

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Apostila

Estruturas tridimensionais e funções biológicas
das proteínas globulares

Paulo de Tarso Gonçalves Leopoldo

São Cristóvão,
2015.

II - **Tema Central:** Estruturas tridimensionais e funções biológicas das proteínas globulares

III - **Duração:** 3horas/aula

IV - **Estratégia:** Aula Expositiva

V - **Meta:**

Introduzir o estudo das estruturas tridimensionais e funções biológicas das proteínas globulares

VI - **Objetivos Específicos**

Ao final desta aula você será capaz de:

- 6.1 Descrever a estrutura tridimensional da mioglobina;
- 6.2 Reconhecer padrões de enovelamento das proteínas globulares;
- 6.3 Conceituar estrutura terciária;
- 6.4 Diferenciar voltas β de alças Ω
- 6.5 Conceituar estrutura supersecundárias ou motivo;
- 6.6 Conceituar domínios;
- 6.7 Demonstrar como interações químicas covalentes e não covalentes estão envolvidas na manutenção da estrutura terciária;
- 6.8 Conceituar estrutura quaternária;
- 6.9 Definir desnaturação e renaturação
- 6.10 Descrever doenças priônicas

VII - **Conteúdo Programático:**

- 7.1 Introdução
- 7.2 Estrutura e função da mioglobina
- 7.3 Padrão de enovelamento da mioglobina e de proteínas globulares
 - 7.3.1 Padrão de enovelamento da porina, uma proteína de membrana biológica
- 7.4 Conceito de estrutura terciária
- 7.5 Percentual de α -hélice e conformação β em proteínas globulares
- 7.6 Interações químicas envolvidas na manutenção da estrutura terciária
- 7.7 Voltas e alças promovem o dobramento de cadeia polipeptídica
- 7.8 estruturas supersecundárias
- 7.9 Domínios das proteínas globulares
- 7.10 A estrutura quaternária
- 7.11 Desnaturação e renaturação
- 7.12 Doenças priônicas

Capítulo 6

Estruturas e funções das proteínas globulares

1. Introdução

Em 1950, temos o marco inicial na compreensão da conformação de uma proteína globular, com os estudos de difração de raios X da mioglobina, realizados por John Kendrew e colaboradores. A mioglobina é uma hemoproteína de baixo peso molecular, encontrada nas células musculares. Sua função é armazenar oxigênio e facilitar sua difusão no tecido muscular que está em contração rápida. A mioglobina apresenta uma única cadeia polipeptídica contendo 153 resíduos de aminoácidos e apenas uma unidade de seu cofator, o grupo heme (protoporfirina IX). O grupo heme confere a cor marrom ou vermelha aos tecidos onde são encontradas as proteínas mioglobina e hemoglobina, respectivamente. A mioglobina é particularmente abundante nos músculos de animais aquáticos como a baleia, a foca e o boto, que são tão ricos nessa proteína, conferindo-lhe cor marrom. O armazenamento do oxigênio pela mioglobina muscular permite a esses animais permanecer submerso por longos períodos de tempo.

A Figura 1 mostra duas representações da estrutura da mioglobina. A figura 1A destaca todos os átomos da proteína e a figura 1B é a representação da conformação da cadeia polipeptídica destacando os segmentos regulares em α -hélice e os segmentos de curvatura da cadeia denominados **voltas ou dobras- β** . Em ambas as representações a cadeia polipeptídica se enovela em três dimensões. Nessas estruturas o grupo heme é representado em roxo e cinza cercado pela cadeia polipeptídica (**globina**). A estrutura molecular da mioglobina é formada por oito segmentos de α -hélice relativamente retilíneos que são interrompidos por dobras, sendo algumas delas **voltas- β** (figura 1B). A α -hélice mais longa possui 23 resíduos de aminoácidos e a mais curta apenas sete; todas são dextrosas. Mais do que 70% dos resíduos de aminoácidos na mioglobina se encontram nessas regiões helicoidais. A análise por raios X revelou a posição precisa de cada um dos grupos R, os quais ocupam quase todo o espaço no interior da cadeia enovelada.

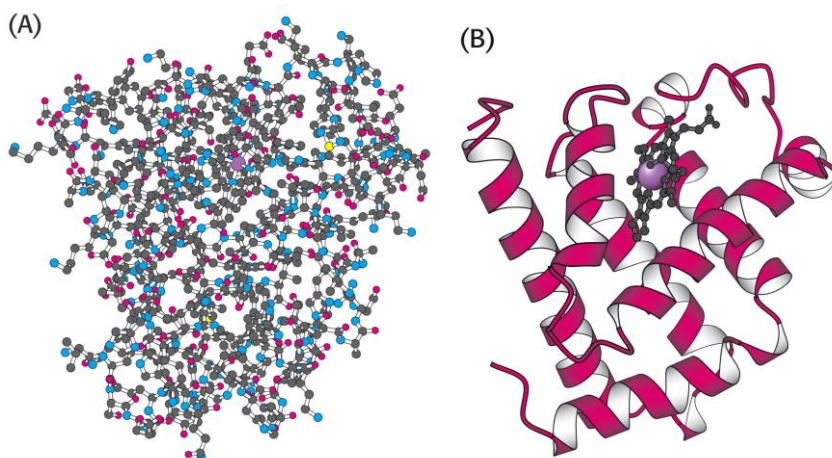


Figura 1 Estrutura da mioglobina. a) representação da proteína em modelo de preenchimento espacial. b) representação da cadeia polipeptídica em fita.

2. Padrões de enovelamento da mioglobina e de proteínas globulares

Dos estudos realizados com difração de raios x em cristais da proteína mioglobina, John Kendrew estabeleceu os seguintes padrões de enovelamento para essa proteína (figura 2), padrões esses que são observadas para as proteínas globulares encontradas em ambientes aquosos da célula, quais sejam:

- O interior da mioglobina é tão compacto que comporta apenas quatro moléculas de água;
- A maioria dos aminoácidos com cadeia lateral polar localiza-se na superfície e os que apresentam cadeia lateral apolar situam-se no interior da cadeia polipeptídica;
- Nas curvas ou dobras das cadeias polipeptídicas são encontrados uns desses aminoácidos: prolina, glicina, serina, treonina ou asparagina;
- A ligação peptídica apresenta configuração trans;
- O grupo heme está localizado numa fenda, ou bolsa, no interior hidrofóbico das hemoproteínas. Esse padrão é observado apenas para as hemoproteínas como hemoglobina, os citocromos c, b e a, etc.

