucleotídeos e das moléculas de água, o processo de refinamento é descrito no apêndice D. O programa adiciona um termo eletrostático à função de energia E_{total} , para os grupos carregados presentes na macromolécula. Durante cada ciclo de refinamento o programa calcula dois índices de discordância R_{fator} e R_{livre} .

Como não é conhecida a estrutura primária total da Hb do *Brycon cephalus* será permitido fazer apenas um refinamento parcial das estruturas das duas isoformas apresentadas pela proteína em estudo.

Como se trata de um refinamento parcial, uma ferramenta muito útil é o alinhamento de seqüências via *Blast-2* (Altschul *et al*, 1990). Foi feito o alinhamento de todas as seqüências de hemoglobinas de peixe aplicadas na etapa de



Substituição Molecular com o objetivo de checar possíveis modificações residuais que poderiam ser feitas.

O programa *Blast-2* faz uma busca de seqüências no banco de dados escolhido (PDB), que apresentem similaridade com a seqüência de entrada. Usando como parâmetro a seqüência da truta (*Oncorhynchus mykiss*), já que estamos “emprestando” as fases dessa estrutura para o nosso modelo.

O primeiro passo do refinamento usando o programa XPLOR é a realização da rotina **generate**, com o término desta etapa teremos gerado dois arquivos que serão úteis em várias outras etapas, os arquivos de topologia e o PDB. Esta etapa consiste em ajustar os dados obtidos pela substituição molecular para uma linguagem que possa ser lida pelo programa usado.

Subseqüentemente é executada a rotina **setup_free_r**, onde são marcadas as reflexões que são usadas para a determinação do R_{livre} , calculado a partir de 10% das reflexões escolhidas aleatoriamente. É feito um refinamento de corpo rígido onde cada monômero da hemoglobina pode ser considerado como um “bloco”, assim todo o “bloco” é refinado assumindo se tratar de um único átomo e não de um conjunto deles.

A visualização é feita utilizando o programa *Xtalview* (McRee, 1994) que faz a superposição das coordenadas do modelo com o mapa de densidade eletrônica.

O refinamento da estrutura da Bchb-I teve seu início pela realização das rotinas mostradas no diagrama abaixo:



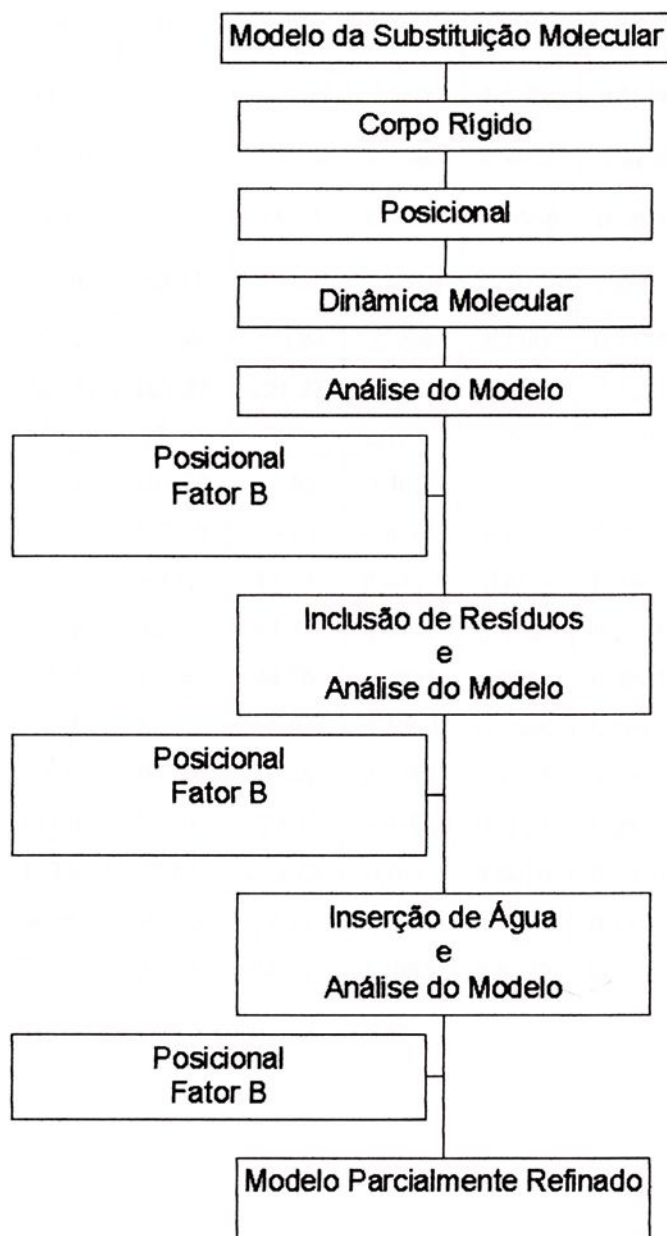


Figura 13. Diagrama simplificado das etapas do Refinamento.

Tabela 1. Ângulos de Euler e coordenadas fracionárias das estruturas usadas como modelo após a Substituição Molecular.

Modelo	Molécula	$\alpha(^{\circ})$	$\beta(^{\circ})$	$\gamma(^{\circ})$	X	Y	Z	CC (%)	R _{fator} (%)
1bbb	1	88,11	91, 81	278,86	0,9191	0,0931	0,5920	25,3	54,8
	2	82,97	93,09	278,79	0,7085	0,4826	0,9186		
1out	1	2,25	80,52	11,37	0,4200	0,0056	0,3691	21,3	55,3
	2	-1,16	88,41	16,44	0,4010	-0,0126	0,0520		
1t1n	1	354,27	95,59	220,88	0,299	-0,0006	0,1170	24,1	54,7
	2	353,67	103,07	221,27	0,0679	-0,0203	0,2931		
1spg	1	184,27	99,10	103,64	0,1574	0,0027	0,1105	22,3	54,0
	2	186,72	102,52	99,52	0,0624	-0,0252	0,4899		
1pbx	1	4,61	103,08	43,83	0,4708	-0,0017	0,3824	26,0	54,4
	2	6,41	92,19	43,87	0,4717	-0,0190	0,0645		
1cg5	1	178,84	76,94	41,71	0,3892	0,1164	0,2845	19,4	55,2
	2	180,77	83,64	44,76	0,4891	0,9283	0,3847		
1cg8	1	2,25	80,52	11,37	0,4200	0,0056	0,3691	21,3	55,3
	2	-1,16	88,41	16,44	0,4010	-0,0126	0,052		
1hbh	1	177,09	85,21	223,32	0,0189	0,1093	0,0460	23,7	54,6
	2	179,95	77,92	218,79	-0,0111	0,8828	0,0320		
1ouu	1	83,87	147,05	82,94	0,3610	0,0002	0,1159	52,9	30,8
	2	262,57	87,29	84,12	0,1655	0,5029	0,3724		

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados



3. Resultados e Discussão

3.1. Purificação da Proteína

A análise da amostra de proteína foi feita por eletroforese com o uso de gel não desnaturante de poliacrilamida, tornando possível afirmar que existem duas frações de hemoglobina denominadas Bchb-I e Bchb-II.

A separação eletroforética das isoformas apresentou, como citado anteriormente, duas frações distintas uma minoritária catódica (~10%) com pouca migração e outra majoritária anódica.

3.2. Resultados e Discussão da fração-II

3.2.1. Cristalização da fração-II

Os cristais de Bchb-II obtidos apresentaram dimensões de aproximadamente 0,5 x 0,5 x 0,5mm (figura 14) foram expostos a raios X.



Figura 14. Fotografia dos cristais de hemoglobina após as melhorias realizadas.

3.2.2. Coleta de Dados da fração -II

Um total de 135 imagens foi coletado e os dados de difração obtidos a $3.0\text{\AA}$ de resolução. Após esses dados terem sido processados mostraram pertencer ao grupo monoclinico primitivo do tipo $P2_1$, com parâmetros de cela iguais a $a = 64,4(7)\text{\AA}$; $b = 89,0(7)\text{\AA}$; $c = 106,1(3)\text{\AA}$; $\alpha = \gamma = 90^\circ$ e $\beta = 102,8(3)^\circ$. Os dados revelaram ainda existirem dois tetrâmeros por unidade assimétrica. O volume calculado para a cela unitária foi de $5.93 \times 10^5 \text{\AA}^3$, compatível com dois tetrâmeros por unidade assimétrica, o volume de Mathews do cristal calculado como descrito a seguir resultou $2,34 \text{\AA}^3 \text{Da}^{-1}$, foi considerado $0,74 \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ como volume específico e uma densidade de $1,19 \text{g.cm}^{-3}$ da proteína, resultando um volume de solvente de 47% cujos cálculos também são apresentados abaixo, esses dados podem ser vistos na tabela 2.

Informações conhecidas

Parâmetros de cela: $a = 64,4\text{\AA}$, $b = 89,0\text{\AA}$ e $c = 106,1\text{\AA}$

Ângulos $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 102,8^\circ$

Z = Número de dímeros na cela unitária.

Massa Molar $(MM)_{\text{Hb}} = 65.000 \text{Da}$.

Número de dímeros por unidade assimétrica = 4.

Cálculos Realizados

Volume da cela unitária (V_{cela}) = $a \times b \times c = 64,4 \times 89,0 \times 106,1 = 608.122,76 \text{\AA}^3$

$$\text{Volume de Mathews } (V_M) = \frac{V_{\text{cela}}}{Z \times MM} = \frac{608.122,76}{Z \times 65000} = \frac{9.356}{Z}$$

Testando os possíveis valores de Z

Para $Z = 2 \rightarrow V_M = 4,68 \text{\AA}^3/\text{Da}$

Para $Z = 4 \rightarrow V_M = 2,34 \text{\AA}^3/\text{Da}$

Resultados

Sendo

$$\frac{1,23}{V_M} + V_{SV} = 1$$

onde V_M = Volume de Mathews.

V_{SV} = Volume de Solvente.

$$\frac{1,23}{2,34} + V_{SV} = 1$$

$$V_{SV} = 1 - 0,53$$

$$V_{SV} = 0,47$$

$$\rho = \frac{Z \times M_r \times m_H}{V_{\text{cela}}} + \rho_{SV} \times V_{SV}$$

$$\rho = \frac{4 \times 65.000 \times 1,673 \cdot 10^{-24}}{608.122,76} + 1 \times 0,47$$

$$\rho = 0,715 + 0,47$$

$$\rho = 1,185 \text{ g/cm}^3$$

Tabela 2. Resumo dos dados de difração de raios X.

Variáveis	Dados
Faixa de resolução dos dados (Å)	Máxima 29,95; Mínima 3,0
Número total de observações ($I > 1\sigma$)	48.397
Total de reflexões únicas	19.510
Completeza (%)	82,6
Redundância	2,48
Parâmetros de cela (Å)	a=64,406; b=88,966; c=106,21
Grupo Espacial	P2 ₁

A tabela 3 apresenta um resumo da estatística da coleta de dados.

Tabela 3. Estatística detalhada dos dados de difração de raios X, coletados para o cristal de Bchb-I.

Intervalo das Reflexões	Número das Reflexões Independentes	$I/\sigma(I)$	R_{merge}	Completeza(%)
20,0-6,11	988	15,91	0,043	89,3
6,11-4,87	936	19,51	0,054	96,1
4,87-4,26	943	18,70	0,055	96,8
4,26-3,88	900	18,77	0,059	95,2
3,88-3,6	933	18,19	0,067	98,2
3,6-3,39	914	17,59	0,080	99,5
3,39-3,22	910	16,11	0,091	99,9
3,22-3,08	913	13,88	0,102	99,7
3,08-2,96	897	12,56	0,115	99,8
2,96-2,86	893	11,26	0,125	99,9
2,86-2,77	904	8,82	0,140	99,8
2,77-2,69	899	8,39	0,162	99,6
2,69-2,62	867	7,42	0,187	99,1
2,62-2,56	902	6,66	0,198	99,0
2,56-2,50	868	5,16	0,249	97,5
Total das Reflexões	13.667	198,57	0,075	97,6

3.2.3. Substituição Molecular da fração-II

Para a determinação do modelo a ser utilizado na substituição molecular foram usadas algumas estruturas de hemoglobinas depositados no PDB. Os modelos testados e seus respectivos Coeficientes de Correlação (CC) e R_{fator} podem ser vistos na tabela 4. Após ter sido determinado o modelo é preciso ainda determinar a melhor faixa de resolução, para fazê-lo foram testadas as faixas de 10-4,5Å, 10-3,5Å, 8-3,5Å e 6-3,5Å, e pelos dados apresentados na tabela 5 podemos ver que a melhor faixa de resolução é a de 10-4,5Å.

Tabela 4. Hemoglobinas usadas como modelos de pesquisa na Substituição Molecular.

Código de acesso ao PDB	Proteína	Resolução(Å)	CC(%)	R _{fator} (%)
1bbb	Carbomonoxy-Hb Humana <i>Homo sapiens</i> .	1,7	58,9	22,2
1hbh	Desoxy-Hb do peixe <i>Pagothenia bernacchii</i> .	2,2	54,2	26,2
1cg8	Carbomonoxy-Hb do peixe <i>Dasyatis akajei</i> .	1,9	54,0	26,5
1pbx	Carbomonoxy-Hb do peixe <i>Pagothenia. Bernacchii</i>	2,5	53,8	27,1
1spg	Carbomonoxy-Hb do peixe <i>Leiostomus xanthurus</i> .	1,95	52,6	29,2
1cg5	Desoxy-Hb do peixe <i>Dasyatis akajei</i> .	1,6	55,0	23,0
1t1n	Carbomonoxy-Hb do peixe - <i>Trematomus akajei</i>	2,2	53,8	29,8
1out	Desoxy-Hb do peixe <i>Oncorhynchus mykiss</i>	2,3	54,5	24,8
1ouu	Carbomonoxy-Hb do peixe <i>Oncorhynchus mykiss</i>	2,5	52,9	30,8

Tabela 5. Ângulos de rotação, distâncias fracionárias de translação, Coeficiente de Correlação e Fator R, nas diferentes faixas de resolução.

Resolução (Å)	$\alpha(^{\circ})$	$\beta(^{\circ})$	$\gamma(^{\circ})$	Tx	Ty	Tz	CC(%)	R(%)
6-3,5	170,57	81,6	319,86	0,363	0,000	0,359	52,6	15,1
8-3,5	351,41	97,38	220,92	0,078	0,000	0,030	53,9	27,9
10-3,5	172,49	83,57	321,07	0,488	0,000	0,211	54,1	21,0
10-4,5	180,08	77,13	139,83	0,798	0,131	0,836	52,9	30,8

Após a determinação da faixa de resolução o passo seguinte foi a determinação do grupo espacial, feita ao serem recalculadas as funções rotação e translação na faixa de 10-4,5Å para os grupos P2 e P2₁, a estrutura em estudo mostrou pertencer ao grupo espacial P2₁ como pode ser visto na tabela 6.

Tabela 6. Ângulos de rotação, distâncias fracionárias de translação, Coeficiente de Correlação e Fator R obtidos para os grupos espaciais apresentados pelo sistema monoclinico na faixa de resolução de 10-4,5Å.

Grupo espacial	$\alpha(^{\circ})$	$\beta(^{\circ})$	$\gamma(^{\circ})$	Tx	Ty	Tz	CC(%)	R(%)
P2	3,79	82,75	77,17	0,977	0,139	0,126	53,6	27,2
P2 ₁	180,08	77,130	139,83	0,798	0,131	0,836	52,9	30,8

Resultados

Um resumo dos dados obtidos com a aplicação da Substituição Molecular pode ser visto na tabela 7.

Tabela 7. Resumo dos dados de Substituição Molecular.

Variáveis	Dados
Rotação	$\alpha=90^\circ$; $\beta=102,81^\circ$; $\gamma=90^\circ$
Translação	$T_x=0,798$; $T_y=0,131$; $T_z=0,836$
Coefficiente de Correlação(%)	52,9
R_{fator} (%)	30,8

3.2.4. Refinamento da fração I

Antes que se inicie o processo de refinamento é preciso gerar as informações moleculares da estrutura que terão suas coordenadas refinadas. Estas informações são divididas em dois arquivos, um sobre a topologia da molécula (massas dos átomos e energia, energia essa que deverá ser minimizada durante o processo de refinamento) e o outro com informações químicas (constantes que serão usadas no cálculo da energia minimizada durante o refinamento). Estes dois arquivos são gerados a partir de coordenadas em formato PDB, obtidas na substituição molecular para então serem refinadas.

