



CRISTALOGRAFIA

Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos

Bioinformática



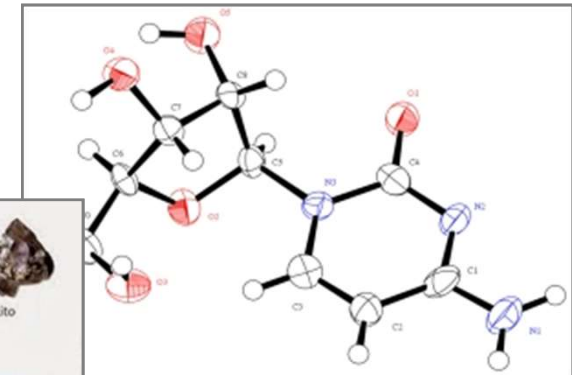
SETEMBRO | 2016

Alexandre Castelo Branco
PPGBiotec Doutorado

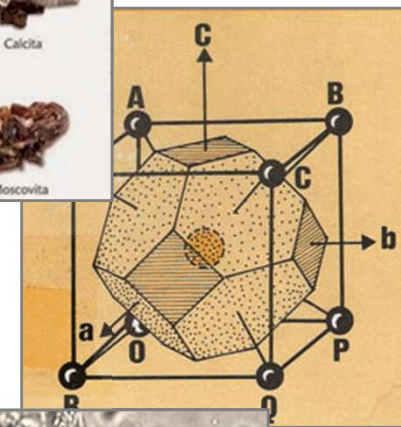
Lauziene Andrade Soares
PPGBiotec Mestrado

CRISTALOGRAFIA

Estudo matemático da estrutura molecular e cristalina dos cristais e suas relações com suas propriedades