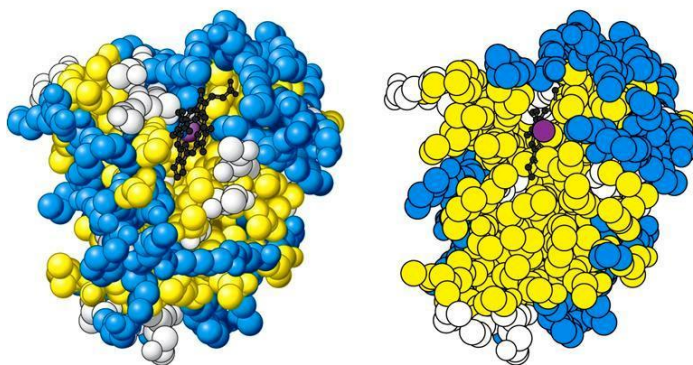


Figura 2: Padrão de enovelamento da mioglobina e proteínas globulares. As esferas em azuis, encontradas nas superfícies dessas proteínas representam os grupos polares dos aminoácidos hidrofílicos, enquanto as esferas amarelas, os grupos dos aminoácidos hidrofóbicos, localizados no interior apolar da proteína.

2.1 Padrão de enovelamento da porina, uma proteína de membrana biológica.

As proteínas de membranas biológicas, como a porina, por estar inseridas numa bicamada lipídica, cujo ambiente é apolar, se enovelam expondo os resíduos de aminoácidos apolares e protegem no seu interior os aminoácidos polares.

3. A estrutura terciária

As estruturas das proteínas globulares são esféricas, cujas conformações são mais complexas do que as proteínas fibrosas. A conformação das proteínas globulares é a **estrutura terciária**, que é definida como sendo o arranjo espacial de todos os átomos dessa molécula, incluindo a cadeia lateral de todos os aminoácidos. A estrutura terciária é o enovelamento da cadeia polipeptídica, assumindo um aspecto globular ou esférico. Essa conformação se forma com os aminoácidos que estão distantes na seqüência da cadeia

polipeptídica, mas se aproximam em sua estrutura tridimensional com o enovelamento da cadeia polipeptídica. A estrutura terciária se diferencia em dois aspectos fundamentais da estrutura secundária:

3.1 A estrutura terciária é formada por aminoácidos que estão distantes na seqüência de aminoácidos, enquanto a estrutura secundária é formada por resíduos de aminoácidos sucessivos e próximos na cadeia polipeptídica;

3.2 A estrutura terciária é estabilizada tanto por interações covalentes quanto não covalentes dos grupos R da cadeia lateral.

4. Percentual de α -hélice e conformação β em proteínas globulares

Com a elucidação das estruturas terciárias de centenas de outras proteínas globulares por análises com raios X, tornou-se claro que a mioglobina representa apenas uma das diferentes conformações que uma cadeia polipeptídica pode assumir. As estruturas do citocromo c, lisozima e ribonuclease são comparadas (tabela 1). Todas apresentam diferentes seqüências de aminoácidos e diferentes estruturas terciárias, refletindo diferenças nas suas funções. Todas são relativamente pequenas e fáceis de manipular, facilitando as análises estruturais.

O citocromo c é um componente da cadeia respiratória das mitocôndrias. Como a mioglobina, o citocromo c é uma hemoproteína. Apresenta uma única cadeia polipeptídica de cerca de 100 resíduos e um único grupo heme. Neste caso, a protoporfirina IX do grupo heme está covalentemente ligada ao polipeptídio. Apenas cerca de 40% do polipeptídio é formado por segmentos α -helicoidais, comparados com os 70% da cadeia de mioglobina. O restante da cadeia do citocromo c contém voltas- β e segmentos irregularmente enovelados e estendidos.

A lisozima é uma enzima abundante na clara do ovo e nas lágrimas humanas que catalisa a clivagem hidrolítica de polissacarídeos das paredes celulares protetoras de algumas famílias de bactérias, atuando, portanto, como um agente bactericida. Cerca de 40% de seus 129 resíduos de aminoácidos estão em segmentos de α -hélice, algumas estruturas em folhas- β . Quatro ligações dissulfeto fornecem estabilidade a essa estrutura. As α -hélices formam uma extensa cavidade na lateral da molécula, denominada sítio ativo, que é o sítio de ligação do substrato e da catálise. O polissacarídeo bacteriano que é o substrato para a lisozima se ajusta a essa cavidade.

A ribonuclease é uma enzima secretada pelo pâncreas no intestino delgado, cuja função é catalisar a hidrólise de certas ligações covalentes dos ácidos ribonucléicos presentes no alimento ingerido. Sua estrutura terciária, determinada por análises de raios X, mostra que apenas uma pequena parte de sua cadeia polipeptídica de 124 resíduos de aminoácidos apresenta conformação α -helicoidal. A maior parte de sua estrutura secundária é do tipo conformação β . A ribonuclease apresenta quatro ligações dissulfeto entre porções da cadeia polipeptídica.

Tabela 1. Percentual de α -hélice e conformação β em proteínas globulares

Proteínas	Total de resíduos de aminoácidos	α -hélice (%)	β -conformação (%)
Mioglobina	153	78	00
Citocromo c	104	39	00
Lisozima	129	40	12
Ribonuclease	124	26	35
Quimotripsina	247	14	45
Carboxipeptidase	307	38	17

5. Voltas e alças promovem o dobramento de cadeia polipeptídica

5.1 Dobras ou voltas- β . Nas proteínas globulares que possuem uma estrutura enovelada compacta, cerca de um terço dos resíduos de aminoácidos estão situados em dobras ou voltas em que a cadeia polipeptídica inverte a sua direção (Figura 3). Esses são os elementos de conexão que unem trechos sucessivos de α -hélices ou conformações- β . São particularmente comuns as **voltas- β (ou dobras- β)** que são estruturas secundárias regulares, que conectam as extremidades de dois segmentos adjacentes de uma folha- β antiparalela. A volta- β é uma dobra de 180° envolvendo quatro resíduos de aminoácidos, com o grupo de oxigênio carbonílico do primeiro resíduo de aminoácido formando uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do amino grupo do quarto. Os grupos peptídicos dos dois resíduos centrais não participam de qualquer ligação de hidrogênio. Os resíduos de glicina e prolina freqüentemente aparecem nas voltas- β . Isso se explica pelo fato da glicina ser um aminoácido com grupo lateral pequeno e flexível e as ligações peptídicas da prolina poder apresentar configuração cis, uma forma que é particularmente suscetível de se dobrar. São conhecidos diversos tipos de voltas- β , sendo que os dois tipos apresentados na figura 3 são os mais comuns. As voltas- β são freqüentemente encontradas próximas da superfície das proteínas, onde os grupos peptídicos dos resíduos centrais de aminoácidos na dobra podem formar ligações de hidrogênio com a água (Figura 3).