Foram realizados 40 ciclos de refinamento de corpo rígido obtendo valores de R_{fator} e R_{livre} de 34,6% e 34,8% respectivamente. O próximo passo foi a execução do refinamento posicional que usa os arquivos de saída do refinamento de corpo rígido. Com a aplicação de mais 120 ciclos do citado refinamento, foram obtidos valores de R_{fator} e R_{livre} iguais a 26,9% e 34,4%.

Na etapa seguinte foi aplicada a rotina denominada *full refinement*, que se trata de um refinamento completo onde são realizados 50 passos de dinâmica molecular, 120 de refinamento posicional, e 15 de refinamento do fator térmico B. Do peso (w_a) calculado no *check* foi usado apenas 80%, obtendo após a execução dessa etapa, 26,5% e 39%



como valores para R_{fator} e R_{livre} , respectivamente. Apesar do valor do fator R ter sofrido uma leve diminuição (0,5%) o valor de R_{livre} subiu quase 5%, sendo assim os resultados obtidos com o *full refinement* foram descartados e quando a estrutura primária for determinada os trabalhos de refinamento serão retomados a partir da etapa anterior.

Os dados de R_{fator} e R_{livre} durante cada uma das etapas do refinamento podem ser vistos na tabela 8.

Tabela 8. Valores de R_{fator} e R_{livre} obtidos durante o processo de refinamento.

Tipo de Refinamento	Número de ciclos	R_{fator} (%)	R_{livre} (%)
Corpo Rígido	40	34,6	34,8
Posicional	120	26,9	34,4
Dinâmica Molecular	50		
Completo Posicional	120	26,5	39,0
Fator B	15		

Para confirmar se a fração-II apresentada se tratava, realmente, da oxi-Hb, foi feita a comparação das distâncias entre o heme e as histidinas proximais e distais da Hb humana (Hhb), e confirmou se tratar da proteína oxigenada, como pode ser visto na tabela 9.

Tabela 9. Distâncias entre Ferro-Histidina nas estruturas das hemoglobinas do Bchb-II e a Hhb. As histidinas 58 e 63 são as distais, enquanto que as 87 e 92 são as proximais, nas cadeias alfa e beta respectivamente.

Molécula	Cadeia Alfa 1 (Å)	Cadeia Alfa 2 (Å)	Cadeia Beta 1 (Å)	Cadeia Beta 2 (Å)
Bchb	His58 - 4,1	His63 - 4,3	His58 - 4,2	His63 - 4,3
	His87 - 1,9	His92 - 2,1	His87 - 2,3	His92 - 2,3
Oxy-HHB	His58 - 4,3	His58 - 4,3	His63 - 4,2	His63 - 4,2
	His87 - 2,4	His87 - 2,4	His92 - 2,1	His92 - 2,1

Como já comentado não é conhecida, nem mesmo um pequeno trecho, da seqüência primária da fração II da hemoglobina do *Brycon cephalus* e aliado ao fato dos dados de difração serem a resolução de 3,0Å, não foi possível prosseguir com o processo de refinamento. Mas mesmo apresentando um refinamento parcial é possível ver, através da densidade eletrônica do grupo heme mostrada na figura 15, que os dados

Resultados

são passíveis de refinamento ficando como proposta para um trabalho futuro tão logo novos dados sejam obtidos.

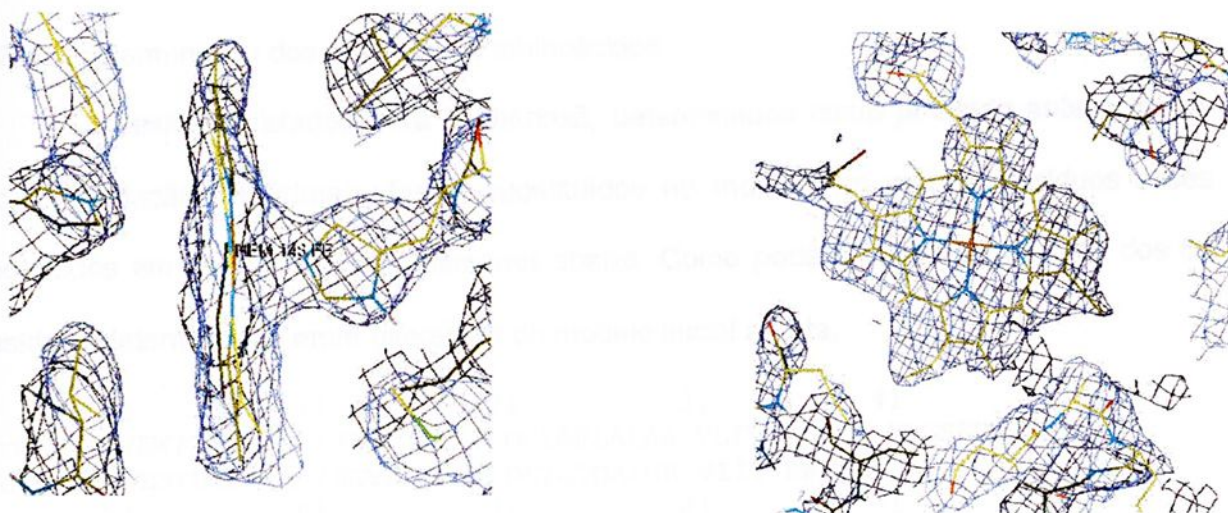


Figura 15a. Vistas frontal e lateral, do grupo heme da cadeia alfa 3.

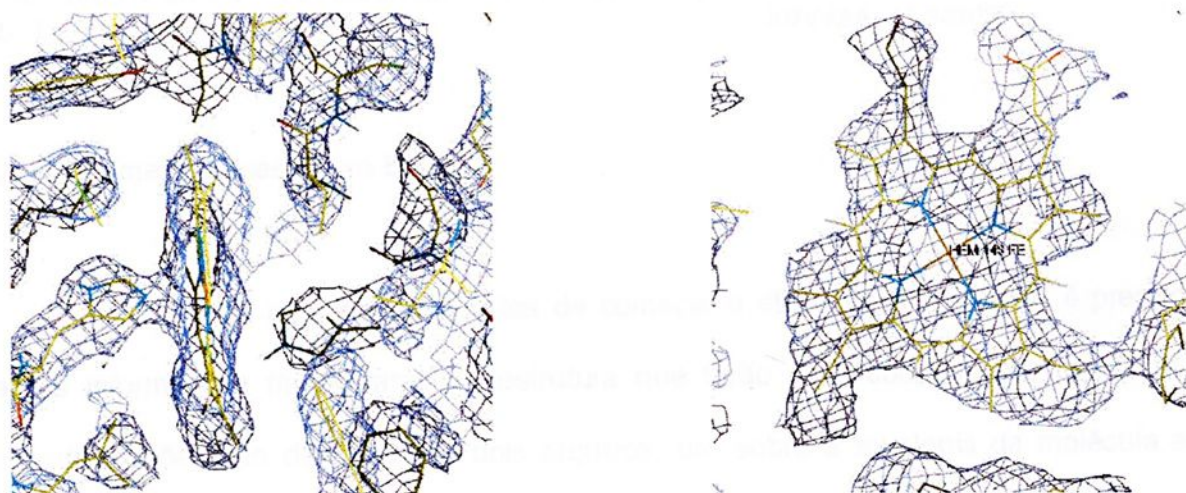


Figura 15b. Vistas frontal e lateral, do grupo heme da cadeia beta 7.

3.3. Refinamento e discussão da estrutura Bchb-I

3.3.1. Alinhamentos

3.3.1.1. Determinação dos resíduos de aminoácidos

Os resíduos listados para o Matrinxã, determinados como já citado anteriormente por degradação de Edman, foram substituídos no modelo em estudo, resíduos esses mostrados em vermelho no alinhamento abaixo. Como pode ser visto apenas 10 dos 51 resíduos determinados eram diferentes do modelo inicial a truta.

	1	11	21	31	41						
Truta	VEWTD	AEKST	ISAVW	GKVNI	DEIGPL	LALAR	VLIVYP	PWTQR	YFGSFG	NVST	
Bchb I	VE	STDAE	YSA	IS	GVW	GKVNI	DEIG	QALGR	VLIVYP	PWTQ	
	51	61	71	81	91						
Truta	PAAIM	GNPKV	AAHGK	VVCGA	LDKAV	KNMGN	ILATY	KSLS	E	THANKLF	VDP
Bchb-I											
	101	111	121	131	141						
Truta	DNFRV	LADVL	TIVIA	AKFGA	SFTPEI	QATW	QKFMK	VVVAA	MGSRY	F	
Bchb I								AVVVAA	LSSRY	F	

3.3.2. Refinamento da estrutura Bchb-I

Como já citado anteriormente antes de começar a etapa de refinamento é preciso gerar as informações moleculares da estrutura que terão suas coordenadas refinadas. Estas informações são divididas em dois arquivos, um sobre a topologia da molécula e outro sobre as informações químicas. Estes dois arquivos são gerados a partir de coordenadas em formato PDB, obtidas na substituição molecular, para então serem refinadas.

O protocolo usado para o refinamento da fração II foi repetido para a fração I. Foram realizados 40 ciclos de refinamento de corpo rígido obtendo valores de R_{fator} e R_{livre} de 38,2% e 38,8% respectivamente. O próximo passo foi a execução do

Resultados



refinamento posicional que usa os arquivos de saída do refinamento de corpo rígido. Com a aplicação de mais 120 ciclos do citado refinamento, foram obtidos valores de R_{fator} e R_{livre} iguais a 26,6% e 34,1%. Tendo o refinamento posicional convergido o próximo passo é aplicação do método de Dinâmica Molecular ou *Simulated Annealing*. Se o modelo não difere muito da estrutura real o refinamento posicional converge naturalmente para a solução correta, porém se as distâncias entre os átomos no modelo e na estrutura real diferem muito, então o refinamento pode ficar aprisionado por um mínimo local. Para sair deste mínimo local foi feito uso do método da dinâmica molecular. Aliados à dinâmica molecular, foram feitos ainda 120 passos de refinamento posicional e 15 de refinamento do fator B, obtendo após a execução dessa etapa, 23,2% e 33,0% como valores para R_{fator} e R_{livre} , respectivamente.

Como não é conhecida na íntegra a seqüência primária da fração-I da hemoglobina do *Brycon cephalus*, foi feita a substituição na cadeia β dos 51 resíduos determinados. Obtendo como resultados de R_{fator} 23,6% e R_{livre} 33,4%.

Terminada essa primeira etapa do refinamento, foi gerado um mapa de densidade eletrônica do tipo 2Fo-Fc. Através de uma análise desse mapa de densidade eletrônica pode ser observado que em alguns pontos o resíduo não se encaixava perfeitamente à densidade eletrônica, a alternativa foi comparar a seqüência usada como modelo com outras seqüências de peixes já depositadas no PDB, isso foi feito através do alinhamento dessas seqüências e utilizando o procedimento descrito por Delatorre. (Delatorre, 2000b).

Para a verificação de uma possibilidade de troca foi gerado um mapa de densidade eletrônica (*omit map*) sem a interferência do resíduo "dúvida", porém como



nenhuma das substituições resultaram em melhoria para a estrutura, foram abandonadas. A tabela 10 mostra os resíduos que passaram por estas substituições.

Tabela 10. Substituições possíveis na cadeia alfa.

Resíduo Nº	Resíduo Original	Substituições Possíveis	Resíduo Substituído	B_fator
23	Val (V)	Glu (E), Ala (A)	Ala(A)	23,38
72	Gly (G)	Lys (K), Ser (S)	Ser(S)	20,00
73	Leu (L)	Ser (S), Lys (K)	Ser(S)	29,46
86	Asp (D)	Glu (E)	Glu(E)	21,30
116	Ser (S)	Gly (G), Lys (K)	Gly(G)	19,56
117	Asp (D)	Glu (E)	Glu(E)	25,39

Usando ainda o mapa de densidade eletrônica como parâmetro para análise da qualidade do modelo proposto foi feita uma contagem das segmentações existentes nas cadeias α e β do dímero em estudo totalizando 47 quebras, sendo 4 na cadeia principal de α e 8 na de β e ainda 11 nas cadeias laterais de α e 24 nas de β , os resíduos de aminoácidos mencionados podem ser vistos na tabela 11.

Tabela 11. Resíduos que apresentaram quebra na cadeia lateral.

Cadeia Alfa	Cadeia Beta
Lys 7	Ser 4
Lys 20	Ile 54
Met 32	Asp 72
Asp 48	Asp 77
Lys 57	Lys 85
Asp 86	Thr 91
Lys 100	Lys 95
Leu 107	Phe 97
Glu 121	Arg 104
Leu 130	Glu 125
	Ser 143
	Tyr 145
	Gly 13
	Lys 65
	Lys 73
	Leu 82
	Glu 90
	His 92
	Leu 96
	Asp 101
	Lys 117
	Arg 131
	Arg 144
	Phe 146

Tendo em vista que sem a sequência total não havia mais o que fazer que pudesse resultar em aprimoramento da estrutura, foi feita a inserção das moléculas de água, usando o programa Xtalview (McRee, 1992). Para executar essa etapa um mapa tipo Fo-Fc foi gerado, através dele é possível visualizar os trechos que apresentam

densidade eletrônica não explicados, proveniente de moléculas de água ou ruídos. A princípio 300 moléculas foram inseridas e para checar a veracidade dessa inserção foi realizado um refinamento do fator térmico B, sendo excluídos valores de B superiores a $50,0\text{\AA}^2$, pois provavelmente se tratavam de ruídos. Assim chegou-se ao fim do refinamento com 150 moléculas de água e com valores de R_{fator} e R_{livre} de 22,9% e 25,7%.

3.3.3. Análise e discussão da estrutura parcial

Quando é feita a comparação dos resultados obtidos com outros apresentados (Delatorre, 2000b) onde também não se conhecia a seqüência primária percebe-se que os resultados apresentados neste trabalho podem ser considerados satisfatórios.

Um parâmetro muito usado para verificar a qualidade estereoquímica de uma estrutura é o Gráfico de Ramachandran (Figura 16), Laskowski afirma que se um modelo possui 90% de resíduos na região favorável, pode ser considerado um modelo de qualidade. Visto que o mapa apresentado neste trabalho cumpre esta exigência, e que os dois resíduos localizados na região generosamente permitida, Asn80 e Lys95, são resíduos de superfície, o que lhe confere certa mobilidade, esta pré-estrutura pode ser considerada de boa qualidade (Laskowski *et al*, 1993).

Nas figuras 17a e 17b são apresentados todos os gráficos de Ramachandran das estruturas de peixes depositadas no PDB, que foram utilizadas como modelo de busca neste trabalho, pode ser notado que apesar de ser uma estrutura parcialmente refinada não apresenta discordância quanto ao número de resíduos que se apresentam na região generosamente permitida.



No mapa de densidade eletrônica do grupo heme, apresentado na figura 18, pode ser visto que existe uma boa concordância entre a estrutura apresentada e o próprio mapa, pode ser visto ainda a densidade da molécula de água ligada ao ferro.

A figura 19 traz uma comparação entre a estrutura secundária obtida para o modelo e a estrutura secundária da hemoglobina humana, pode ser observada baixa identidade entre os resíduos dessas estruturas. Tal fato pode ser confirmado pelo coeficiente de correlação apresentado na Substituição Molecular quando esta estrutura de Hb humana foi usada como modelo. O resultado apresentado é bastante intrigante, já que o esperado para estruturas primárias diferentes é enovelamentos diferentes, mas não é o que foi visto ao compararmos as estruturas secundárias estas apresentaram um alto grau de coincidência entre as estruturas secundárias.

A figura 20 traz a sobreposição das cadeias alfa e beta das duas frações da isoproteína sobre as cadeias alfa e beta da truta, podemos ver que em ambos os casos as duas estruturas se afastam do modelo do pdb usado para a Substituição Molecular (Honda *et al* , 2000), indicando que foi possível a determinação de uma nova estrutura de hemoglobina.

A figura 21 mostra a evolução dos valores de R_{fator} e R_{livre} durante o processo de refinamento, pode ser notado que os valores de R diminuíram a cada passo do refinamento e que ao término do mesmo mostravam valores constantes, indicando que o refinamento convergiu.