clasf.com.br



ESTRUTURA PRIMÁRIA



ESTRUTURA SECUNDÁRIA



ESTRUTURA TERCIÁRIA



ESTRUTURA QUATERNÁRIA

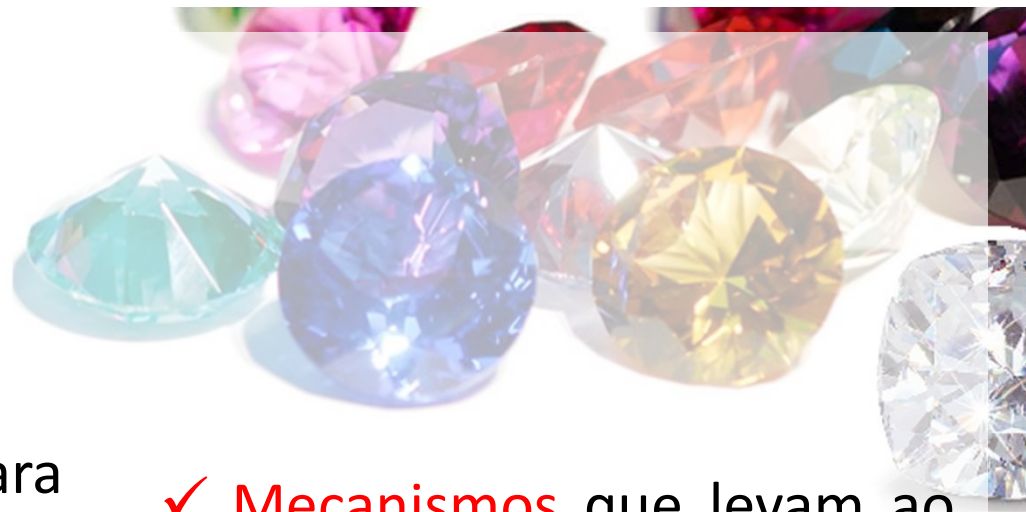


FUNÇÃO

BIOLOGIA ESTRUTURAL

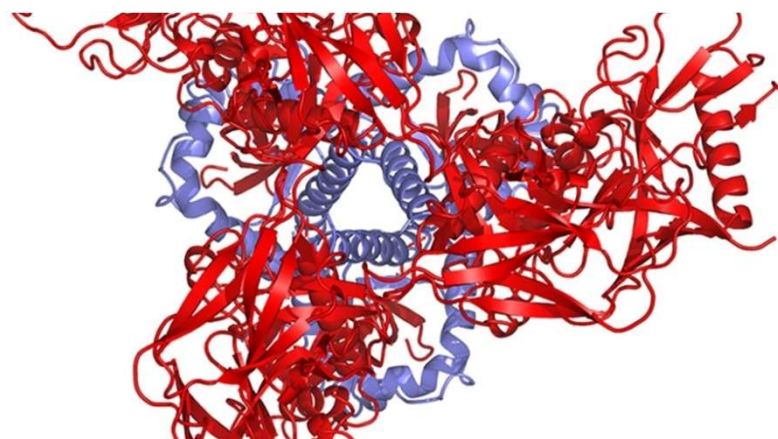
Lauziene Andrade

A CRISTALOGRAFIA E OS AVANÇOS NAS CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



- ✓ Contribuição para identificação e validação de **novos alvos moleculares** de interesse terapêutico
- ✓ Detalhamento de bases moleculares e compreensão de **interações fármacos – receptores**
- ✓ **Atual desafio: aumentar taxa de sucesso na identificação de entidades químicas de fármacos**

- ✓ **Mecanismos** que levam ao aparecimento de doenças
- ✓ SBDD: **Planejamento** de novos fármacos baseado na estrutura do receptor 3D





1743 - 1822 | **René Just Haüy**

Traité de Minéralogie

Conceito de **Célula Unitária dos Cristais**

“Cada fragmento pertence a uma lei geométrica”



CALCITE



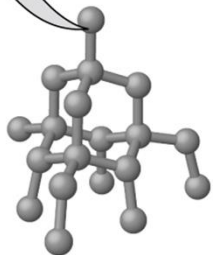
(Verli, 2014)

CRISTAIS

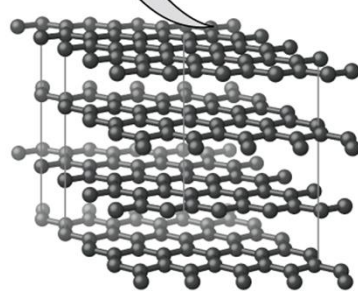
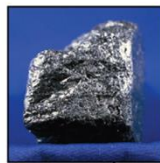
“Sólido feito de átomos, molécula ou íons, organizados em padrão tridimensional, que se repete em padrão regular.”

- ✓ Arranjos periódicos de uma única molécula até grandes complexos moleculares (ribossomos)
- ✓ Extremamente frágeis
- ✓ Tamanho variável (1 a 500 μm)

As formas dependem
das **Cargas Elétricas**,
do **Tipos de**
Moléculas, das
Condições de
Cristalização e do
Eixo do Cristal

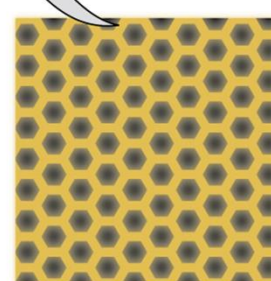
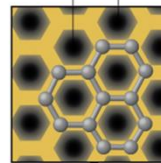