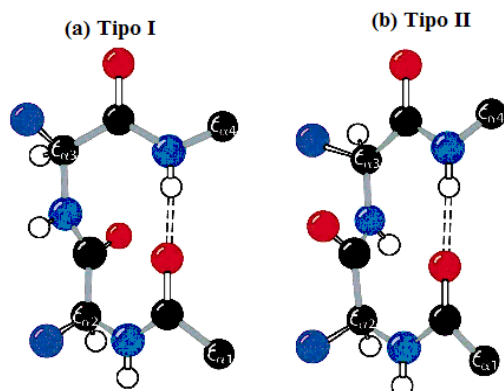


Figura 3. As voltas β dos tipos I e tipo II são as mais comuns; o tipo I ocorre com uma frequência de mais do dobro que o tipo II. As voltas β do tipo II sempre apresentam glicina como terceiro resíduo. Observe a ligação de hidrogênio entre os grupos peptídicos do primeiro e quarto resíduos.

5.2 Alças ômega(Ω). A maioria das proteínas com mais de 60 resíduos de aminoácidos contém uma ou mais alças de 6 a 16 resíduos de aminoácidos denominadas alças Ω . Essas alças apresentam a forma de ferradura da letra grega maiúscula ômega. Formam estruturas compactas em que as cadeias laterais tendem a preencher suas cavidades internas. As alças Ω localizam-se na superfície das proteínas globulares e desempenham funções cruciais tanto no dobramento da cadeia quanto em processos de reconhecimento molecular.

6. Domínios e estruturas supersecundárias das proteínas

As proteínas globulares apresentam unidades de enovelamento estáveis semi-independentes denominadas **domínios** (figura 4). Os domínios apresentam núcleo hidrofóbico e superfície polar que são conectados por segmentos ou voltas da cadeia polipeptídica. Os domínios são considerados as unidades funcionais e estruturais de uma proteína. Os domínios apresentam cerca de 100 a 150 resíduos de aminoácidos. Desta forma o conceito de **estrutura terciária** é ampliado, referindo-se tanto ao dobramento dos domínios, quanto ao arranjo final dos domínios na proteína.

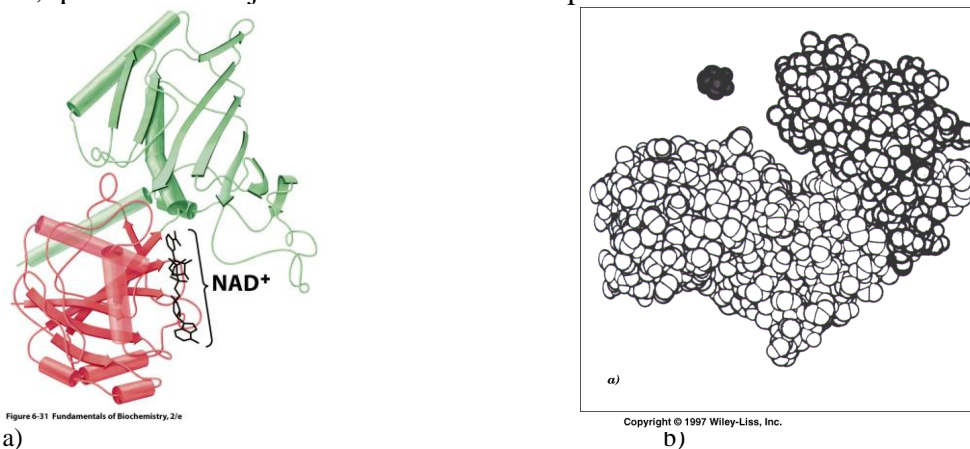


Figura 4. Estruturas dos domínios da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em que se destacam dois domínios (Verde e vermelho). B. Estruturas dos dois domínios da enzima hexoquinase.

6.1. Estrutura supersecundária ou motivos estruturais

Muitas proteínas apresentam combinações de estruturas em α -hélice e de estruturas folha β -pregueada e em proporções variadas. A combinação dessas estruturas secundárias produz diversos arranjos estruturais na estrutura protéica denominadas **estruturas supersecundárias ou motivos** cujas variações são:

- a) Motivo $\beta\alpha\beta$. Nesse motivo duas cadeias polipeptídicas em disposição de folha- β paralela são conectadas por um segmento polipeptídico em α -hélice (figura 5a);
- b) meandro β . Cadeias polipeptídicas em disposição de folha- β antiparalela são conectadas por voltas reversas (figura 5b);

c) unidade $\alpha\alpha$. Consiste de duas cadeias polipeptídicas em α -hélice com disposição antiparalela conectadas por voltas (figura 5c);

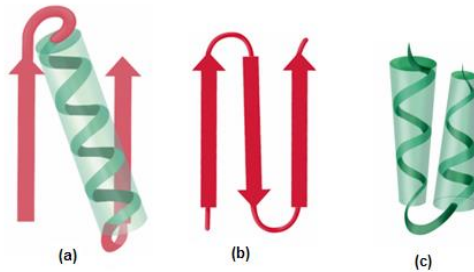


Figura 5. Estruturas supersecundárias. O item a apresenta um motivo $\beta\alpha\beta$, b um meando β e c. unidade $\alpha\alpha$.

Os domínios das proteínas globulares consistem de duas ou mais camadas de elementos de estruturas supersecundárias ou motivos. A razão para isso é que pelo menos duas dessas camadas são necessárias para proteger o cerne hidrofóbico de um domínio do ambiente aquoso. Os motivos podem ter tanto significado funcional quanto estrutural.

7. Estabilização da estrutura terciária

A estrutura terciária é estabilizada tanto por ligação covalente quanto não covalente. Essas interações ocorrem entre os grupos da cadeia lateral dos aminoácidos que estão distantes na cadeia polipeptídica, mas são aproximados no dobramento ou enovelamento do polipeptídeo (figura 6).