Na figura 22 pode ser visto potencial eletrostático da superfície da hemoglobina, calculado pelo programa GRASP (Nichollos et al, 1991).



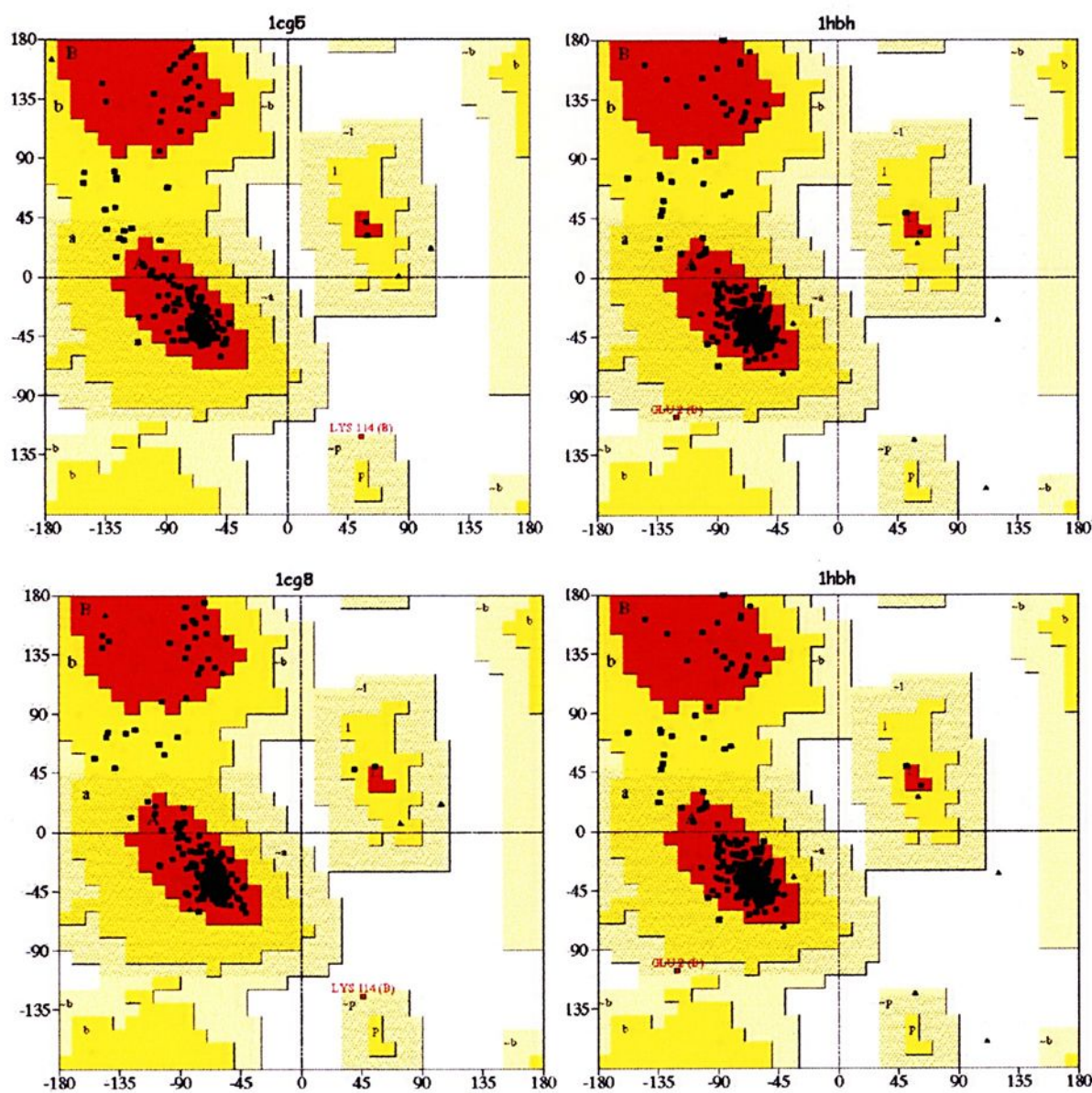


Figura 17a. Gráficos de Ramachandran de todas as estruturas de Hb de peixes depositadas no PDB.

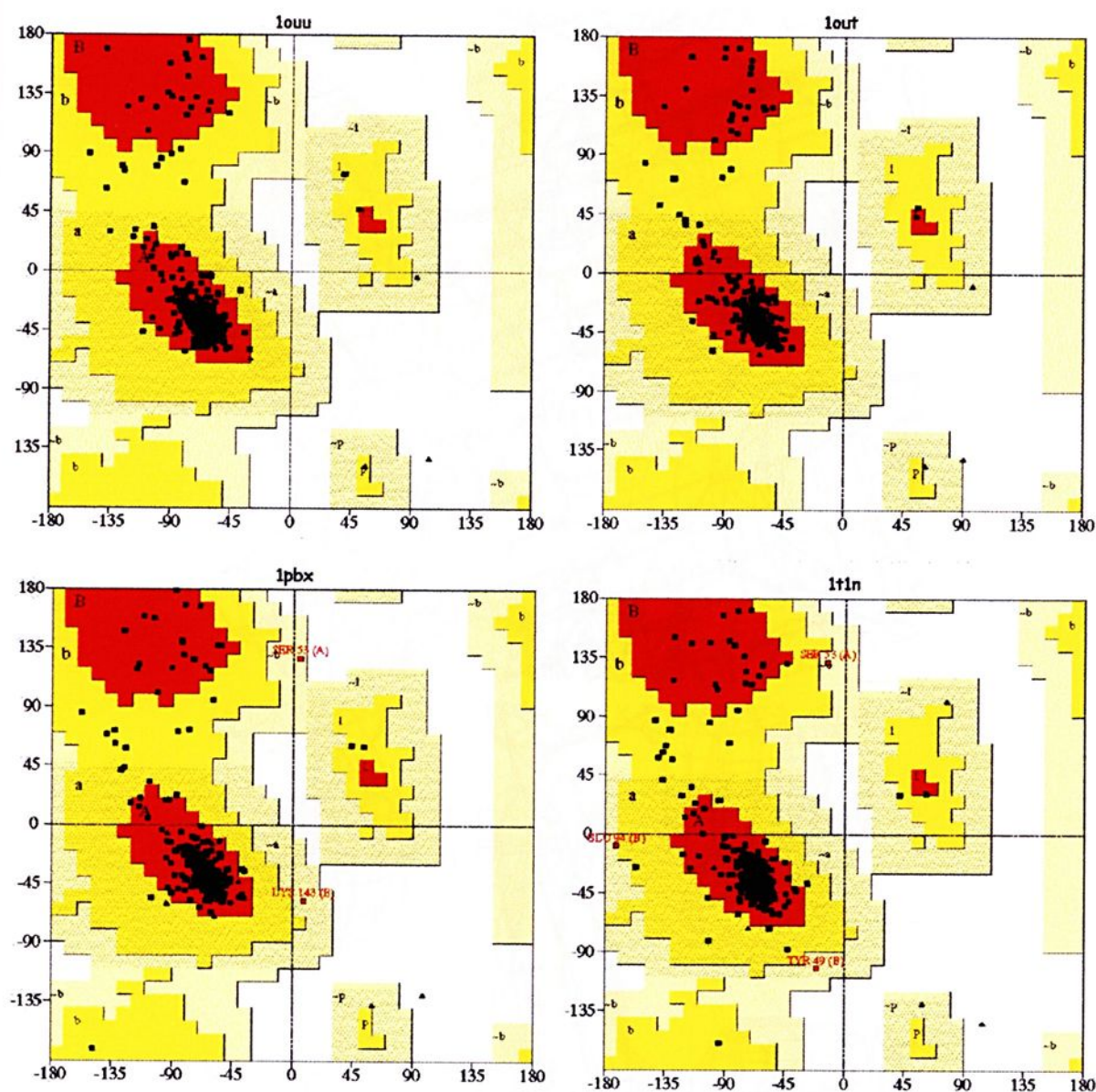


Figura 17b. Gráficos de Ramachandran de todas as estruturas de Hb de peixes depositadas no PDB.

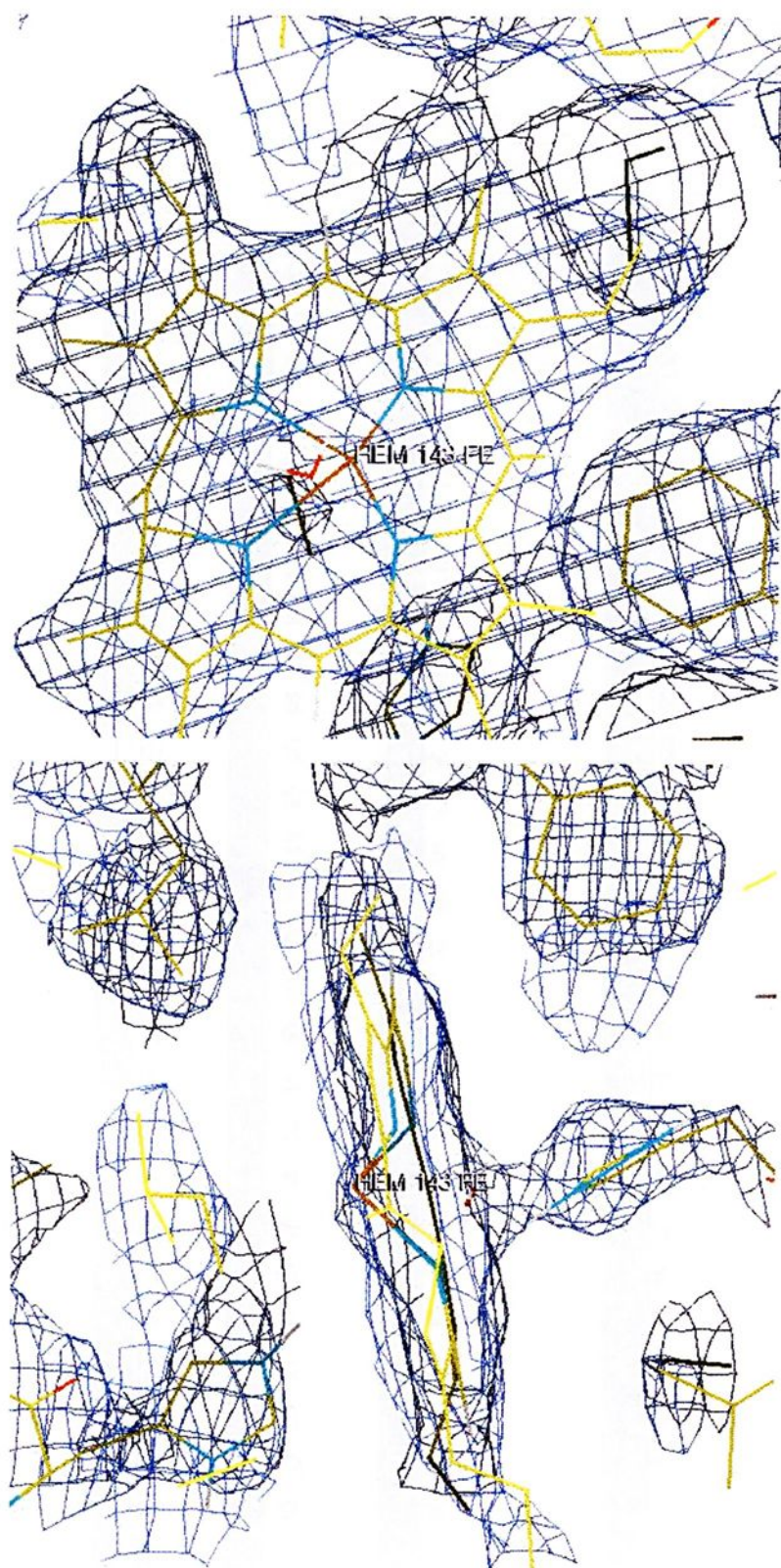


Figura 18. Vistas frontal e lateral do grupo Heme.

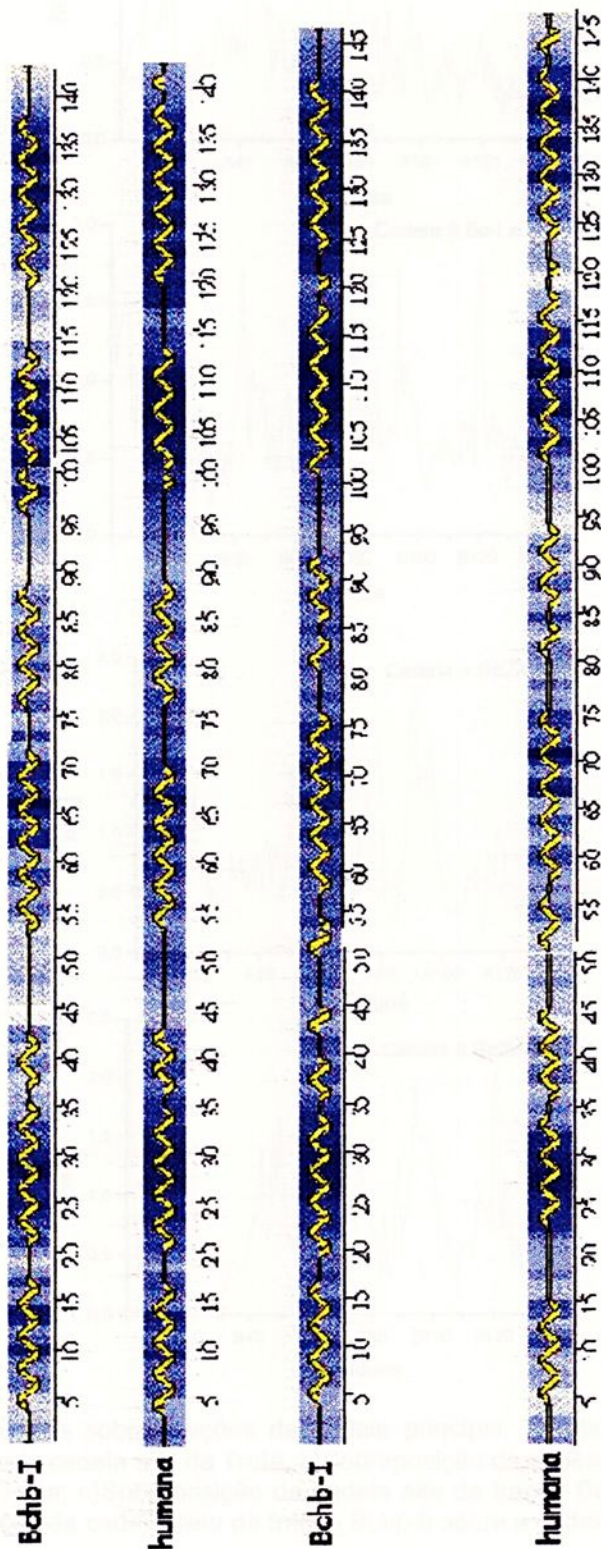


Figura 19. Comparação entre as estruturas secundárias Humana e do peixe Matrinxã.