diamond

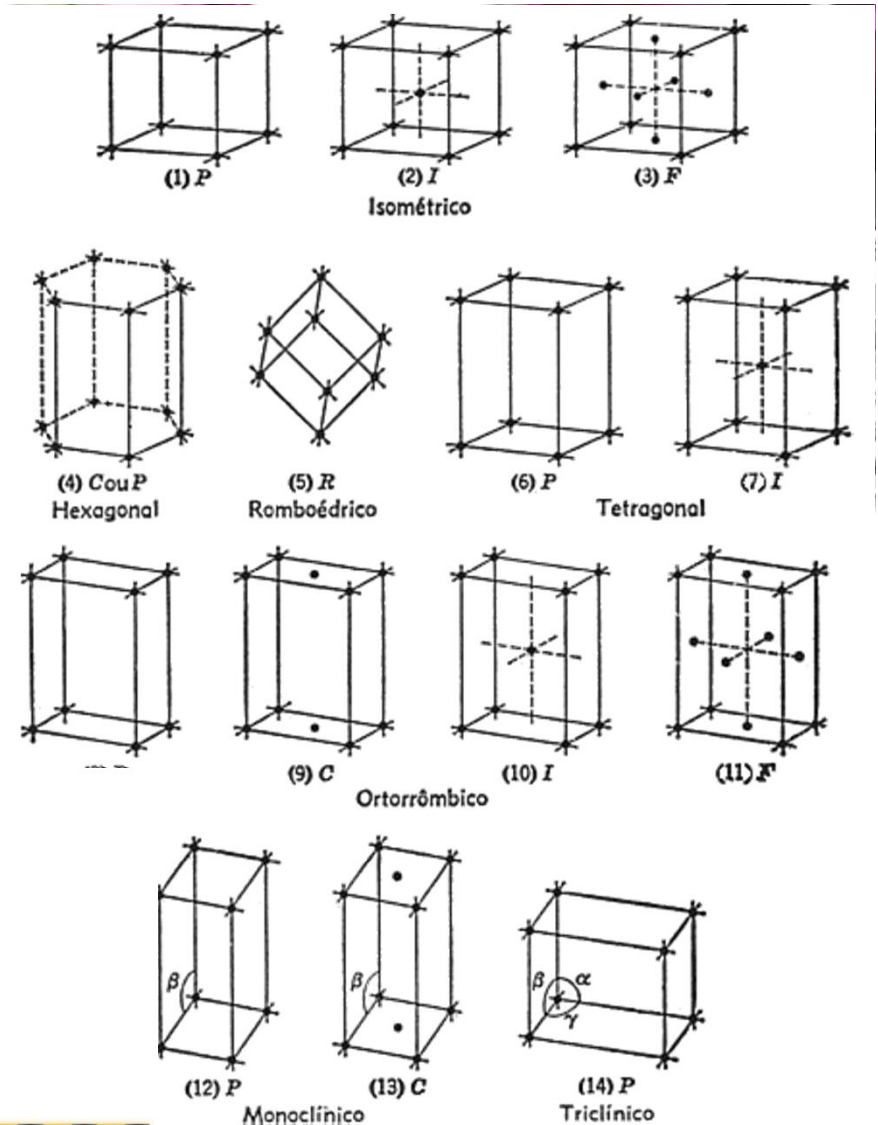


graphite

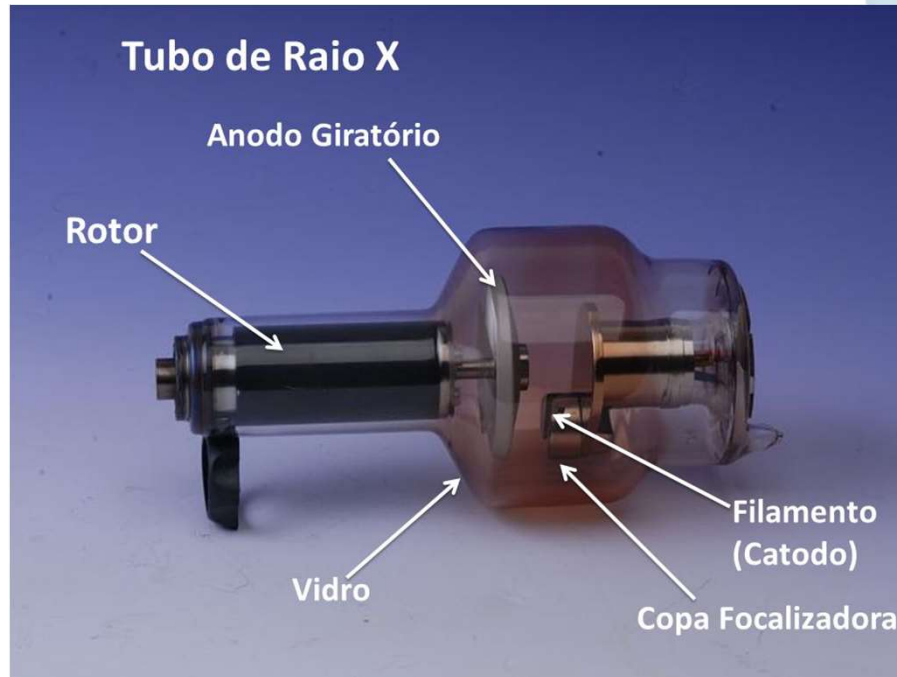
1.4×10^{-10} m
Distance between
center of atoms