- Ligação covalente. A ligação covalente mais frequentemente encontrada em proteínas é a ponte dissulfeto. Essa ligação ocorre entre os grupos sulfidrilas (SH) de resíduos de cisteína, que por oxidação formam um resíduo de cistina. Essa ligação é encontrada em proteínas que tem atuação fora do citossol celular ou estão voltadas para a matriz extracelular como as proteínas de membrana, as α -queratinas. No meio extracelular, essas ligações protegem parcialmente a estrutura das proteínas de modificações adversas de pH e das concentrações de sais. As proteínas do meio intracelular raramente contêm ligação dissulfeto (S-S). Isso se deve ao meio intracelular apresentar altas concentrações de agentes redutores.
- Interações não covalentes: As interações não covalentes encontradas na estabilização da estrutura terciária são: ponte de hidrogênio, van der Waals, dipolo-dipolo e interação hidrofóbica. Dessas, a interação hidrofóbica é que mais contribui na estabilização da conformação das proteínas globulares, proporcionando a que se enovele de forma tão compacta, mantendo um interior apolar inacessível a moléculas de água.
- As pontes de hidrogênio são interações eletrostáticas que ocorrem quando um hidrogênio covalentemente ligado a um átomo eletronegativo é compartilhado com outro átomo eletronegativo. Nas proteínas globulares essa interação ocorre entre os resíduos de aminoácidos polares que apresentam um hidrogênio ligado covalentemente a um átomo eletronegativo, normalmente oxigênio ou nitrogênio.

é compartilhado com outro átomo eletronegativo da cadeia lateral de outro aminoácido.

- As interações hidrofóbicas nas proteínas globulares ocorrem quando os grupos apolares dos aminoácidos se acomodam no interior de uma estrutura dobrada, escapando do contato com a água.
- A ligação iônica ocorre com grupos da cadeia lateral dos aminoácidos básicos e ácidos, que apresentam cargas elétricas. Na ligação iônica um grupo com carga negativa (aminoácido ácido) atrai outro com carga positiva (básico), como por exemplo, a tração entre o COO^- do ácido aspártico com o $-\text{NH}_3^+$ da arginina.

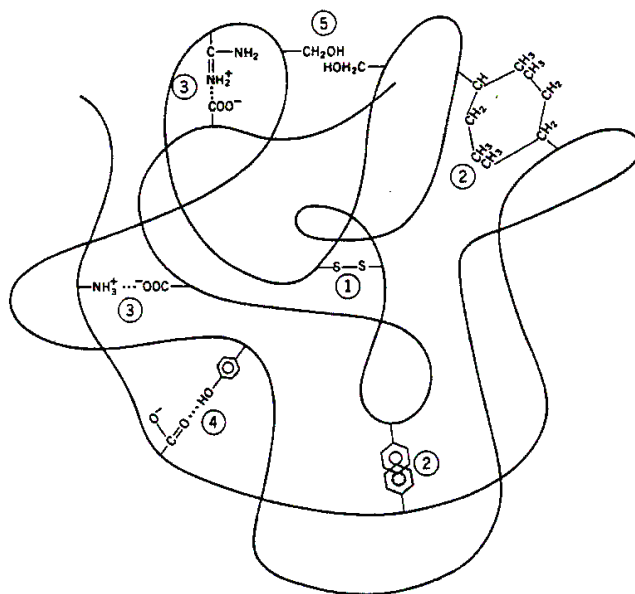


Figura 6. Interações químicas covalentes e não covalentes que estabilizam a estrutura terciária. 1. Ligação covalente, ponte dissulfeto; 2 interação hidrofóbica; 3. ligação iônica; 4. Pontes de hidrogênio; 5. van der Waals (Dipolo-dipolo).

8. A estrutura quaternária

A estrutura quaternária é a conformação das proteínas que apresentam mais de uma cadeia polipeptídica, não interligadas por ligação covalente. Sendo assim, é a estrutura tridimensional das proteínas oligoméricas. Cada cadeia polipeptídica das proteínas oligoméricas é denominada **subunidade**. Quando duas ou mais cadeias das proteínas oligoméricas são iguais, elas são denominadas **protômeros**. A hemoglobina foi a primeira proteína oligomérica que teve a estrutura tridimensional determinada.

A hemoglobina é formada por quatro cadeias polipeptídicas, cada uma delas apresentando um grupo heme. Nos grupos heme de cada cadeia os átomos de ferro estão no estado ferroso (Fe^{2+}). A porção protéica, denominada globina, consiste de duas cadeias α (141 resíduos cada) e duas cadeias β (146 resíduos cada). As subunidades da hemoglobina estão dispostas em pares simétricos (figura 7), cada par apresentando uma subunidade α e uma subunidade β . Os protômeros $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e $\beta 1$ e $\beta 2$ apresentam pouca interação entre si, sendo maior o contato entre as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ e $\alpha 2$ e $\beta 2$ (figura 7).

Dessa forma, a hemoglobina pode ser descrita como uma proteína heterodimérica, formada por protômeros $\alpha\beta$.

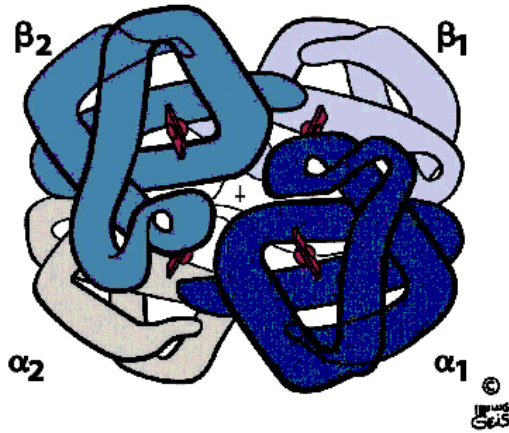


Figura 7 A estrutura quaternária da hemoglobina a) Ocorre mais contatos entre as subunidades α e β . Os grupos heme (em vermelho) estão relativamente afastados uns dos outros.

9. Desnaturação

As proteínas apresentam uma seqüência linear de resíduos de aminoácidos que se enovela adquirindo sua estrutura tridimensional funcionalmente ativa denominada conformação **nativa**. Alterações físicas e químicas no meio em que se encontra a proteína podem resultar em modificações estruturais que afetam a sua função biológica. A perda da estrutura tridimensional nessas condições é denominada **desnaturação**. O estado desnaturado da proteína não necessariamente corresponde a um desenovelamento completo de sua cadeia polipeptídica.

As proteínas possuem uma estrutura tridimensional bem definida que está relacionada com suas propriedades físicas e biológicas. A desnaturação envolve alterações nas estruturas quaternária, terciária e secundária de proteínas, mas não da primária. Existem vários agentes desnaturantes de proteínas, tais como: calor, ácidos, álcalis, solventes orgânicos, soluções concentradas de uréia e guanidina, detergentes e sais de metais pesados, etc.