Resultados

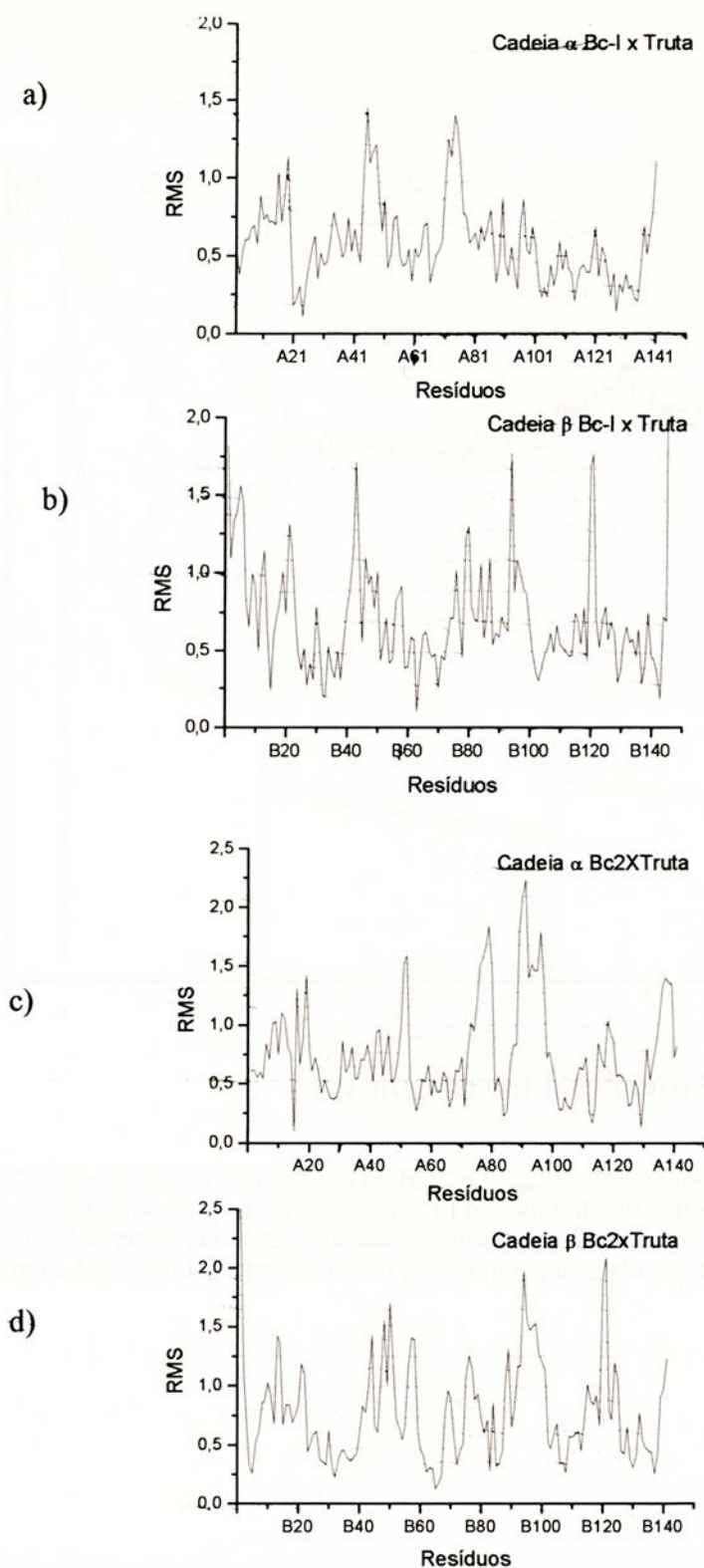
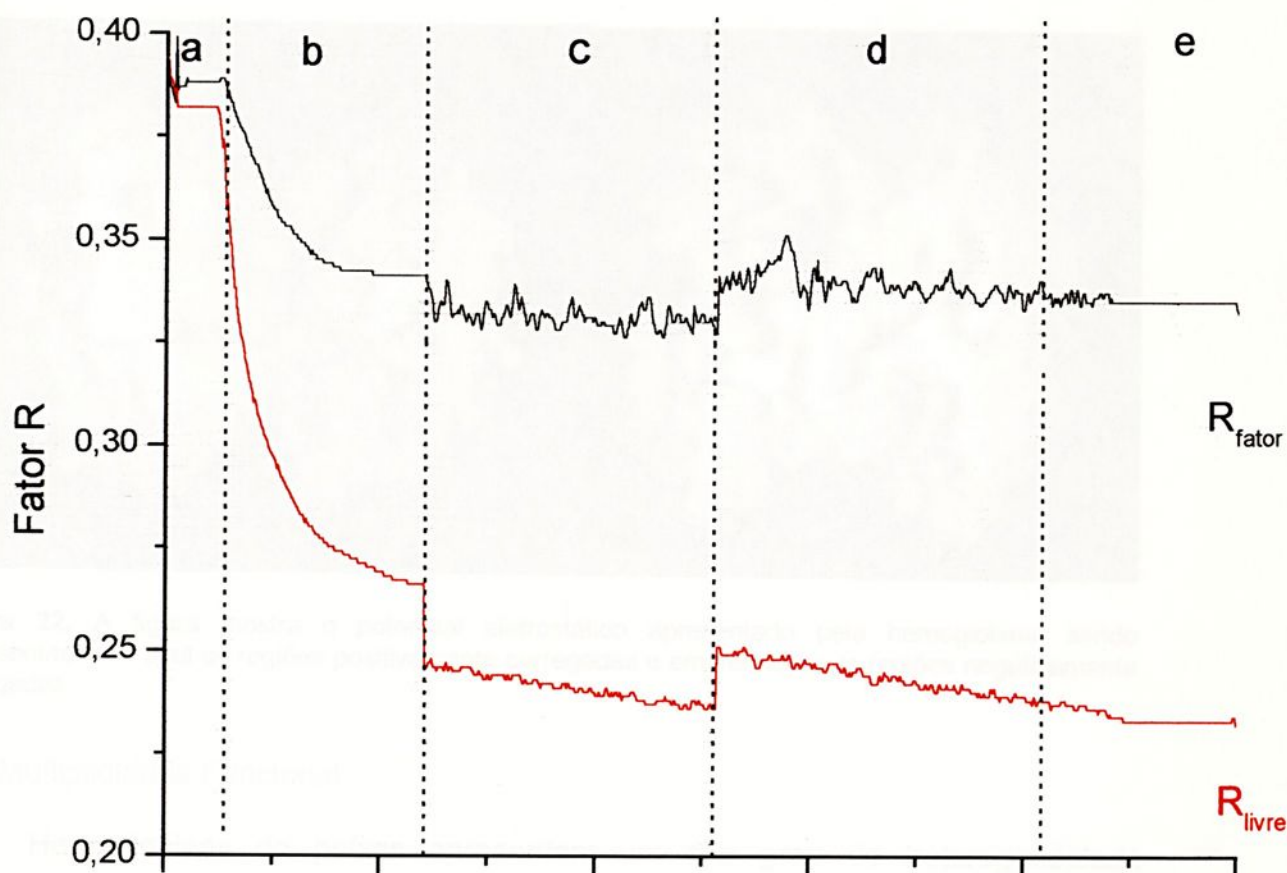


Figura 20. Gráfico das sobreposições da cadeia principal: a) Sobreposição da cadeia alfa da fração Bchb-I sobre a cadeia alfa da Truta, b) Sobreposição da cadeia beta da fração Bchb-I sobre a cadeia beta da Truta; c) Sobreposição da cadeia alfa da fração Bchb-II sobre a cadeia alfa da truta, d) Sobreposição da cadeia beta da fração Bchb-II sobre a cadeia beta da truta.

Resultados



Evolução do Refinamento

Figura 21. Desenvolvimento dos valores de R_{fator} e R_{livre} durante o processo de refinamento. Os estágios do refinamento estão assim divididos: a) refinamento de corpo rígido; b) refinamento posicional; c) refinamento *simulated annealing*, posicional e do fator B; d) refinamento posicional após a inserção dos resíduos e) refinamento posicional após inclusão das moléculas de água.

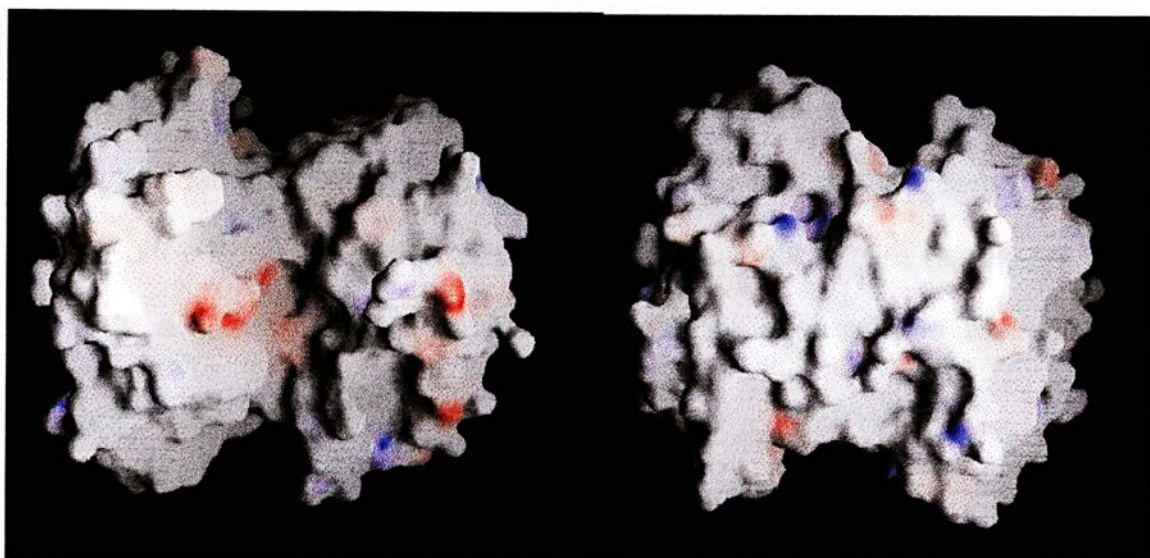


Figura 22. A figura mostra o potencial eletrostático apresentado pela hemoglobina, sendo representado em azul as regiões positivamente carregadas e em vermelho as regiões negativamente carregadas.

3.4. Multiplicidade Funcional

Hemoglobinas de peixes apresentam um alto grau de heterogeneidade funcional e estrutural. A multiplicidade das Hbs dos peixes da Amazônia é muito maior que a das espécies Antárticas, já que esta última sofre uma variação menor de oxigênio e de temperatura, o que sugere que a multiplicidade é adaptativa. (Fyhn, 1979; Wells, 1980; Wilhelm & Reischl, 1981).

As componentes eletroforéticas anódicas (classe I) e as catódicas (classe II) são encontradas em toda as espécies. Sendo que as catódicas apresentam alta afinidade por oxigênio e baixa dependência pelo pH, podendo ser empregadas como transportadores de oxigênio, além de serem capazes de armazenar o citado gás em períodos de redução de oxigênio e/ou acidose, quando os componentes anódicos são incapazes de fazê-lo. A fração-I da hemoglobina estudada apresenta comportamento de Hb catódica, que pode ser caracterizada experimentalmente por

Resultados

apresentar efeito Bohr reverso, como pode ser confirmado na tabela 12, mostrada a seguir:

Já a Bchb-II, foi classificada como eletroforeticamente anódica (classe II) por apresentar afinidade por oxigênio relativamente baixa e pronunciada sensibilidade ao pH (efeito Bohr e Root). Os dados que confirmam essas afirmações podem ser vistos na tabela 13 e fazem parte do trabalho de Mestrado desenvolvido pelo aluno de Rubens T. Honda (Honda, 2001).

Tabela 12. Dados experimentais apresentados pela Bchb-I.

Stripped		ATP	
pH	p50 (mmHg)	pH	p50 (mmHg)
6,5	1,8	6,5	2,3
7,5	2,3	7,5	2,8

Tabela 13. Dados experimentais apresentados pela Bchb-II.

Stripped		ATP	
pH	p50 (mmHg)	pH	p50 (mmHg)
6,5	12,6	6,5	17,8
7,5	1,0	7,5	4,0



CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO

Conclusão



4. Conclusão

O presente trabalho apresenta dados de cristalização, substituição molecular e refinamento parcial da fração II da hemoglobina do peixe *Brycon cephalus* e ainda um refinamento mais aprofundado da fração I do mesmo peixe.

Quando são analisados os valores de R_{fator} e R_{livre} apresentados para a fração II, é observado que os dados são passíveis de convergir a uma boa estrutura, mesmo tratando-se de dados à baixa resolução e sem a sequência primária.

Os resultados apresentados pela fração I, apesar de serem preliminares e também não ter conhecida sua sequência primária, podem ser considerados bons, se for usada como ferramenta para medir a qualidade do modelo, o gráfico de Ramachandran. Se os resultados apresentados possuírem mapas com 90% dos resíduos em regiões mais favoráveis, podem ser assim considerados.

Os resultados preliminares podem ser considerados um importante passo na determinação do modelo final, pois funcionam como indicativo de que tais estruturas são refináveis. E, posteriormente, com os modelos finais dessas estruturas em mãos, espera-se poder atingir o objetivo de todo trabalho cristalográfico, que é o estudo comparativo de estruturas e funções, visto que ambos estão intrinsecamente ligados.

Conclusão



Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. ALTSCHUL, S. F. *et al.* *J Mol Biol.*, 1990. 403-410p. 215(3) v.
2. BLUNDELL, T. L. & JOHSON, L. N. *Protein Crystallography*. Editora Academic Press, 1976. 1-81, 107-149.
3. BRITTAI, T. Physiol. The Root Effect. *Comp. Biochem.*, 86Bv., 473-481p., 1987.
4. BRÜNGER, A. T., Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by Simulated Annealing, *Acta Cryst. A*, 1990, 46v., 46-57p..
5. BRÜNGER, A. T., X-PLOR Version 3.1 Manual. Yale Univ., USA, 1992.
6. BRUNORI, M. Molecular adaptations to physiological requirements: The hemoglobin system of trout. *Curr. Top. Cell. Reg.* 1975.9v..1-39p.
7. BRUNORI, M., *et al.*, Hemoglobins from trout. Structural and functional properties. *Mol Cell Biochem.* 1973.1v., 189-196p..
8. COLOMBO, M.B.R., Efeito DE água no potencial de Óxido-Redução de Hemoglobina Humana e Mioglobina Equina. 1996. 155f..Dissertação (Mestrado em Física, área de concentração – Biofísica Molecular). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
9. DELATORRE, P. *et al.* Crystallographic Studies of fish hemoglobin, *Ecl. Quím.*, São Paulo, 2000a, 25v., 147-159p..
10. DELATORRE, P., Análise Cristalográfica Preliminar das Hemoglobinas do (Peixe) *Liposarcus anisitsi*. 2000. 185f..Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular área de concentração Biofísica Molecular) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
11. DELATORRE, P., FADEL, V. E DE AZEVEDO, W. F. JR. - Simulação de densidade eletrônica de cristais unidimensionais e bidimensionais. *Revista Brasileira de Ensino de Física*. 23(1) v., 63-73p.
12. DI PRISCO, G. & TAMBURRINI, M. The hemoglobins of marine and freshwater fish. The search for correlations with physiological adaptation. *Comparative Physiology*, 1991, 102Bv., 661-671p..
13. DRENTH, J. *Principles of protein X-ray crystallography*. Editora Springer-Verlag. 1994.1-181, 211-230, 242-263p..



14. DUCRUIX, A. & GIEGÉ, R., "Crystallization of Nucleic Acids and Proteins (A Practical Approach)", 2 ed., Oxford University Press, 1999, 121-146p..
15. FARBER, J. E. RAHN, H. Gas exchange between air and water and the ventilation pattern in the electric. *Respir Physiol.* 1970, 9v., 151-161p..
16. FYHN, U.H.E. *et al.*, Hemoglobin heterogeneity in Amazon fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 62A v., 39-66p.. 1979.
17. Garret, R.H. & Grisham, C.M., *Biochemistry*, Editora Saunders College Publishing, 1 ed., 1995, 1-181, 211-230, 242-263p..
18. GIACOVAZZO, C., *et al.*, lucr texts on crystallography- "Fundamentals of Crystallography". Oxford Science Publications, 1992. 563-572p..
19. GILLEN, R.G. AND RIGGS, A. Structure and function of the isolated hemoglobin of carp, *Cyprinus carpio*, *J. Biol. Chem.*, 247v., 6039-6046p., 1972.
20. HONDA RT, *et al.* Crystallization, preliminary X-ray analysis and molecular-replacement solution of the carboxy form of haemoglobin I from the fish *Brycon cephalus*. *Acta Crystallogr D* 2000, 56v., 1685-1687p..
21. HONDA, R. T., Estudo estrutural e funcional da hemoglobina I do Matrinxã (*Brycon cephalus*). 2001, 115p. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
22. JANCARIK, J. AND KIM, S.H., Sparse ,matrix sampling : a screening method for organization of proteins. *J. App. Cryst.* 1991, 24v., 409-411p..
23. LASKOWSKI, R.A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of proteins structures. *J. App. Cryst.* 1993, 26v., 283p..
24. LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M., *Princípios de Bioquímica*. 2ed., Editora Edgard Blucher , 1976, 2v., 131-140p..
25. MARTIN, A.C.R., *Scitech Software*. ProFit vol. 1.8, 1992.



26. MCREE, D.E., Practical Protein Crystallography. Academic Press, Inc. San Diego, USA, 1994, p..
27. NAVAZA, J., AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica A*, 1994, 50v., 157-163p..
28. NICHOLS, A., SHARP, K., HONING, B., Graphical representation and analyses of surface properties, Editora Columbia University-USA, 1991, 11v., 281p..
29. OTWINOWSKI, Z. In Proceedings of the CCP4 Study Weekend, editado por L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey, Warrington: Daresbury Laboratory, 1993, 56-62p..
30. POLIKARPOV, I., OLIVA, G., Castellano, E.E., Garrat, R., Arruda, P., Leite, A., Craveich, A., *Nucl. Instrum. Methods A*, 1998, 405v., 159-164p..
31. POLIKARPOV, I. *et al*, Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at brazilian national synchrotrons laboratory *J. Synchrotron Rad.*, 1998, 5v., 72-76p..
32. RIGGS, A. Properties of fish hemoglobins. In Fish Physiology (Edited by Hoar, W.S. and Randall D.J.), 1970, IVv., 209-252p. *Academic Press*, New York.
33. ROSSI_FANELLI & ANTONINI Oxygen equilibrium of hemoglobin from South American lungfish (*Lepidosiren paradoxus*, Dipnoi). *Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem.* 1960, 365v., 95-104p..
34. ROSSMANN, M. G. The Molecular Replacement Method. *Acta Cryst. A* 1990, 46v., 73-82p., 1990.
35. STRYER, L., *Bioquímica*, 4 ed., Editora Guanabara Koogan, 1996, 137-141p..
36. VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F., RANDALL, D.J., Physiology and Biochemistry of the Amazon, Manaus, 1996, 59-73p..
37. VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F., Adaptive features of amazon fishes. Hemoglobins of Brycon cf cephalus and Brycon cf erythropterum (Pisces) *Rev. Brasil. Genet.* 1998, 11v., 27-39p..
38. VOET, D., VOET, J.G., CHARLOTTE, W., *Fundamentos de Bioquímica* Editora Artmed 1990, 211-241p..



39. WEBER R.E., *et al.* The hemoglobin system of the primitive fish, *Amia calva*: isolation and functional characterization of the individual hemoglobin components. *Biochem. Biophys. Acta*, 1976, 434v., 18-31p..



APÊNDICES



APÊNDICE A

A. Cristalização de Macromoléculas Biológicas (Ducruix & Glegê, 1999)

A.1. Introdução

O principal objetivo da cristalização de uma macromolécula biológica é o estudo estrutural dessa por métodos de difração de raios X. Tal estudo estrutural é fundamental para o entendimento molecular de vários mecanismos biológicos.

Os cristais de macromoléculas biológicas são diferentes dos cristais de pequenas moléculas em vários aspectos. Eles diferem em tamanho, fragilidade e dimensão de suas celas unitárias. Cristais de macromoléculas são normalmente bem menores, dificilmente excedem 1mm^3 em volume. São bem mais frágeis por possuírem um alto conteúdo de solvente (de 20% a mais de 80%) e também devido às fracas interações entre as macromoléculas biológicas dentro da rede cristalina, as ligações fracas que mantêm a estrutura cristalina dessas macromoléculas biológicas são hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, por esta razão, os cristais de macromoléculas biológicas devem ser mantidos em um ambiente saturado de solvente, caso contrário, a desidratação conduzirá à quebra destas ligações fracas e, conseqüentemente a destruição dos cristais. A última característica dos cristais de macromoléculas biológicas a ser comentada é a grande dimensão de suas celas unitárias, quando comparadas com as dimensões das celas unitárias das pequenas moléculas, cristais de macromoléculas biológicas podem ter parâmetros de cela unitária de até algumas dezenas de milhares de ângstrons (Usha., *et al*, 1984).



A.2. Princípios gerais para cristalização de macromoléculas biológicas

Uma das partes mais críticas na resolução da estrutura de uma macromolécula biológica é a sua cristalização. Dentre todos os passos que estão envolvidos na resolução de uma estrutura a cristalização é o menos entendido, uma vez que é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve os três passos clássicos da cristalização, que são: nucleação, crescimento e cessação de crescimento. O que faz com que o processo de cristalização de macromoléculas biológicas seja diferente é que o processo envolve um número de parâmetros (alguns podem ser vistos na seção A.7.2), muito maior do que aqueles envolvidos no crescimento de cristais de pequenas moléculas, além das propriedades físico-químicas peculiares destes compostos. Por exemplo, a estabilidade ótima das macromoléculas biológicas em um meio aquoso está restrita a uma faixa estreita de pH. Mas a principal diferença entre crescimento de cristais de pequenas moléculas e cristais de macromoléculas biológicas é a flexibilidade conformacional e a versatilidade química dessas macromoléculas e, conseqüentemente, sua maior sensibilidade às condições externas.

Para um planejamento racional das condições de cristalização é necessário o controle dos parâmetros físicos e biológicos. A seguir descreveremos três dos principais parâmetros a serem controlados num experimento de cristalização de uma macromolécula biológica.

A.2.1. Pureza da macromolécula biológica

Devido ao fato que as macromoléculas são extraídas de complexas misturas biológicas, a purificação é um passo importante para a cristalogênese. Pureza,



entretanto, não é uma condição primordial para a cristalização, visto que, cristais de macromoléculas biológicas podem algumas vezes ser obtidos de misturas dessas substâncias, onde temos uma ou mais macromoléculas biológicas diferentes atuando como contaminante. Mas, tais cristais, são na maioria das vezes bem pequenos, ou então, crescem como massas policristalinas (figura 23), que não são adequadas para estudos cristalográficos por difração de raios X. Para o uso de técnicas de difração de raios X é necessário o uso de cristais de menor dimensão por volta de 0,2mm, contudo com uso de fontes de raios X bem intensa, tais com síncrotrons, tem sido possível a resolução de estruturas de macromoléculas biológicas cujos cristais apresentavam dimensões menores que 0.1mm. Como regra geral pode-se dizer que a baixa pureza da macromolécula biológica é a causa mais comum da falta de sucesso na cristalização da mesma.



Figura 23. Cristal crescido como massa policristalina.

A.2.2. Estabilização e armazenagem

Macromoléculas biológicas devem ser armazenadas em solução que possua propriedades próximas as do meio celular de onde foram retiradas, para que sua conformação seja mantida. Armazenagem sob condições impróprias danifica o material, que é "precioso" e de obtenção trabalhosa e demorada. Recomenda-se o uso de um tampão cujo pK seja pouco afetado pela temperatura, para evitar variações bruscas de pH, quando houver a necessidade de armazenagem de amostras congeladas ou mesmo a temperatura ambiente (Stoll *et al* 1990).

Macromoléculas propensas à agregação requerem uma força iônica mínima para ficar solubilizadas, mas nem todos os íons são compatíveis com sua estrutura nativa ou sua atividade.

A desnaturação é minimizada se forem evitadas condições extremas de pH e temperatura, assim como o contato com solventes orgânicos ou oxidantes (Yang *et al*, 1993 & Darby *et al*, 1989). A estrutura e a solubilidade de proteínas globulares dependem das pontes de hidrogênio intramoleculares. A formação de gelo durante o armazenamento sob baixas temperaturas induz a uma desnaturação parcial. Não se deve congelar ou liofilizar macromoléculas desprotegidas. A estabilização de proteínas pode ser feita mantendo-as em altas concentrações de glicerol ou liquefazendo-as sob baixas temperaturas (Sousa *et al*, 1995). Agentes bactericidas e fungicidas podem ser adicionados para a armazenagem ou para sua cristalização. Amostras purificadas exigem um cuidado especial no armazenamento para evitar deterioração ou perda de suas características.



A.2.3. Nucleação, crescimento e cessação de crescimento

Devido ao fato que proteínas e ácidos nucléicos necessitem de pH e força iônica definidas para a sua estabilidade e função, cristais de macromoléculas biológicas devem ser crescidos a partir de soluções aquosas complexas. A cristalização começa com a fase de nucleação (i.e. a formação dos primeiros agregados ordenados) que é seguida pela fase de crescimento. As condições para se atingir a nucleação são algumas vezes difíceis de se repetir, e desta forma os procedimentos de semeadura (*seeding*) com um material cristalino pré-formado se fazem necessários. Em muitos casos este é o único método para se obter resultados reprodutíveis. A nucleação requer um estado de supersaturação maior do que aquele da fase de crescimento. A velocidade da cristalização aumenta com a supersaturação, desta forma nucleação e crescimento deveriam ser desacoplados, o que quase nunca é realizado conscientemente.

A cessação de crescimento de uma macromolécula biológica pode ter diversas causas, desconsiderando as triviais, como remoção da macromolécula do meio de cristalização, temos causas tais como, defeitos de crescimento, envenenamento das faces, ou envelhecimento da macromolécula.

A.3. Conceitos sobre solubilidade

Uma macromolécula biológica segue as mesmas leis da termodinâmica, como qualquer outro tipo de molécula (inorgânica ou orgânicas) no que se refere à supersaturação, nucleação, e crescimento de cristais (Boistelle & Astier, 1988). Todavia, macromoléculas biológicas apresentam peculiaridades, porque as interações necessárias para solubilizá-las num solvente são similares, e podem ser

Apêndice A



competitivas com as interações intermoleculares que são responsáveis pela estrutura tridimensional da macromolécula.

A solubilidade de macromoléculas biológicas é definida também pelas características do solvente. Como o solvente consiste usualmente de água pura ou um tampão adequado no qual são controlados fatores como pH e força iônica (sais), eventualmente estes compostos podem afetar a solubilidade da macromolécula biológica.

Proteínas podem ser consideradas como polieletrólitos capazes de se dissolverem em água por apresentarem as cadeias laterais hidrofóbicas preferencialmente no seu interior, enquanto as cadeias laterais hidrofílicas se localizam principalmente na sua superfície. Desta forma as proteínas.

A estabilidade das macromoléculas biológicas em solução baseia-se na competição das interações solvente-soluto com interações intramoleculares as quais são necessárias para manter a estrutura da macromolécula. O balanço das interações que controlam a solubilidade e/ou a conformação de uma macromolécula podem ser modificadas por (von Hippel & Schleich, 1969):

- (a) Temperatura. Um aumento da temperatura aumenta a desordem das moléculas de solvente e permite também que conformações da macromolécula de mais alta energia livre total se formem.
- (b) pH. Como a temperatura, variações no pH afetam ambos soluto e solvente. Todavia, alterações das concentrações de H^+ e OH^- são minoritárias se comparadas com a protonação e desprotonação de grupos da macromolécula.
- (c) Sais. Sais podem agir de diferentes formas. (i) Eles são responsáveis pela força iônica, e desta forma afetam as interações eletrostáticas da macromolécula por



meio de blindagem de cargas. (ii) Eles podem formar interações eletrostáticas diretas com resíduos carregados na superfície das macromoléculas. (iii) Sais podem agir através de interações monopolo-dipolo com grupos dipolares da macromolécula biológica.

- (d) Competidores de ligações de hidrogênio. Moléculas que possuem um potencial para formarem ligações de hidrogênio competem à alta concentração ($>4M$) com ligações de hidrogênio da água e ligações de hidrogênio intramoleculares na proteína.
- (e) Aditivos hidrofóbicos. Eles podem agir diretamente com partes hidrofóbicas da macromolécula e podem também alterar a estrutura do solvente. Detergentes não-iônicos agem desta forma (McPherson, *et al.*, 1986).
- (f) Solventes orgânicos. A adição de solventes orgânicos implica na modificação da constante dielétrica e conseqüentemente variações em diversas interações.

A.4. *Salting-in* e *Salting-out*

A dependência da solubilidade da proteína com a concentração salina foi estudada em termos dos fenômenos de *salting-in* e *salting-out* (Green, 1932). O aumento da solubilidade de uma macromolécula biológica a baixa concentração salina ($<0,5M$) é chamada *salting-in*. Este fenômeno é explicado pelas interações eletrostáticas não específicas entre a macromolécula carregada e as espécies iônicas do sal. Segundo a teoria de Debye-Hückel para soluções iônicas, um aumento na força iônica reduz a atividade dos íons em solução e aumenta a solubilidade do composto iônico. Uma forma alternativa de se tratar este fenômeno é considerar o *salting-in* como o resultado da competição entre grupos carregados na



superfície da macromolécula e os íons em solução. Na ausência de íons de solvente a macromolécula precipita devido à atração de Coulomb entre cargas opostas em diferentes partes da macromolécula. Se os íons são adicionados à solução eles blindam os grupos carregados na macromolécula e aumentam a sua solubilidade (figura 24).

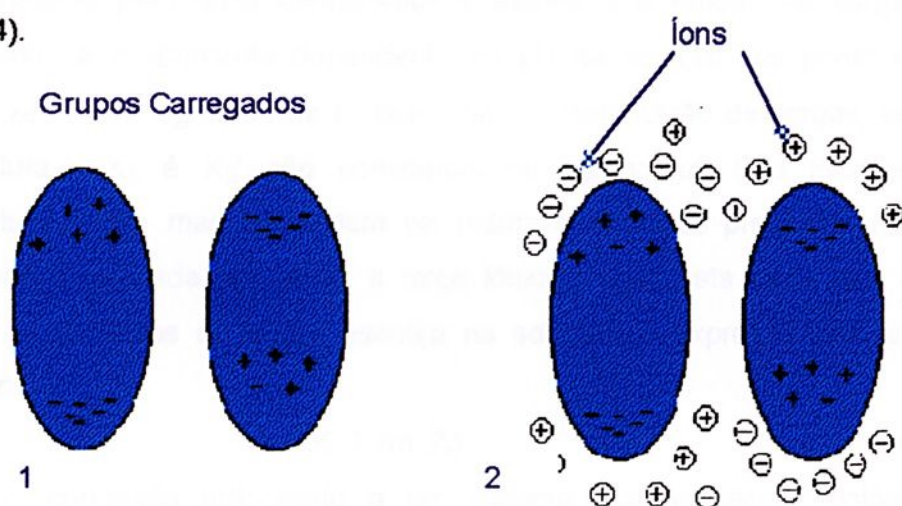


Figura 23. Representação de Macromolécula sem íons dissolvidos (1) e com íons dissolvidos(2), mostrando o efeito dos íons na sua solubilidade.

Na figura 24.1) a macromolécula biológica sem íons dissolvidos na solução, mostra que a atração eletrostática entre dois ou mais grupos carregados causa a aglomeração e precipitação, enquanto que na figura 24.2) pode ser visto que a adição de íons em solução blinda a interação eletrostática entre as macromoléculas, aumentando sua solubilidade.

Outra forma de precipitar uma macromolécula é pela adição de sal (*salting-out*), este serve para imobilizar as moléculas de água, desta forma aumentando a concentração efetiva da macromolécula, ou seja, diminuindo a sua solubilidade. No fenômeno de *salting-out* a solubilidade da macromolécula biológica é governada principalmente por efeitos hidrofóbicos. De acordo com a equação linear empírica de

Cohn-Green a concentração da macromolécula numa situação de *salting-out* decresce da seguinte forma:

$$\log S = \beta - K_S m, \text{ ou } \log S = \beta - K_S' \mu \quad \text{A.1}$$

sendo S é a solubilidade da macromolécula biológica, β o intercepto para $m=0$, é uma constante para altas concentrações salinas e é função da carga líquida da macromolécula e altamente dependente do pH da solução (no ponto isoelétrico, β tende a zero). A magnitude de β , bem como a distribuição de cargas, variam com a temperatura. K_S é K_S' são constantes de *salting-out*. São independentes da temperatura e pH, mas dependem da natureza dos sais presentes na solução. A molaridade é indicada por m . E a força iônica por μ , esta força leva em conta a valência Z_i de todos os íons presentes na solução. A expressão da força iônica é dada por:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum (m_i Z_i^2). \quad \text{A.2}$$

Um composto adicionado a um sistema macromolécula biológica + água (soluto+solvente) pode se ligar à macromolécula (ligação preferencial) ou ser excluído (exclusão preferencial).

A variação da solubilidade das macromoléculas biológicas (S) na faixa completa de concentração salina reflete o efeito de ambas interações, eletrostática e hidrofóbica, a primeira sendo predominante a baixas concentrações salinas e a segunda a altas concentrações salinas como mostrado na figura 25. Isto é expresso pela seguinte equação (Green, 1932):

$$\log S = \log S_0 + k_i C^{1/2} - k_o C, \quad \text{A.3}$$

sendo k_i e k_o são as constantes de *salting-in* e *salting-out* respectivamente; S_0 é a solubilidade da macromolécula biológica em água pura; e C a concentração molar salina.