Entre as alterações que se observam em decorrência da desnaturação protéica, pode-se citar:

- Diminuição da solubilidade;
- Perda de atividade biológica (por exemplo, da ação enzimática, da ação hormonal),
- Aumento da reatividade de radicais da cadeia polipeptídica;
- Alterações na viscosidade e coeficiente de sedimentação, etc.

A diminuição da solubilidade pode ser explicada pela exposição de radicais hidrofóbicos e outros que prejudiquem a interação proteína-água e favoreçam a interação proteína-proteína.

9.1 Desnaturação pelo calor. De maneira geral, o calor pode desnaturar a maioria das proteínas, uma vez que a agitação térmica afeta as interações que estabilizam a estrutura tridimensional das proteínas, como por exemplo, as pontes de hidrogênio. Se a

temperatura é aumentada lentamente, uma conformação protéica geralmente permanece intacta até que haja uma perda abrupta de estrutura (e função) em uma faixa estreita de temperaturas. Os efeitos do calor sobre as proteínas não são facilmente previsíveis. As proteínas termoestáveis das bactérias termofílicas evoluíram no sentido de serem funcionais sob temperaturas de fontes geotermiais (~100°C). No entanto, as estruturas dessas proteínas freqüentemente diferem muito pouco das estruturas de proteínas homólogas derivadas de bactérias como a *Escherichia coli*. De que modo essas pequenas diferenças promovem estabilidade estrutural em altas temperaturas é algo ainda não compreendido.

9.2 Desnaturação por agentes caotrópicos. Os agentes caotrópicos são substâncias que rompem a estrutura de estabilização de macromoléculas, como proteínas. Como exemplos dessas substâncias têm-se uréia, tiouréia, guanidina (cloridrato de guanidina) e tiocianato (tiocianato de sódio). Os solventes orgânicos, uréia e os detergentes atuam principalmente promovendo o rompimento de interações hidrofóbicas que estabilizam as proteínas globulares.

9.3 Desnaturação por exposição da proteína a valores de pH extremos. As variações bruscas do valor de pH alteram o estado iônico da cadeia lateral dos aminoácidos, alterando, portanto a distribuição de cargas entre as cadeias laterais de aminoácidos ácidos que contêm a carboxila (COOH) e a cadeia lateral dos aminoácidos básicos, contendo o grupo amino (NH₂). Alteração nos valores de pH alteram a carga líquida desses grupos que estão interagindo para manter a estrutura terciária de uma proteína por ligação iônica.

9.4 Desnaturação por agentes redutores. Agentes redutores como o β-mercaptoetanol reduzem as ligações dissulfetos entre os resíduos de cistina nas cadeias polipeptídicas provocando o desenovelamento da cadeia polipeptídica.

9.5 Desnaturação por íons de metais pesados. Metais pesados como o mercúrio (Hg²⁺) e chumbo (Pb²⁺) afetam a estrutura protéica de várias formas. Podem romper as ligações iônicas com grupos carregados negativa mente. Os metais pesados também se ligam com grupos sulfidrílicos, um processo que pode resultar em profundas alterações das estruturas e funções protéicas. Por exemplo, o chumbo liga-se aos grupos sulfidrílicos de duas enzimas da via sintética da hemoglobina causando anemia severa. O chumbo se liga a resíduos de sulfidrila (SH) das proteínas plasmáticas como a albumina.

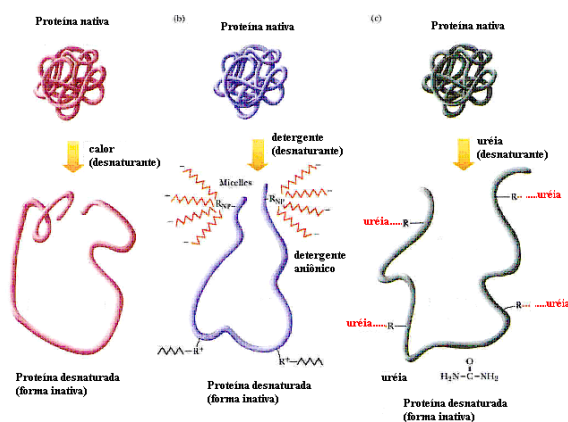


Figura 8. Desnaturação de uma proteína pelo calor, detergente aniônico e uréia.

10. Renaturação

A estrutura terciária de uma proteína globular é determinada pela sua seqüência de aminoácidos. A prova mais importante disso vem de experimentos mostrando que a desnaturação de algumas proteínas é reversível. Certas proteínas globulares desnaturadas pelo calor, exposição a soluções com valores extremos de pH ou a reagentes desnaturantes retornarão a sua estrutura nativa e a sua atividade biológica se elas forem expostas às condições em que a conformação nativa seja estável. Esse processo é denominado **renaturação**, que consiste no reenovelamento da cadeia polipeptídica a sua conformação nativa.

Um exemplo clássico é a desnaturação e a renaturação da ribonuclease. A ribonuclease purificada pode ser completamente desnaturada por exposição a uma solução concentrada de uréia em presença de um agente redutor. O agente redutor rompe as quatro ligações dissulfeto, produzindo oito resíduos de cisteínas e a uréia rompe as interações hidrofóbicas estabilizantes, liberando assim todo o polipeptídio de sua conformação enovelada. A desnaturação da ribonuclease é acompanhada por uma perda completa na atividade catalítica. Quando a uréia e o agente redutor são removidos, a ribonuclease desnaturada, na forma de uma cadeia de conformação aleatória, espontaneamente retorna à sua estrutura terciária correta, com a restauração completa de sua atividade catalítica (Figura 9).

O reenovelamento da ribonuclease é tão preciso que as quatro ligações dissulfeto intracadeia são reformadas nas mesmas posições que ocupavam na molécula nativa de ribonuclease. Cálculos matemáticos demonstram que os oito resíduos de cisteínas poderiam se recombinar ao acaso para formar ligações dissulfeto de 105 modos diferentes. De fato, uma distribuição essencialmente aleatória das ligações dissulfeto era obtida quando elas eram deixadas reformar-se em presença de um desnaturante, indicando que as interações fracas são necessárias para o posicionamento correto das ligações dissulfeto e o estabelecimento da conformação nativa.

Esse experimento clássico realizado por Christian Anfinsen em 1950 forneceu a primeira evidência de que a seqüência de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica contém toda a informação necessária para o enovelamento da cadeia em sua estrutura tridimensional nativa. Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se ribonuclease cataliticamente ativa sintetizada quimicamente. Isto eliminou a possibilidade de que algum contaminante minoritário na preparação de ribonuclease purificada de Anfinsen poderia ter contribuído para a renaturação da enzima, dissipando quaisquer dúvidas remanescentes de que essa enzima se enovela espontaneamente.