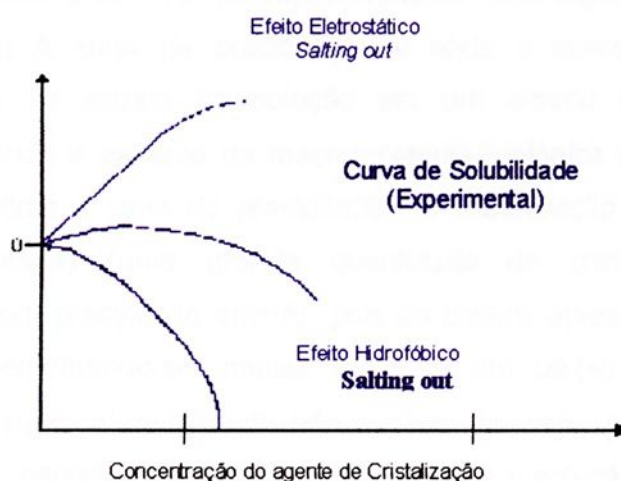


Figura 25. Contribuição dos efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos sobre a solubilidade S_1 normalizada em relação à solubilidade da água pura S_0 .

A.5. Diagramas de fase de macromoléculas biológicas

Como a solubilidade de uma macromolécula biológica depende de diversos parâmetros, um diagrama bidimensional é uma representação desta solubilidade (mg/ml ou mM de macromolécula em solução) como função de um parâmetro, com todos outros sendo mantidos constantes. Um diagrama deste tipo está representado na figura 25, e compreende as seguintes zonas:

- A curva de solubilidade (S) separa as zonas supersaturadas e hiposaturadas. Em um experimento onde as concentrações do agente de cristalização e da macromolécula biológica correspondem às condições da curva S , a solução saturada da macromolécula está em equilíbrio com a macromolécula cristalizada. Isto corresponde à situação ao final do processo de crescimento do cristal a partir de uma solução supersaturada, ou da dissolução de cristais em uma solução hiposaturada.
- Abaixo da curva de solubilidade (S) a solução está hiposaturada e a macromolécula biológica nunca irá cristalizar, visto que as condições termodinâmicas estão estáveis.
- Acima da curva de solubilidade (S), a concentração da macromolécula biológica é maior que a concentração no equilíbrio para uma dada concentração salina. Isto corresponde a uma zona de supersaturação. Dependendo da cinética para se

atingir o equilíbrio e do nível de supersaturação, esta região pode ser dividida em três zonas: (i) A zona de precipitação é onde o excesso de macromolécula imediatamente se separa da solução em um estado amorfo. (ii) A zona de nucleação é onde o excesso da macromolécula biológica se separa sob a forma cristalina. Próxima à zona de precipitação, a cristalização pode ocorrer com um "chuveiro" (*shower*) (uma grande quantidade de cristais) que podem ser confundidos com precipitado amorfo, pois os cristais apresentam dimensões bem reduzidas assemelhando-se, muitas vezes, a um pó. (iii) Na zona metaestável uma solução supersaturada pode não nuclear, ou seja, pode não gerar cristais, por um longo período de tempo, a menos que a solução seja mecanicamente perturbada ou uma semente (um pequeno cristal) seja introduzida, processo conhecido como semeadura (*seeding*). Classicamente este processo se divide em macrossemeadura (*macroseeding*), onde um cristal de dimensões "macroscópicas" é introduzido à uma solução na zona metaestável, e microsemeadura (*microseeding*), onde normalmente vários cristais bem pequenos são inseridos numa solução na zona metaestável, contudo esta diferenciação entre macro e micro é um tanto arbitrária, sendo que o principal é que se tem uma ou mais sementes inseridas numa solução com a macromolécula biológica na zona metaestável. Esta zona corresponde, idealmente, ao crescimento de cristais sem a nucleação de novos cristais.

Uma solução saturada contém uma quantidade de soluto tal que não pode haver crescimento ou dissolução se cristais são adicionados à solução, ou seja, qualquer ponto sobre a curva (S) no diagrama de fases esquemático mostrado na figura 3. Isto corresponde ao equilíbrio termodinâmico entre as duas fases (líquido e sólido). O potencial químico (μ) de cada espécie química, isto é, a mesma em ambas as fases (cristal e solução):

$$\mu_{ic} = \mu_{is} = \mu_{i0} + RT \ln \gamma c_i \quad (4)$$

sendo μ_{i0} é o potencial químico padrão, γ é o coeficiente de atividade, e c_i a concentração da espécie química i . Isto é verdadeiro para qualquer espécie química (macromolécula, água etc). A supersaturação é alcançada quando o potencial químico do soluto em solução é maior que o do cristal. Isto pode ser atingido através



da variação de alguns dos parâmetros que afetam a solubilidade. A supersaturação é a força motriz para a cristalização; e é definida como a diferença do potencial químico entre a solução e o cristal. Entretanto, as aproximações mais comuns são as relações c/c_s e $(c-c_s)/c_s$ onde c é a concentração da proteína e c_s a concentração do soluto em uma solução saturada, ou seja, um ponto sobre a curva de solubilidade(S) da figura 26. Estas quantidades têm a vantagem de serem adimensionais. Deve-se notar que o valor da supersaturação (definido como a relação entre a concentração de macromolécula biológica c e a solubilidade c_s) realmente encontrada nos experimentos de cristalização de macromoléculas biológicas fica na faixa de 2 a 10. Esta faixa é bem mais alta que aquela encontrada para crescimento de cristais de pequenas moléculas.

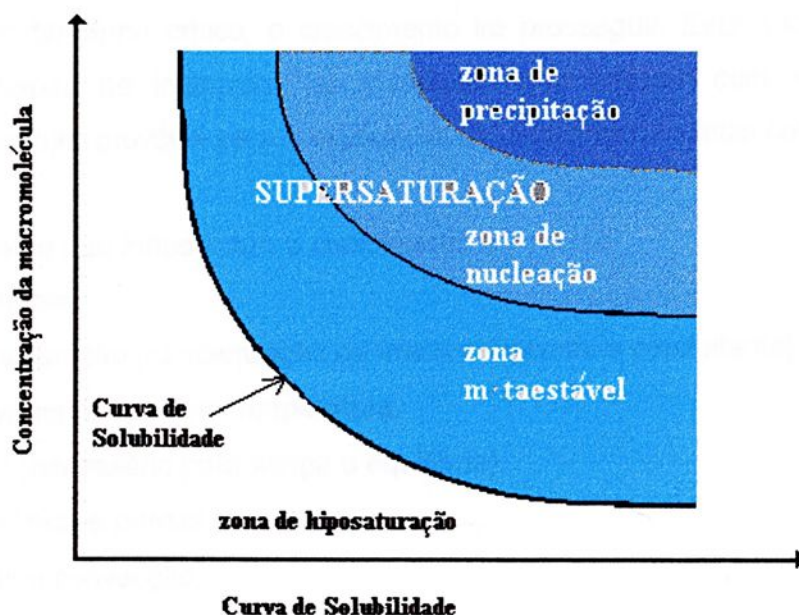


Figura 26. Descrição esquemática de um diagrama bidimensional da solubilidade de uma macromolécula biológica.

A.6. Mecanismos de crescimento de cristais (Ducruix & Giegé, 1992b)

Na teoria de crescimento de cristais se divide o processo de crescimento tradicionalmente em dois passos:

- transferência de massa da solução para a interface cristal/solução;
- inclusão da molécula no cristal (cinética da interface).

A transferência de massa é governada pela difusão e convecção devido ao gradiente de densidade ou agitação (se existir). A inclusão das moléculas na rede pode ser atribuída a diversos mecanismos (Arend & Hulliger, 1989a). Dois deles, muito detalhados do ponto de vista teórico, são brevemente descritos aqui, e parecem ser relevantes no crescimento de macromoléculas biológicas. Um se refere ao crescimento de um cristal perfeito e o segundo ao crescimento em espiral.

A.6.1. Nucleação bidimensional

No caso de uma face de um cristal perfeito, uma molécula se movendo na direção da superfície tem pouca chance de ser anexada à rede cristalina, devido ao baixo número de ligações que podem ser estabelecidas. Uma vez que as moléculas tenham formado um aglomerado bidimensional (núcleo) sobre uma superfície que excede um tamanho crítico, o crescimento irá prosseguir. Este núcleo bidimensional é então capaz de incorporar as moléculas que colidem com a superfície. Este modelo é o mais provável para a explicação do crescimento a altas concentrações.

A.6.2. Fatores que influenciam o crescimento de cristais

Físico-químicos:

- Supersaturação (concentração de macromoléculas e precipitante).
- Flutuações no pH e na temperatura.
- Tempo (necessário para atingir o equilíbrio).
- Força iônica e pureza dos reagentes.
- Difusão e convecção.
- Volume e geometria da amostra.
- Efeitos da densidade e viscosidade (diferenças entre o cristal e líquido-mãe).

Biológicos:

- Dificuldade de obtenção da maioria das moléculas biológicas.
- Contaminação por bactérias.
- Fontes biológicas e estado fisiológico de organismos ou células.



A.7. Técnicas de cristalização de macromoléculas biológicas

Como já foi citada anteriormente, a obtenção de um bom cristal não é tarefa fácil, e determinar a condição ótima de cristalização é um trabalho de tentativa e erro que pode seguir algumas etapas básicas:

- a) Certificação da pureza da proteína (fazer, se necessário, uma purificação adicional).
- b) Determinação da condição de cristalização (tampão e precipitante adequados).
- c) Otimização dessa condição (é feita variando um dos parâmetros e mantendo os demais fixos).

Algumas das técnicas mais utilizadas na obtenção de cristais podem ser vistas detalhadamente a abaixo.

A.7.1. Cristalização em Batch

Este é o método mais antigo e também mais simples para cristalização de proteínas, onde a macromolécula a ser cristalizada é misturada a um agente cristalizante numa concentração tal que permita atingir a supersaturação instantaneamente.

O aparecimento de cristais é comumente esperado na zona de nucleação, mas em alguns casos é possível obter cristais bem grandes na zona metaestável. Se a supersaturação é tão grande, que um precipitado é formado no tubo de batch, ainda assim este não deve ser descartado, pois pode, eventualmente, ocorrer a formação de cristais, vale lembrar que nesses casos a cinética de crescimento é diminuída.

Um fator que limita a aplicação desse método é a quantidade de amostra necessária (~), porém um sistema automatizado de microbatch foi desenvolvido por (Chayen *et al* 1990, 1992) reduzindo este problema.

A.7.2. Cristalização por Difusão de Vapor

Esta técnica foi utilizada pela primeira vez na cristalização da tRNA (Hampel *et al.*, 1968). O princípio da cristalização por difusão de vapor está indicado na figura 26. Uma gota contendo a macromolécula biológica a ser cristalizada em tampão com



o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota. O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório. Se o equilíbrio ocorre por meio de troca da água (da gota para o reservatório), isto leva a uma diminuição do volume da gota, e conseqüentemente, a um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização. Para espécies químicas com pressão de vapor maior que a pressão de vapor da água, a troca ocorre do reservatório para a gota. Os mesmos princípios se aplicam para gotas penduradas (*hanging drops*), gotas sentadas (*sitting drops*) e gotas sanduíches (*sandwich drops*).



Figura 27. Representação dos processos de Difusão de Vapor.

A.8. O Método da matriz esparsa (Fatorial)

Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se óbvio que muitas das condições de cristalização se assemelhavam, ou seja, havia uma concentração de resultados positivos de cristalização de macromoléculas biológicas usando-se um número limitado de precipitantes, tampões e aditivos. Isto levou à proposição de diversos métodos de cristalização (Carter & Carter, 1979), onde um número limitado de condições de cristalização era tentado, usando-se pequenas quantidades da macromolécula

biológica, geralmente por volta de poucos miligramas. A partir da observação dos resultados preliminares destes experimentos era possível determinar que tampão, aditivo e agente precipitante seriam os mais favoráveis e a partir daí proceder-se a sucessivos melhoramentos até se conseguir cristais adequados, ou ainda, em casos favoráveis, obter-se cristais adequados já na primeira tentativa com as condições padrões.

Dentro deste raciocínio a Dra. Jaru Jancarick da UC Berkeley propôs o método da matriz esparsa (Jancarick & Kim, 1991) onde diversas condições são tentadas para se cristalizar a macromolécula biológica. Visto que o número de variáveis que afetam a cristalização, tais como concentração, temperatura, pH, força iônica, aditivos específicos e precipitantes, é grande e combinatório, o número total de possíveis condições de cristalização a serem testadas é tão grande que uma procura completa com todas as condições de cristalização em potencial seria inviável. No método da matriz esparsa foram escolhidas três categorias de parâmetros que afetam a cristalização como variáveis principais, são estes: pH e materiais tampões, aditivos e agentes precipitantes (tabela1). Para a variável pH e tampões foram escolhidos cinco diferentes pHs: 4,6; 5,6; 6,5; 7,5 e 8,5, e para cada valor de pH foi escolhido o tampão químico que tinha provado ser o mais adequado para a cristalização de proteínas no passado. A escolha de aditivos também foi baseada na experiência passada de muitos laboratórios. Para os agentes precipitantes foram escolhidos quatro tipos: 2-propanol, como agente volátil, 2-metil-2,4-pentanediol (MPD) e polietileno glicol (PEG), como agentes não-voláteis, e vários agentes de *salting-out*. Todos são listados na tabela 14.



Tabela.14. Agentes Precipitantes

Sais
Tartarato de Sódio e Potássio; Fosfato de Amônio; Sulfato de Amônio; Acetato de Sódio; Sulfato de Lítio; Formiato de Sódio e Potássio; Citrato de Sódio; Formiato de Magnésio.
Não Voláteis
MDP; PEG 400; PEG1500; PEG 4000; PEG 8000
Voláteis
2-Propanol
Mistura
Sulfato de Amônio+PEG; 2-Propanol + PEG
Aditivos
Cloreto de Cálcio, Citrato de sódio, Cloreto de Magnésio, Acetato de Amônio, Sulfato de Amônio, Acetato de Magnésio, Acetato de Zinco e Acetato de Cálcio.
Faixa de pH
4,6; 5,6; 6,5; 7,5 e 8,5

A.9. Aplicação do método da matriz esparsa

Após preparar as cinquenta diferentes soluções, nós usamos o método de *hanging drops*, para testar as condições de cristalização. Colocamos 1,0mL de cada uma destas soluções em cada um dos reservatórios de uma caixa plástica Linbro (modelo 76-033-05). Estas caixas foram originalmente desenhadas para cultura de células e possuem 24 reservatórios. É necessário o uso de três caixas Linbro, sendo que a terceira terá apenas dois reservatórios usados, o restante dos reservatórios da terceira caixa podem ser usados em experimentos futuros. Têm-se então 50 reservatórios com 1,0mL de cada uma das soluções de cristalização tabelas 15a e 15b).

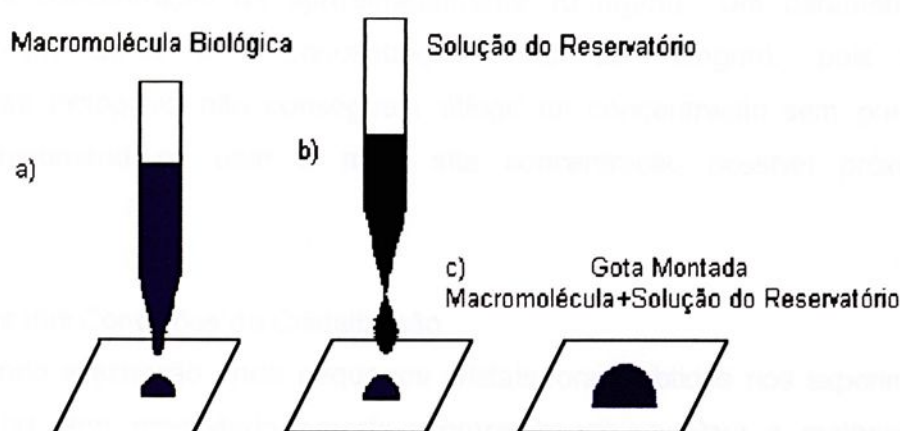


Figura 28. Sequência de eventos para a montagem de uma gota de cristalização: a) Coloca-se 1-2 μ L da solução da macromolécula biológica sobre a laminula de vidro. b) Adiciona-se 1-2 μ L da solução do reservatório à gota com a solução da macromolécula biológica. c) Ao final temos uma gota (2+2) com a solução de macromolécula biológica mais a solução do reservatório.