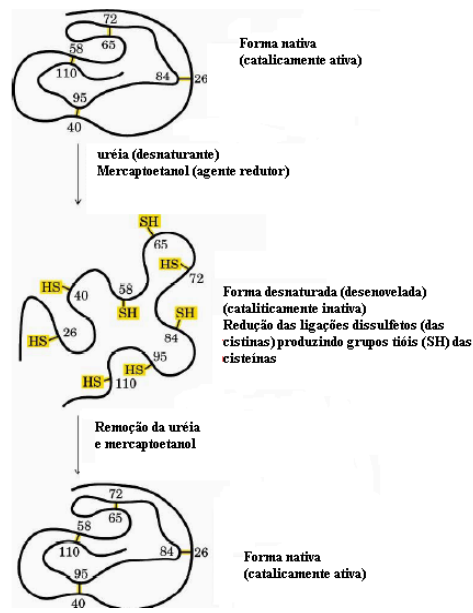


Figura 9. Renaturação da enzima ribonuclease

10.1 As evidências que confirmam a renaturação de uma proteína são:

- Aumento de sua solubilidade;
- Recuperação de sua atividade biológica;
- Formação de suas ligações dissulfeto (S-S)
- Recuperação de sua estrutura tridimensional.

11. Enovelamento espontâneo da cadeia polipeptídica das proteínas globulares

Nas células vivas, as proteínas são construídas a partir de aminoácidos em velocidades bastante altas. Por exemplo, as células de *E.coli* podem fazer uma molécula protéica biologicamente ativa contendo 100 resíduos de aminoácidos em cerca de 5 segundos a uma temperatura de 37°C. Como essa cadeia polipeptídica atinge a sua conformação nativa? Consideremos, de forma conservadora, que cada um dos resíduos de aminoácidos possa assumir até 10 diferentes conformações em média, o que daria 10^{100} conformações diferentes para o polipeptídeo. Consideremos, também, que a proteína se enovela espontaneamente por um processo aleatório no qual são tentadas todas as conformações possíveis em torno de cada ligação simples de sua cadeia polipeptídica, até que seja encontrada a sua forma nativa, biologicamente ativa. Se cada conformação fosse testada no tempo mais curto possível ($\sim 10^{-13}$ s, ou o tempo necessário para uma única vibração molecular), levaria 10^{77} anos para que todas as possíveis conformações pudessem ser testadas. Dessa forma, o enovelamento protéico não pode ser um processo completamente aleatório, tipo erro e tentativa.

Este questionamento foi feito por Cyrus Levinthal em 1968, sendo denominado **paradoxo de Levinthal**. A via de enovelamento de um grande polipeptídeo é inquestionavelmente complexa, e nem todos os princípios moleculares que orientam o processo são conhecidos. Dois modelos propõem estratégias moleculares envolvidas no enovelamento do polipeptídeo: o modelo hierárquico e o do glóbulo fundido. No **modelo**

hierárquico o processo de enovelamento segue uma sequência hierárquica, a saber: As estruturas secundárias locais formam-se inicialmente. Certas seqüências de aminoácidos se enovelam rapidamente em α -hélices ou folhas β , guiados pelos parâmetros que vimos em nossa discussão sobre a estrutura secundária. Seguem-se as interações envolvendo maiores distâncias entre, digamos, duas α -hélices que interagem para formar uma estrutura supersecundária estável. O processo continua até a formação de domínios completos e o completo enovelamento do polipeptídio.

Em um modelo alternativo, o enovelamento se inicia pelo colapso espontâneo do polipeptídio em um estado compacto, mediado por interações hidrofóbicas entre resíduos apolares. O estado resultante desse “colapso hidrofóbico” pode ter um conteúdo elevado de estrutura secundária, mas muitas cadeias laterais de aminoácidos não estarão totalmente fixas. Esse estado é freqüentemente denominado de **glóbulo fundido**.

A maioria das proteínas provavelmente se enovela por um processo que incorpora características dos dois modelos. Ao invés de seguir uma única via, uma população de moléculas peptídicas pode seguir diversos caminhos até um mesmo destino final, com a redução progressiva das espécies parcialmente enoveladas à medida que o enovelamento se aproxima da conformação final.

Defeitos no enovelamento protéico podem ser as bases moleculares de uma ampla gama de desordens genéticas humanas. Por exemplo, a fibrose cística é provocada por defeitos em uma proteína de membrana denominada regulador da condutividade transmembrânica da fibrose cística (CFTR), que atua como um canal para íons cloreto. A mutação mais comum que causa a fibrose cística é a deleção de um resíduo de fenilalanina na posição 508 da CFTR, o que causa um enovelamento incorreto. Muitas das mutações relacionadas com doenças no colágeno também provocam enovelamentos defeituosos. Uma maior compreensão do processo de enovelamento protéico pode levar a novas terapias para essas e muitas outras doenças.

11.1 Enovelamento não espontâneo

O enovelamento das proteínas é um processo complexo que envolve a participação de muitas proteínas, como enzimas e chaperoninas. Por muito tempo pensou-se que a conformação das proteínas globulares dependia exclusivamente das suas estruturas primárias. Nem toda cadeia polipeptídica consegue atingir um enovelamento espontaneamente, em muitos casos o enovelamento requer a ação de proteínas especializadas como as **proteínas assistentes moleculares**, que interagem com polipeptídios parcialmente enovelados ou inadequadamente enovelados, facilitando as vias corretas de enovelamento ou fornecendo microambientes, cujo enovelamento possa ocorrer.

A primeira classe das **proteínas assistentes moleculares** é uma família de proteínas denominada proteínas do choque térmico 70 (HSP 70 - heat shock proteins” de peso molecular 70.000). As HSP são uma família de proteínas com atividade de chaperone. Essas proteínas estão envolvidos em diversas etapas do metabolismo de proteínas como a síntese, o enovelamento e o tráfico vesicular protéico. É bem documentada a participação das proteínas do choque térmico na apresentação de antígenos. As proteínas de choque térmico foram descritas pela primeira vez como parte da resposta da célula ao choque térmico e a situações de estresse, tais como hipóxia. As proteínas Hsp70 ligam-se a

resíduos hidrofóbicos de polipeptídios desenovelados, prevenindo a formação de enovelamentos incorretos. Dessa forma, as Hsp70 protegem as proteínas que foram desnaturadas pelo calor e peptídeos que estão sendo sintetizados (e ainda estão desenovelados).