Colocamos (ver figura 27) entre 1-2 μ L da solução da macromolécula biológica em uma lamínula de vidro siliniconizada e a mesma porção da solução do reservatório, estas soluções aparecem descritas nas tabelas 15a e 15b. Em seguida cobrimos cada um dos reservatórios das caixas Linbro com as respectivas lamínulas de vidro onde foram colocadas as soluções como descrito acima, e usando graxa de vácuo vedamos os reservatórios com as lamínulas de vidro. Este tipo de composição é o que se convencionou chamar-se de gota (2+2). Nesta situação teremos uma concentração menor de precipitante na gota do que no reservatório. E a difusão de vapor d'água se procederá da gota para o reservatório. No caso em que as espécies químicas do reservatório possuam pressão de vapor menor que a pressão de vapor d'água, isto fará com que a concentração da solução de macromolécula biológica bem como das outras espécies químicas presentes na gota aumente, o que em casos favoráveis levará a macromolécula biológica a uma condição de supersaturação favorável à formação dos primeiros agregados cristalinos (zona de nucleação). Tal composição (2 μ L + 2 μ L) pode ser mudada, bem como o volume inicial da gota, contudo em um experimento de cristalização deve-se ter em mente o uso racional da macromolécula biológica, principalmente nos experimentos preliminares de cristalização, de forma que grandes volumes de gotas de cristalização devam ser evitados.

Na proposição original do método recomenda-se que a macromolécula biológica a ser cristalizada seja dissolvida em água ou no seu tampão original e trazida a uma concentração de aproximadamente 10 mg/mL. Um parâmetro que pode causar problemas é a concentração inicial de 10mg/mL, pois muitas macromoléculas biológicas não conseguem atingir tal concentração sem precipitar, neste caso recomenda-se usar a mais alta concentração possível próxima a 10mg/mL.

A.10. Melhorias das Condições de Cristalização

Analisando a situação onde pequenos cristais foram obtidos nos experimentos iniciais, com ou sem precipitado amorfo acompanhando-os. Para a melhoria dos cristais e eliminação do precipitado amorfo seguimos os seguinte passos:



Passo 1) Abaixe a concentração da macromolécula e tente as mesmas condições em que obteve os primeiros cristais. Tente varias concentrações, por exemplo, se os primeiros cristais foram conseguidos com a concentração de 10mg/mL tente 9, 8,7,6 e 5mg/mL.

Espere por uma semana e se não houver melhora nos cristais, prossiga.

Passo 2) Mantenha a concentração da macromolécula biológica constante e abaixe a concentração do agente precipitante.

Espere por uma semana e se não houver melhora nos cristais, prossiga.

Passo 3) Adicione 0,2M NaCl ao reservatório. Se a gota de cristalização ficar completamente “clara” (sem precipitado ou cristais) após uma semana, aumente a concentração do precipitante em incrementos de 5% a cada 3 dias. Se a gota continuar sem cristais ou precipitado 0,2M de NaCl foi demasiado, tente novamente com 20mM NaCl o mesmo procedimento.

A eliminação do precipitado, se presente, é importante visto que o mesmo age como sítio de nucleação e complica a manipulação futura do cristal.

Se não houve melhora nos cristais pode-se tentar microsemeadura (*microseeding*) caso tal tentativa não funcione pode-se tentar variar a temperatura, caso o experimento foi realizado a 4°C, deve-se tentar em temperatura ambiente e vice-versa.

O entendimento da influência dos parâmetros de cristalização torna-se necessário para guiar as melhorias que devem ser feitas nas condições de cristalização.

A.11. Armazenamento e manuseio de cristais

Alguns cristais de proteínas têm sido armazenados por alguns anos e ainda assim são passíveis de difratar. Para que isso ocorra algumas precauções devem ser tomadas, com o objetivo de aumentar o seu tempo de vida útil. Alguns desses cristais podem crescer desalinhados, e precisarem ser transferidos da gota onde cresceram, para uma gota com solução de líquido-mãe artificial. Não se deve usar tal solução com alta concentração de precipitante, a proteína no cristal está em equilíbrio com a solução, e se o líquido-mãe tiver suas condições variadas



bruscamente o cristal não resistirá, e poderá se dissolver parcial ou totalmente buscando restaurar o equilíbrio. Por esta razão não se deve armazenar cristais em volume de solução maior que o necessário. O aumento da concentração de precipitante resultará na quebra (ou diminuição) do cristal devido à mudança na pressão osmótica. Faça a transferência para o líquido-mãe artificial de apenas um cristal e, o observe por vários dias, se este resistir, faça a transferência dos demais. O ideal é verificar se o cristal que cresceu na solução artificial não sofreu danos e ainda é capaz de difratar, isso pode ser confirmado por exposição a raios X.

Algumas providências mais simples, como manter os cristais ao abrigo da luz, também auxiliam a evitar eventuais danos aos cristais, pois a luz pode levar a desencadear reações entre os radicais livres.

A.12. Montagem dos cristais para a coleta de dados

O intuito da cristalização é obter cristais que difratem quando expostos a raios X. Para isso esses cristais devem ser acondicionados de modo que tal fato se torne possível, o que é feito colocando esses cristais em capilares finos de vidro. As paredes finas de vidro minimizam a absorção do espalhamento de raios X e também diminuem o *background* do vidro, esse tipo de capilar é o mais indicado nos trabalhos com proteínas.

Existem vários caminhos para se montar um cristal em um capilar, temos um deles descrito a seguir onde o cristal foi obtido por difusão de vapor (*hanging drop*)

Primeiramente deve-se encontrar e separar a gota onde está o cristal que se deseja coletar, retirar essa lamínula e dela uma pequena alíquota e transferindo-a para uma lamínula com um pequeno volume de solução do poço. Dessa lamínula retirar o(s) cristal(is) com o auxílio de um capilar. O cristal deve ser o único no capilar, para eliminar os excedentes e também para secar o excesso de solução usa-se um papel filtro absorvente, com o qual faz-se um “canudo” suficientemente fino que entre no capilar e retire o excesso de solução. Deve-se ter o cuidado de deixar uma pequena quantidade de solução nas extremidades do capilar para evitar que este desidrate. Em seguida as extremidades são soldadas, usando cera, e o capilar está pronto para a coleta.



Tabela 15a. Soluções de Cristalização.

Sol. N°	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE
1	0.05M Cloreto de Cálcio	0.1M Acetato de Sódio	30% MDP
2	—	—	0.4M Tartarato de Sódio e Potássio
3	—	—	0.4M Fosfato de Amônio
4	—	0.1M TRIS	2.0M Sulfato de Amônio
5	0.2M Citrato de Sódio	0.1M HEPES	30% MDP
6	0.2M Cloreto de Magnésio	0.1M TRIS	30% PEG 4K
7	—	0.1M Cacodilato de Sódio	1.5M Acetato de Sódio
8	0.2M Citrato de Sódio	0.1M Cacodilato de Sódio	30% Isopropanol
9	0.2M Acetato de Amônio	0.1M Citrato de Sódio	30% PEG 4K
10	0.2M Acetato de Amônio	0.1M Acetato de Sódio	30% PEG 4K
11	—	0.1M Citrato de Sódio	1.0M Fosfato de Amônio
12	0.2M Cloreto de Magnésio	0.1M HEPES	30% Isopropanol
13	0.2M Citrato de Sódio	0.1M TRIS	30% PEG 4K
14	0.2M Cloreto de Magnésio	0.1M HEPES	28% PEG 400
15	0.2M Sulfato de Amônio	0.1M Cacodilato de Sódio	30% PEG 8K
16	—	0.1M HEPES	1.5M Sulfato de Lítio
17	0.2M Sulfato de Lítio	0.1M TRIS	30% PEG 4K
18	0.2M Acetato de Magnésio	0.1M Cacodilato de Sódio	25% PEG 8K
19	0.2M Acetato de Amônio	0.1M TRIS	30% Isopropanol
20	0.2M Sulfato de Amônio	0.1M Acetato de Sódio	25% PEG 4K
21	0.2M Acetato de Magnésio	0.1M Cacodilato de Sódio	30% MDP
22	0.2M Acetato de Sódio	0.1M TRIS	30% PEG 4K
23	0.2M Cloreto de Magnésio	0.1M HEPES	30% PEG 400
24	0.2M Cloreto de Cálcio	0.1M Acetato de Sódio	30% Isopropanol
25	0.1M Sulfato de Cádmio	0.1M Imidazol	1.0M Acetato de Sódio



Tabela 15b. Soluções de Cristalização.

Sol. N°	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE
26	0.2M Acetato de Amônio	0.1M Ácido Cítrico	30% MDP
27	0.2M Citrato de Sódio	0.1M HEPES	20% Isopropanol
28	0.2M Acetato de Sódio	0.1M Cacodilato de Sódio	30% PEG 8K
29	—	—	0.8M Tartarato de Sódio e Potássio
30	0.2M Sulfato de Amônio	—	30% PEG 8K
31	0.2M Sulfato de Amônio	—	30% PEG 4K
32	—	—	2.0M Sulfato de Amônio
33	—	—	4.0M Formiato de Sódio
34	—	0.1M Acetato de Sódio	2.0M Formiato de Sódio
35	—	0.1M HEPES	0.8M Fosfato de Sódio e Potássio
36	—	0.1M TRIS	8% PEG 8K
37	—	0.1M Acetato de Sódio	8% PEG 4K
38	—	0.1M HEPES	1.4M Citrato de Sódio
39	—	0.1M HEPES	2% PEG 400 + 2.0M Sulfato de Amônio
40	0—	0.1M Citrato de Sódio	20% Isopropanol + 20% PEG 4K
41	—	0.1M HEPES	20% Isopropanol + 20% PEG 4K
42	0.05M Fosfato de Potássio	—	20% PEG 8K
43	—	—	30% PEG 1.5K
44	—	—	0.2M Formiato de Magnésio
45	0.2M Acetato de Zinco	0.1M Cacodilato de Sódio	18% PEG 8K
46	0.2M Acetato de Cálcio	0.1M Cacodilato de Sódio	18% PEG 8K
47	—	0.1M Acetato de Sódio	2.0M Sulfato de Amônio
48	—	0.1M TRIS	2.0M Sulfato de Amônio
49	1.0 M Sulfato de Lítio	—	2% PEG 8K
50	0.5 M Sulfato de Lítio	—	15% PEG 8K

APÊNDICE B

B. Difração de Raios X (Drenth, 1994, Blundell, 1976)

B.1. Espalhamento de raios x por um átomo

Um feixe de raios X, quando interage com a matéria, é espalhado por dois processos distintos:

B.1.1. Espalhamento Compton

Devido à radiação se comportar como partícula, os fótons incidentes são desviados de sua trajetória, pelo átomo, com perda de energia. É um espalhamento incoerente e, portanto, ignorado em cristalografia por difração de raios X.

B.1.2. Espalhamento Thomson

Quando radiação eletromagnética com frequência ω incide em uma carga livre, esta carga oscila por ação dos campos elétrico e magnético, na mesma frequência da radiação incidente. Esta carga acelerada emite radiação nesta mesma frequência, defasada de 180° em relação à radiação incidente, mas em fase para qualquer ângulo de espalhamento. Esta a radiação espalhada importante para a cristalografia de difração de raios X.

A intensidade da radiação espalhada é dada por:

$$I_{2\theta} = I_0 \frac{ne^4}{2r^2m^2c^4} (1 + \cos^2 2\theta) \quad \text{B.1}$$

sendo: I_0 é a intensidade do feixe de radiação não polarizada incidente,

n é o número de cargas espalhadoras efetivas,

e é a carga do elétron,

r é distância do centro espalhador,

m é a massa do elétron;



c é a velocidade da luz;

2θ é o ângulo entre o feixe espalhado e o feixe incidente.

A presença das quantidades m^2 e c^4 no denominador indica dois fatos importantes:

- 1) Em um átomo, os principais centros espalhadores são os elétrons, uma vez que a massa do próton é aproximadamente 2000 vezes maior que a massa do elétron;
- 2) A intensidade da radiação espalhada é bastante fraca.

B.2. Fator de espalhamento atômico

Em um átomo, o elétron não é uma carga livre. Ele está ligado ao núcleo e ocupa uma região limitada do espaço. Portanto, sua carga deve ser representada por uma distribuição espacial de carga $\rho(r)$.

Quando se incide um feixe de radiação com direção s_0 no centro de um sistema de coordenadas, a radiação espalhada por um átomo numa direção s é:

$$f(S) = \int_{vol} \rho(r) \exp(2\pi i r \cdot S) dv \quad \text{B.2}$$

Sendo: $f(S)$ é o fator de espalhamento atômico,

S é igual a $(s-s_0)$

r é a posição da densidade de carga espalhadora $\rho(r)dv$.

$vol.$ é Volume do átomo.

Como usualmente assume-se que a densidade de carga de todos os átomos é esfericamente simétrica e conseqüentemente centrossimétrica, o fator de espalhamento atômico também é esfericamente simétrico e real (Delatorre *et al*, 2000). O fator de espalhamento atômico da maioria dos átomos foi calculado e encontra-se tabelado na *International Tables of Crystallography*, Volume III.

B.3. Fator De Temperatura B

A expressão derivada para o fator de estrutura assume o átomo em repouso. Na verdade, átomo possui movimento térmico e isto afeta a intensidade do espalhamento por um fator:



$$T(\text{iso}) = \exp \left[-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right]$$

B.3

$$B = 8\pi^2 \overline{u^2}$$

sendo u é o deslocamento térmico e (iso) indica a vibração isotrópica.

B.4. Espalhamento de raios x por uma molécula

Para um átomo deslocado de r_1 do centro de coordenadas, tem-se um fator de espalhamento:

$$f_1 = \int \rho(r) \exp(2\pi i(r + r_1) \cdot S) dv = \exp(2\pi i r_1 \cdot S) \quad \text{B.4}$$

A radiação total espalhada por uma molécula é a soma da contribuição de cada átomo que a compõe, ou seja:

$$G(S) = f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_N = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i r_j \cdot S) \quad \text{B.5}$$

B.4.1. Espalhamento de raios x por um cristal

A radiação espalhada por uma molécula é $G(S)$. Para moléculas arranjadas em um retículo cristalino com vetores unitários a , b e c , a posição de um átomo qualquer em relação ao átomo correspondente da molécula, na cela unitária, é obtida pela translação de $d = n_a a + n_b b + n_c c$. Para uma molécula qualquer do retículo cristalino terá a radiação espalhada dada por:

$$G_n = G(S) \exp(2\pi i d_n \cdot S) \quad \text{B.6}$$

e a radiação total do cristal composto de T moléculas será dada por:

$$F(S) = \sum_{n=0}^T G_n(S) = \sum_{n=0}^T G(S) \exp(2\pi i d_n \cdot S) \quad \text{B.7}$$

$$F(S) = \sum_{n=0}^T G(S) \exp[n_{a_i}(2\pi i a \cdot S) + n_{b_i}(2\pi i b \cdot S) + n_{c_i}(2\pi i c \cdot S)]$$



Como T é muito grande (10^5 em um cristal de 1mm), parcelas da soma acima que possuam diferentes orientações, deverão anular-se em média e somente teremos superposição construtiva quando

$$2\pi \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} = 2\pi h \quad \text{B.8}$$

$$2\pi \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} = 2\pi k$$

$$2\pi \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} = 2\pi l$$

com h , k e l inteiros. Estas são as Equações de Laue e os inteiros h , k e l são os chamados índices de Miller. Escrevendo a posição dos átomos em coordenadas fracionárias obtemos:

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S} \quad \text{B.9}$$

sendo $\mathbf{r}_j = x_j \mathbf{a} + y_j \mathbf{b} + z_j \mathbf{c}$ e x_j , y_j e z_j são as coordenadas fracionárias do j ésimo átomo.

Alternativamente podemos reescrever a equação acima usando as equações de Laue e teremos então:

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) \quad \text{B.10}$$

Esta é a equação para o Fator de Estrutura $F(hkl)$, que também pode ser escrita em função do módulo e da fase de $F(hkl)$ como:

$$F(hkl) = |F(hkl)| \exp i\alpha(hkl) \quad \text{B.11}$$

Quando coletamos raios X difratados por um cristal, a atual tecnologia permite somente medirmos a intensidade, $I(hkl)$, da radiação espalhada que é dada por:

$$I(hkl) = F(hkl) F^*(hkl) = |F(hkl)|^2 \quad \text{B.12}$$

e portanto toda informação a respeito da fase da radiação espalhada é perdida.

B.5. A densidade eletrônica

Quando desejamos "resolver" uma estrutura utilizando raios X, nosso desejo é descobrir como se encontra distribuída a densidade eletrônica nesta molécula. Para obtermos a densidade eletrônica temos a equação para o Fator de Estrutura:

$$F(S) = \int \rho(r) \exp(2\pi i r \cdot S) dv \quad \text{B.13}$$

volume
da
cela
unitária

que, multiplicada por $\exp(-2\pi i r \cdot S)$ e integrando-se sobre todo o volume do espaço recíproco, encontramos:

$$\rho(r) = \int F(S) \exp(-2\pi i r \cdot S) dv_s \quad \text{B.14}$$

volume
do
espaço
recíproco

Vemos, portanto, que a densidade eletrônica é a transformada de Fourier do fator de estrutura.

Dos experimentos de difração obtemos um número finito de valores de $F(hkl)$. Portanto a integral acima deve ser repassada para uma somatória sobre todos os índices de Miller. Temos então:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F(hkl) \exp i\alpha(hkl) \exp 2\pi i(hx + ky + lz) \quad \text{B.15}$$

Nesta equação fica explícita a necessidade de conhecermos o módulo e a fase dos fatores de estrutura, mas somente podemos obter diretamente da difração de raios X o módulo. A descoberta das fases é, portanto o problema fundamental na determinação da estrutura de qualquer cristal.

B.5.1. Função de Patterson

A função de Patterson pode ser calculada a partir de um conjunto de dados de difração e é definida como:

B.16



$$P(u) = \int_{\substack{\text{volume} \\ \text{da} \\ \text{cela} \\ \text{unitária}}} \rho(r) \rho(r+u) dv$$

sendo $u = u \mathbf{i} + v \mathbf{j} + w \mathbf{k}$ é um vetor deslocamento.

A função de Patterson é um mapa vetorial de distâncias interatômicas da estrutura. Fazendo uso da equação para a densidade eletrônica obtemos:

$$P(u) = \frac{1}{V^2} \sum_h \sum_{h'} F_h F_{h'} \exp(-2\pi i h' u) \int_{\substack{\text{volume} \\ \text{da} \\ \text{cela} \\ \text{unitária}}} \exp(-2\pi i (h + h') x) dv \quad \text{B.17}$$

que pode ser simplificada para:

$$P(u) = \frac{2}{V} \sum_{hkl} F(hkl)^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw) \quad \text{B.18}$$

como $P(u)$ é a transformada de Fourier de $F(hkl)^2$, pode facilmente ser calculada a partir dos dados de difração.



APÊNDICE C

C. Substituição Molecular (Drenth, 1994)

C.1. INTRODUÇÃO

Como vimos no Apêndice B, é necessário o conhecimento completo dos feixes de raios X difratados por um cristal, para se conhecer a distribuição de cargas elétricas da molécula que forma o cristal, ou seja, necessitamos conhecer a intensidade e a fase da radiação difratada. Como a única informação que pode ser medida é a intensidade da radiação, torna-se necessário obter-se maneiras de conhecer a fase da radiação, ou resolver o "problema da fase".

Partindo da observação de que moléculas com seqüências primárias homólogas possuem enovelamentos similares, o conhecimento estrutural destas moléculas, permite simular um modelo inicial do cristal a ser resolvido e, deste modelo, obter as informações necessárias sobre a fase da radiação difratada pelo cristal real. Este método de resolução do problema da fase é o chamado Método da Substituição Molecular, e o crescente número de novas estruturas resolvidas tem tornado este método extremamente poderoso.

O primeiro passo a ser resolvido deve ser a colocação do modelo na mesma posição que a molécula real ocupa na sua rede cristalina. Este procedimento implica em movimentos de rotação e translação do modelo, cujas coordenadas espaciais de seus átomos, referem-se ao seu posicionamento no próprio cristal.

Este procedimento deve ser realizado, utilizando como "guia" a única informação conhecida: a intensidade da radiação difratada.

C.1.1. A função rotação

O que se deve fazer para obter as relações angulares que rotacionam uma molécula, incorretamente posicionada na unidade assimétrica de um cristal, para que sua real orientação seja obtida dos dados de raios X?

Se um cristal possui um sistema de eixos ortogonais a , b e c , cada átomo de uma molécula pertencente a este cristal tem sua posição determinada por um conjunto de coordenadas fracionárias x , y e z . Pode-se, então, calcular os fatores de estrutura



$F(S)$ deste cristal através da equação (B.9), que escreve a posição dos átomos em coordenadas fracionárias, e da função de Patterson $P(u)$, apresentada na equação (B.18).

Ao se aplicar uma rotação à molécula, de tal modo que:

$$(x,y,z)_r = [C].(x,y,z) \quad \text{C.1}$$

sendo $(x,y,z)_r$ as novas coordenadas rotacionadas pela matriz de rotação C . A função de Patterson de um cristal, como um mapa vetorial das distâncias interatômicas deste cristal, rotacionará da mesma forma, ou seja, aplicando-se a rotação C à função de Patterson $P(u)$ obtém-se a função de Patterson rotacionada $Pr(u)$.

Definindo uma função de *overlap* (sobreposição) R , para ângulos α , β e γ relacionados à matriz de rotação C , chega-se a:

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P(u) x P_r(u) \quad \text{C.2}$$

que terá seu valor maximizado quando houver uma correta superposição da molécula original e da molécula rotacionada.

A maximização da função $R(\alpha, \beta, \gamma)$, computada utilizando $P(u)$, calculado dos dados de raios X , e $Pr(u)$, calculado do modelo rotacionado, fornece a rotação necessária para orientar nosso modelo corretamente na unidade assimétrica do cristal.

C.1.2. A função translação

A melhor maneira de encontrar a translação necessária ao correto posicionamento do modelo dentro da unidade assimétrica é através do método tentativa e erro. O modelo é transladado dentro da unidade assimétrica e os fatores de estrutura são calculados para esta nova posição (F_{calc}) e comparados com os fatores de estrutura observados (F_{obs}). A qualidade da translação é monitorada através do cálculo de fatores de controle. Os fatores usualmente utilizados são: o fator R (R_{factor}) e o coeficiente de correlação (CC).

O fator R é dado pela expressão:



$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - k|F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad \text{C.3}$$

sendo k é um fator de escala e o coeficiente de correlação CC é calculado por:

$$CC = \frac{\sum_{hkl} \left(|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2} \right) \left(|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2} \right)}{\left[\sum_{hkl} \left(|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2} \right)^2 \sum_{hkl} \left(|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2} \right)^2 \right]^{1/2}} \quad \text{C.4}$$

Para concordâncias perfeitas, encontra-se valores de 0% para R_{factor} e 100% para CC . Valores de R_{factor} inferiores a ~ 40% e de CC superiores a ~ 50% indicam que a substituição molecular encontrou um modelo passível de refinamento.

De posse das rotações e translações necessárias, para posicionarmos o modelo corretamente na cela unitária, estas transformações são aplicadas e os fatores de estrutura $F(hkl)$ são calculados. As fases obtidas para cada reflexão, são assumidas como as fases correspondentes aos fatores de estrutura observados, e esta informação será utilizada como ponto de partida de um processo de refinamento, para obtenção da estrutura da molécula difratada.



APÊNDICE D

D. Refinamento (Drenth, 1994 E Brünger, 1992)

Refinamento é o processo de encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto para a estrutura da molécula e a sua estrutura real.

Esta concordância deve refletir numa igualdade entre os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) e os fatores de estrutura observados (F_{obs}).

As técnicas de refinamento em cristalografia de difração de raios X estão baseadas no princípio dos mínimos quadrados que assume uma distribuição gaussiana para F_{obs} , e que implica na minimização da função

$$S_1 = \sum_{hkl} w(hkl) (|F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|)^2 \quad D.1$$

onde $w(hkl)$ é o peso dado para uma dada observação. O mínimo de S_1 é encontrado variando-se as coordenadas que determinam $|F_{calc}(hkl)|$, ou seja, impondo que a diferencial de $|F_{calc}(hkl)|$ com relação às coordenadas, seja nula.

O acompanhamento da qualidade deste processo se faz através do cálculo do fator R (equação C.3) durante o processo. Como R pode ser minimizado artificialmente e levando em consideração a redundância dos dados de raios X (Brünger, 1992), uma pequena porcentagem das reflexões (em geral entre 5 e 10%) são excluídos do refinamento e utilizados como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator R chamado R_{free} , que será isento de minimização artificial. Desta forma haverá dois parâmetros de controle, que são:

$$R = \frac{\sum_{(100-T)\%hkl} \left| |F_{obs}| - k|F_{calc}| \right|}{\sum_{(100-T)\%hkl} |F_{obs}|} \quad D.2$$



$$R_{free} = \frac{\sum_{T\%hkl} \|F_{obs} - k|F_{calc}|\|}{\sum_{T\%hkl} |F_{obs}|} \quad D.3$$

sendo T% é a porcentagem de reflexões escolhidas para formar o conjunto de teste.

Partindo de um modelo com R_{fator} por volta de 50%, um bom refinamento abaixa este valor para 20% ou menos, com R_{free} até 10% acima de R_{fator} .

A minimização que consiste da modificação das coordenadas posicionais x, y e z e dos fatores de temperatura B de cada átomo da molécula a ser refinada é um trabalho que apresenta uma grande quantidade de parâmetros a serem ajustados. Tomando como exemplo uma molécula de hemoglobina que, possuindo aproximadamente 4500 átomos (excetuando-se os hidrogênios que por possuírem somente um elétron, usualmente são desconsiderados nos processos de refinamento) exige o refinamento de 18.000 variáveis (x,y,z,B). Para isso, se tem como informação, aproximadamente 54.000 reflexões medidas. Três para um é uma relação parâmetros/variáveis muito pobre para solucionar este problema. Um bom procedimento de refinamento necessita em média de um número de parâmetros conhecidos 10 vezes superior ao número de variáveis a serem refinadas (Giacovazzo *et al.* 1992). Se o número de reflexões independentes (parâmetros), que depende da resolução, não for suficientemente maior que o número de coordenadas a serem calculadas (variáveis), a relação parâmetros/variáveis pode ser melhorada através de informações estereoquímicas (distâncias, ângulos e outros parâmetros geométricos entre os átomos nos resíduos de aminoácidos e nas cadeias polipeptídicas dos aminoácidos). Simetrias não cristalográficas também podem ser utilizadas. Estas informações podem ser aproveitadas de duas maneiras diferentes: por procedimentos chamados de *Constraint* e *Restraint*.

Se estas informações fixam ligações e ângulos, e permitem que partes da molécula sejam consideradas como corpos rígidos, o número de variáveis é então reduzido melhorando a relação parâmetros/variáveis pelo processo chamado *Constraint*.



Por outro lado, se as informações estereoquímicas são utilizadas permitindo variações de parâmetros em torno de valores padrão, o número de observações aumenta, melhorando assim a relação parâmetros/variáveis pelo processo chamado *Restraint*.

Tradicionalmente um processo completo de refinamento é executado por partes, como descrito a seguir.

D.1. Refinamento de Corpo Rígido

É um refinamento do tipo *Constraint*, onde partes da estrutura ou ela toda, são refinadas como parâmetros individuais. Este procedimento é realizado como passo inicial do refinamento, após a substituição molecular, possibilitando um melhor posicionamento da molécula na unidade assimétrica.

D.2. Refinamento Posicional

É um refinamento do tipo *Restraint*. A função a ser minimizada consiste do termo cristalográfico S somado a vários outros termos estereoquímicos, dentre os quais estão:

$S_1 = \sum_{hkl} w(hkl) (F_{obs}(hkl))^2$	Minimização Clássica	D.4
$S_2 = \sum_j w_j (d_{j(ideal)} - d_{j(calc)})^2$	Minimização das distâncias atômicas	D.5
$S_3 = \sum_k \sum_l w_m (\bar{m}_k \bar{r}_{l,k} - d_k)^2$	Minimização dos desvios planares	D.6
$S_4 = \sum_l w_l (V_{l(ideal)} - V_{l(calc)})^2$	Minimização dos volumes quirais	D.7
$S_5 = \sum_n w_n (d_{n(ideal)} - d_{n(calc)})^4$	Minimização dos contatos de van de Waals	D.8
$S_6 = \sum_t w_t (X_{t(ideal)} - X_{t(calc)})^2$	Minimização dos ângulos de torção	D.9
$S_7 = \sum_k w_k (\bar{r}_k - \bar{r}_0)^2$	Minimização dos desvios do modelo	D.10
$S_8 = \sum_l w_p (\varphi_{l(obs)} - \varphi_{l(calc)})^2$	Minimização dos desvios na fase	D.11

Alternativamente, alguns programas de refinamento minimizam uma somatória composta pelo termo de raios X S_1 e termos de energia potencial relacionados aos



parâmetros restringidos. No programa X-PLOR ao termo de raios X podem ser adicionados, dentre outros, os termos de energia $w_{\text{bond}}E_{\text{bond}}$, $w_{\text{ang}}E_{\text{ang}}$, $w_{\text{dihe}}E_{\text{dihe}}$, $w_{\text{impr}}E_{\text{impr}}$, $w_{\text{vdw}}E_{\text{vdw}}$, $w_{\text{elec}}E_{\text{elec}}$, $w_{\text{pvdw}}E_{\text{pvdw}}$, $w_{\text{pele}}E_{\text{pele}}$, onde w são os pesos de cada energia e os índices correspondem a:

bond: energia das ligações covalentes;

angl: energia dos ângulos de ligação;

dihe: energia dos ângulos de torção;

impr: energia dos ângulos de torção usados para imposição de planalidade e chiralidade;

vdw: energia de van der Waals intramolecular, calculada pelo potencial de Lennard-Jones;

elec: energia de repulsão ou atração eletrostática intramolecular.

pvdw: energia de van der Waals para interações oriundas de simetrias cristalográficas e não cristalográficas.

pele: energia eletrostática para interações oriundas de simetrias cristalográficas e não cristalográficas.

D.3. Refinamento por Dinâmica Molecular ou Simulated Annealing

Refinamentos utilizando mínimos quadrados oferecem bons resultados quando as posições atômicas do modelo inicial não diferem em muito da posição real dos átomos, ou seja, apresentam bons resultados quando o raio de convergência é pequeno. Quando é necessário um raio de convergência maior, geralmente o processo de minimização fica preso em mínimos locais, não conseguindo atingir o mínimo absoluto ou mínimo real. O método do *Simulated Annealing*, aplicado à cristalografia, introduzido por Brünger *et al* (1990) e implementado nos programas X-PLOR e CNS, simula a dinâmica molecular de um sistema, "levando-o" até altas temperaturas e "esfriando" o sistema gradualmente até a temperatura ambiente (*slow cooling*). Os termos minimizados são os mesmos do refinamento posicional. A dinâmica molecular inicia-se atribuindo aos átomos velocidades derivadas da distribuição de Maxwell para a atual temperatura. Na situação inicial, o sistema possui



uma dada energia potencial $E_{pot,i}$ e em cada átomo i na posição r_i age uma força derivada da energia potencial igual a $-\partial E_{pot}/\partial r_i$, e pela mecânica de Newton tem-se:

$$-\frac{\partial E_{pot}}{\partial r_i} = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = m_i a_i \quad \text{D.12}$$

Esta aceleração a_i é aplicada a cada átomo por um tempo Δt da ordem de femto-segundo (10^{-15} s), e com a movimentação dos átomos, uma nova estrutura é conseguida e o processo é repetido na ordem de 10^3 a 10^4 vezes. A idéia principal do método de *Simulated Annealing* é que "aquecendo-se" a molécula, os átomos adquirirão altas velocidades e energias cinéticas suficientes para vencerem as barreiras de potencial e quando a temperatura chegar à temperatura ambiente, a estrutura tenha alcançado o seu mínimo energético. A grande vantagem deste método é o alto raio de convergência, chegando a vários ângstrons.

D.4. Refinamento do Fator B

Devido à dependência do fator de estrutura $F(hkl)$ com o movimento térmico, o fator térmico B pode ser refinado. Este refinamento pode ser realizado conjuntamente ao refinamento posicional, ou isoladamente. O fator térmico B pode ser refinado como um fator único para todo os átomos simplesmente considerando, no cálculo de F_{calc} , a dependência com o fator B dada pela equação (B.3).