As proteínas Hsp70 também impedem o enovelamento de certas proteínas que devem permanecer desenoveladas até serem translocadas através de membranas. Algumas proteínas assistentes moleculares também facilitam a montagem da estrutura quaternária de proteínas oligoméricas. As proteínas Hsp70 ligam-se e liberam polipeptídios em um ciclo que também envolve diversas outras proteínas (incluindo uma classe chamada Hsp40) e a hidrólise do ATP. Em *E. coli* o enovelamento do polipeptídio é auxiliado pelas proteínas assistentes DnaK e DnaJ, homólogas das proteínas eucarióticas Hsp70 e Hsp40. As proteínas DnaK e DnaJ foram inicialmente identificadas como proteínas necessárias para a replicação *in vitro* de certas moléculas de DNA virais (daí a designação “Dna”).

A segunda classe de assistentes moleculares é denominada **chaperoninas**, que são complexos protéicos bastante elaborados, necessários para o enovelamento de diversas proteínas celulares. Em *E. coli*, estima-se que 10 a 15% das proteínas celulares necessitam de um sistema de assistentes de enovelamento residente, denominado GroEL/GroES, para o enovelamento sob condições normais (até 30% das proteínas necessitam desse sistema quando as células são estressadas pelo calor).

Essas proteínas se tornaram inicialmente conhecidas quando se verificou serem necessárias para o crescimento de certos vírus bacterianos (daí a designação “Gro”). Proteínas desenoveladas ligam-se a bolsões no complexo GroEL, que estão temporariamente fechados pela tampa GroES. O GroEL sofre alterações conformacionais substanciais, acopladas à hidrólise de ATP e à ligação e liberação de GroES, que promove o enovelamento do polipeptídio ligado. Embora a estrutura do assistente de enovelamento GroEL/GroES seja conhecida, muitos detalhes de seu mecanismo de ação permanecem sem resolução.

Finalmente, as vias de enovelamento de diversas proteínas necessitam de duas enzimas que catalisam reações de isomerização. A **Proteína dissulfeto isomerase (PDI)** é uma enzima amplamente distribuída que catalisa a troca ou embaralhamento das ligações dissulfeto até que as ligações da conformação nativa sejam formadas. Entre as suas funções, PDI catalisa a eliminação de intermediários de enovelamento com ligações dissulfeto não apropriadas. A enzima **Peptídeo prolil cis-trans isomerase (PPI)** catalisa a interconversão dos isômeros cis e trans de ligações peptídicas da prolina, que pode ser uma etapa lenta no enovelamento de proteínas que contenham algumas ligações na conformação cis.

12. doenças priônicas ou encefalopatias espongiformes

A proteína príon celular (PrPc), presente em todas as células do corpo em condições normais, atua na proteção dos neurônios da apoptose (morte celular) e na diferenciação neuronal. Mutações no gene *prnp*, faz com que seja formado um PrPc defeituoso o PrPsc que desencadeia as doenças priônicas. O PrPsc atua ainda como um “molde” que, ao entrar em contato com o PrPc presente nas células, faz com que a proteína normal se altere, tornando-a também um príon. O PrPsc causa o acúmulo de aglomerados no cérebro

denominados **placas amilóides**, que resulta na morte de muitos neurônios (quadro semelhante ao do Mal de Alzheimer).

Prion, do inglês *proteinaceous infectious particle* (partícula proteínica infecciosa) é uma proteína celular (PrPc) que pode desenvolver papel de agente infeccioso (PrPsc). Sua proliferação é extremamente rápida e causa as denominadas encefalopatias espongiformes, doenças cujo sintoma mais comum é a demência e perda da coordenação motora.

Os príons patogênicos são conformações alteradas de proteínas normais que estão presentes no cérebro de mamíferos. Conforme propôs o neurologista americano Stanley Prusiner, eles são capazes de contaminar seres vivos e se auto-replicar em seu interior. Prusiner concluiu que este agente etiológico era diferente dos demais agentes infecciosos (fungos, bactérias e vírus) ao perceber que a propagação das doenças em cirurgias ocorria mesmo com a utilização de métodos comuns de assepsia sobre os instrumentos, embora fosse interrompida quando se utilizavam métodos de desnaturação ou degradação protéica, sugerindo que o agente transmissor seria constituído basicamente por proteína. Os príons foram identificados como causadores de várias doenças neurológicas letais, geralmente com períodos de incubação prolongados, que antes eram atribuídas a vírus de lenta proliferação.

O gene PrPn codifica a proteína celular prion e é altamente conservado evolutivamente no genoma de mamíferos, indicando a importância da proteína não patogênica para o organismo. A constituição básica da proteína é de uma região amino-terminal desordenada e uma região globular carboxi-terminal. Em condições normais, o gene codifica a proteína do príon celular (PrPc), não patogênica. Contudo, em condições próprias o PrPc adquire nova conformação denominada PrPsc, que é a forma patogênica. Como as proteínas priônicas de mamíferos guardam grandes semelhanças quanto à sua conformação, a infecção interespecífica é possível.

12.1 Diferenças entre PrPc e PrPsc

As diferenças entre a forma celular e scrapie da proteína príon são resultantes apenas das diferentes conformações moleculares. Essa alteração na conformação tem como consequência a não-funcionalidade da PrPsc, mas a ativação de seu poder infeccioso. Deve-se frisar, contudo, o fato de que a toxicidade da PrPsc é restrita ao sistema nervoso. Sua proliferação em outros tecidos é possível, mas não considerada patogênica. Deve-se destacar o perigo que infecções por prion representam no âmbito sócio-global, já que os príons são mais resistentes à destruição que qualquer outro agente patogêncio conhecido. Eles são mais duradouros e estáveis que os esporos de anthrax e não podem ser neutralizados por radiação. Além disso, não existem procedimentos de rotina que visem detectá-los. Assim, a contaminação por prion pode ser mais poderosa, ainda que manifestada com menor intensidade a curto intervalo de tempo, que infestações por anthrax e smallpox. Contra estas últimas existe ainda a possibilidade de se produzirem vacinas, e a taxa de mortalidade não chega aos 30%. Dessa forma, príons podem ser armas biológicas extremamente potentes e, no entanto, não recebem a devida atenção dos governos

12.2 Principais diferenças geradas pela alteração conformacional:

- (3%). Na PrPsc, por sua vez, predomina a conformação- β , seguindo a proporção de 43-54% e 17-30%, respectivamente;
- Apenas a proteína PrPsc é amilóide, ou seja, tem a capacidade de formar naturalmente grandes agregados insolúveis de proteína. Em oposição, a PrPc é considerada globular e altamente solúvel.

Os príons patogênicos são responsáveis pelas doenças classificadas como encefalopatias espongiformes, que recebem este nome devido ao aspecto de esponja adquirido pelo tecido nervoso cerebral acometido pelas doenças. As variações características de cada enfermidade se devem apenas a variações no tempo de incubação, distribuição geográfica das lesões e potencial infeccioso. Estudos mais aprofundados acerca destas doenças podem, inclusive, auxiliar no entendimento de outras patologias que acometem o cérebro e que ainda não estão completamente desvendadas, como o mal de Parkinson e o mal de Alzheimer.

Como se dá a morte celular desencadeada pela infecção priônica? As moléculas de príon patogênicas, diferentemente da forma celular (globular), são amilóides. Em outras palavras, elas formam naturalmente grandes agregados insolúveis e fibrosos de proteína. Não se sabe ao certo exatamente como essas proteínas causam doenças, mas acredita-se que elas se acumulem nos lisossomos. Assim, o acúmulo protéico nos lisossomos causaria o rompimento destas organelas e a conseqüente digestão citoplasmática, levando à morte das células afetadas. Formar-se-iam, assim, os grandes espaços no tecido nervoso doente, característicos das encefalopatias espongiformes.

Kuru: é uma doença cerebelar subaguda com ataxia (perda da coordenação muscular) e de rápida evolução (1 ano até o óbito), com apresentação de tremor. Acomete crianças e mulheres adultas, e se acredita ser disseminada pelos rituais de canibalismo da tribo Fore, que habita uma região da Papua-Nova Guiné. As maiores quantidades de tecido cerebral são dadas às crianças e às mulheres, justificando a epidemiologia da doença. Atualmente, a cessação da prática de canibalismo fez com que o Kuru quase desaparecesse;

Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD): têm sido encontrada em diversas partes do mundo, com uma incidência anual de 0,5 caso por milhão de pessoas. Acredita-se que 10 a 15% dos casos da doença sejam hereditários. Na maioria dos pacientes ocorre, de forma progressiva, um prejuízo mental, embora cerca de 20% dos pacientes tenham uma fase inicial extremamente rápida (alguns dias). A tríade clínica é de demência progressiva, mioclonias (contrações rápidas das extremidades e do tronco causando movimento involuntário dos membros e do corpo) e eletroencefalografia típica. Embora o quadro da CJD seja muito característico, outras doenças podem produzir quadros semelhantes. A doença que mais comumente se confunde com CJD é a doença de Alzheimer (DA), especialmente a DA familiar, com presença de mioclonias. A CJD é considerada a vertente humana da famigerada doença da vaca louca.

Doença de Gerstmann, Sträussler e Scheinker (GSS): ocorre ataxia cerebelar progressiva, tremores, disartria (distúrbio da articulação da fala) e diminuição de reflexos profundos. A evolução clínica é mais lenta se comparada com a CJD, atingindo pacientes de 30 a 60 anos, com sobrevida média de 5 anos após o início dos sintomas. O EEG pode

ser normal ou discretamente lentificado e os exames de neuroimagem (CT e RNM) mostram atrofia cerebral e cerebelar. Estima-se que a incidência da GSS seja de 2 casos em cada 100 milhões de habitantes.

13. Conclusões sobre a estrutura tridimensional de proteínas

Do estudo das proteínas fibrosas podemos fazer as seguintes conclusões:

1. Além do seu esqueleto covalente, ou seja, sua seqüência de aminoácidos, as proteínas apresentam uma estrutura secundária característica, ou seja, o arranjo espacial da cadeia polipeptídica;

2. A estrutura secundária das proteínas, como a α -hélice e β - conformação, é o resultado do arranjo automático e espontâneo do seu conteúdo e seqüência de aminoácidos. A estrutura secundária característica de uma proteína é a sua forma estável em um conjunto de condições biológicas;

3. A conformação tridimensional das proteínas fibrosas está adaptada à função biológica que elas desempenham.

14. Resumo

A mioglobina é uma proteína globular do tipo hemoproteína, cuja função é armazenar oxigênio e facilitar a difusão deste gás para as mitocôndrias do tecido muscular. A hemoglobina, por sua vez, é uma hemoproteína oligomérica, formada por quatro cadeias polipeptídicas (α e β), cuja função é transportar oxigênio no sangue, carregando esse gás dos pulmões para os tecidos. A estrutura tridimensional da mioglobina é a estrutura terciária, que é definida como sendo o arranjo espacial de todos os átomos dessa molécula, incluindo a cadeia lateral de todos os aminoácidos, ou o enovelamento da cadeia polipeptídica, assumindo um aspecto globular ou esférico. As proteínas globulares se enovelam guardando no seu interior a maioria dos aminoácidos apolares e na superfície os aminoácidos polares. A estrutura terciária é mantida por interações químicas covalentes e não covalentes. A ligação covalente mais frequentemente encontrada em proteínas é a ligação dissulfeto (S-S). Essa ligação ocorre com os grupos sulfidrilas (SH) de resíduos de cisteína. As interações não covalentes que mantêm a estrutura terciária são: pontes de hidrogênio, ligação iônica e interação hidrofóbica. Dessas, a interação hidrofóbica é a que mais contribui na estabilização da estrutura terciária. A desnaturação protéica, que é a perda da estrutura tridimensional da proteína globulares quando expostas a agentes desnaturantes, envolve alterações nas estruturas quaternária, terciária e secundária de proteínas, mas não na estrutura primária. Existem vários agentes desnaturantes de proteínas, tais como: agitação mecânica de uma solução protéica, exposição da proteína a temperaturas elevadas, a ácidos fortes, a solventes orgânicos, a soluções concentradas de uréia e guanidina, a detergentes e a sais de metais pesados. Algumas proteínas globulares desnaturadas pelo

calor, exposição a soluções com valores extremos de pH ou a reagentes desnaturantes retornarão a sua conformação nativa e a sua atividade biológica se elas forem expostas às condições em que a conformação nativa seja estável. Esse processo é denominado renaturação. Assim, a renaturação é o reenovelamento da cadeia polipeptídica a sua conformação nativa, quando o agente desnaturante é retirado do meio em que a proteína se encontra.

16. Referências bibliográficas

1. BERG, J. M, TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. Bioquímica. 5ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1992.
2. DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. Editora Edgard Blücher LTDA, 1998.
3. NELSON, D.L, COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 2ª edição, São Paulo, Sarvier, 1995.
4. NELSON, D.L, COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3ª edição, São Paulo, Sarvier, 2003.