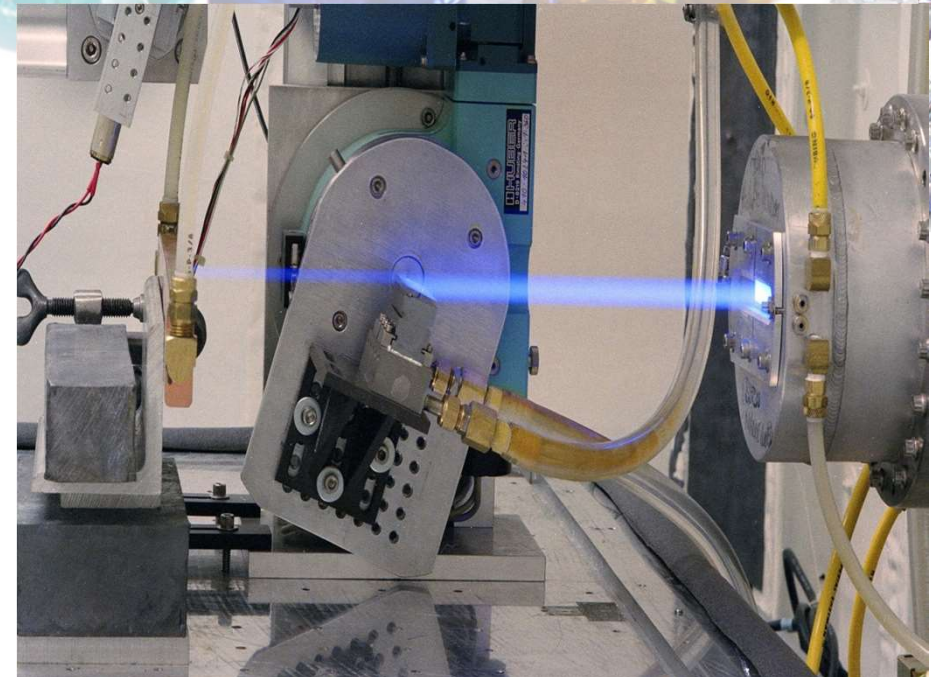
Graphite surface



A EVOLUÇÃO DA CRISTALOGRAFIA



slideplayer.com.br



bnl.gov

LUZ SÍNCOTRON

Acelerador de partículas poligonal que produz luz usando eletroímãs poderosos e ondas de radiofrequência para acelerar elétrons a uma velocidade próxima à da Luz em um anel de armazenamento

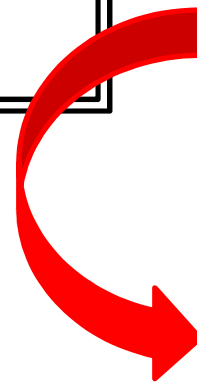
ABORDAGENS DA CRISTALOGRAFIA

TRADICIONAL:

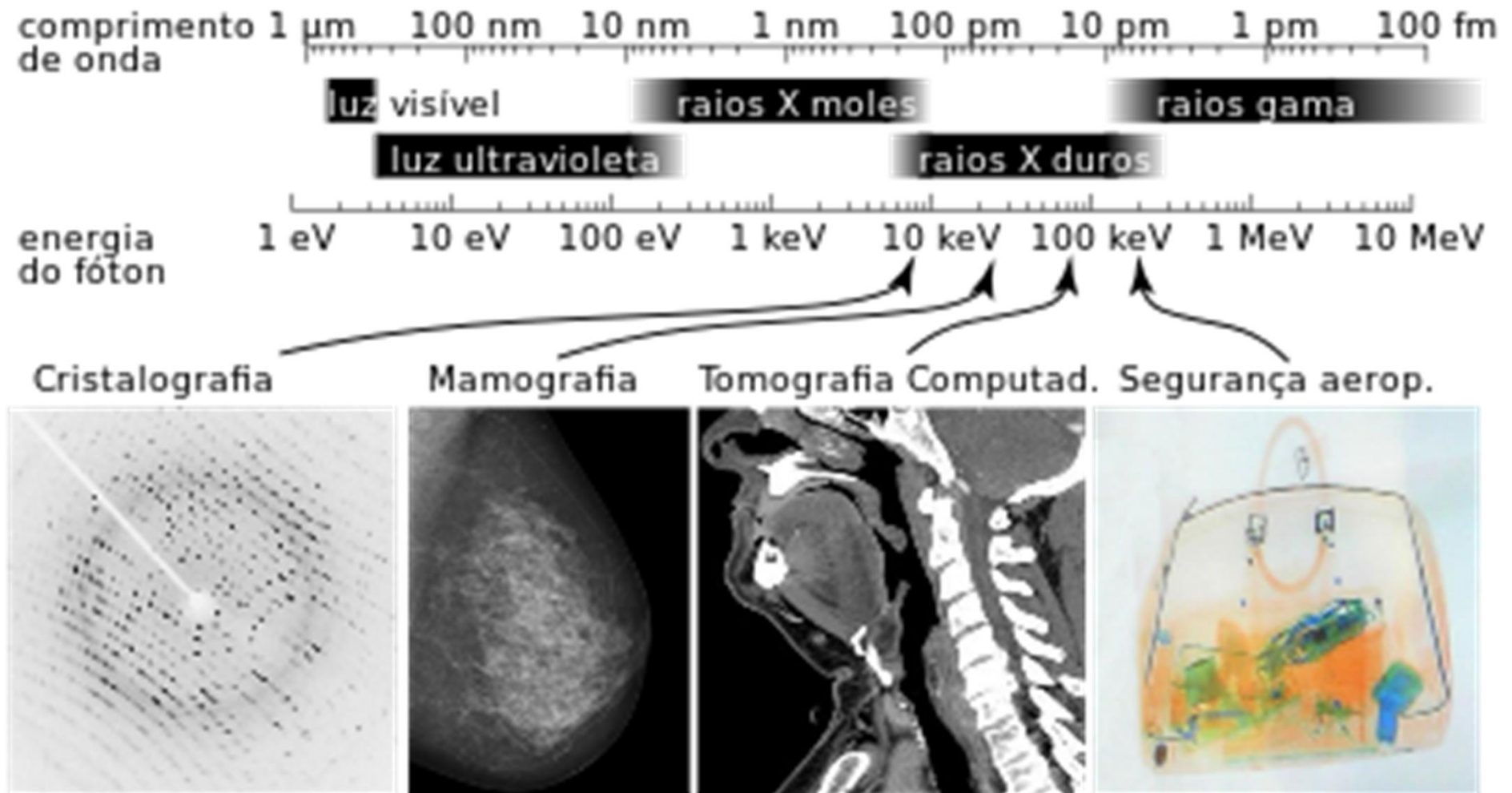
- Estruturas de pequenos conjuntos de macromoléculas
- Métodos bioquímicos e biofísicos

LARGA ESCALA:

- Genoma estrutural
- Estrutura de maior número de proteínas
- Métodos automatizados (Síncrotrons)



SÍNCROTON: RX 100 bilhões de vezes mais potente que RX convencional



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c4/X-ray_applications_pt.svg/410px-X-ray_applications_pt.svg.png

Lauziene Andrade

SÍNCROTRONS NO MUNDO



outerspace.com.br

-  África do Sul
-  Alemanha
-  Áustria
-  Bélgica
-  Dinamarca
-  Eslováquia
-  Espanha
-  Finlândia
-  França
-  Hungria
-  Itália
-  Noruega
-  Países Baixos
-  Reino Unido
-  Portugal
-  Polónia
-  República Checa
-  Rússia
-  Suécia
-  Suíça



Projeto Sirius

a nova fonte de luz síncrotron brasileira



Inls.cnpem.br

REFERÊNCIA EM CRISTALOGRAFIA EM LARGA ESCALA

Lauziene Andrade



844
Circunf.

43
Estações

24
H/Dia

6500
Visita/Ano



330
Mi£/Ano

2000
Publ/Ano

4
P. Nobel

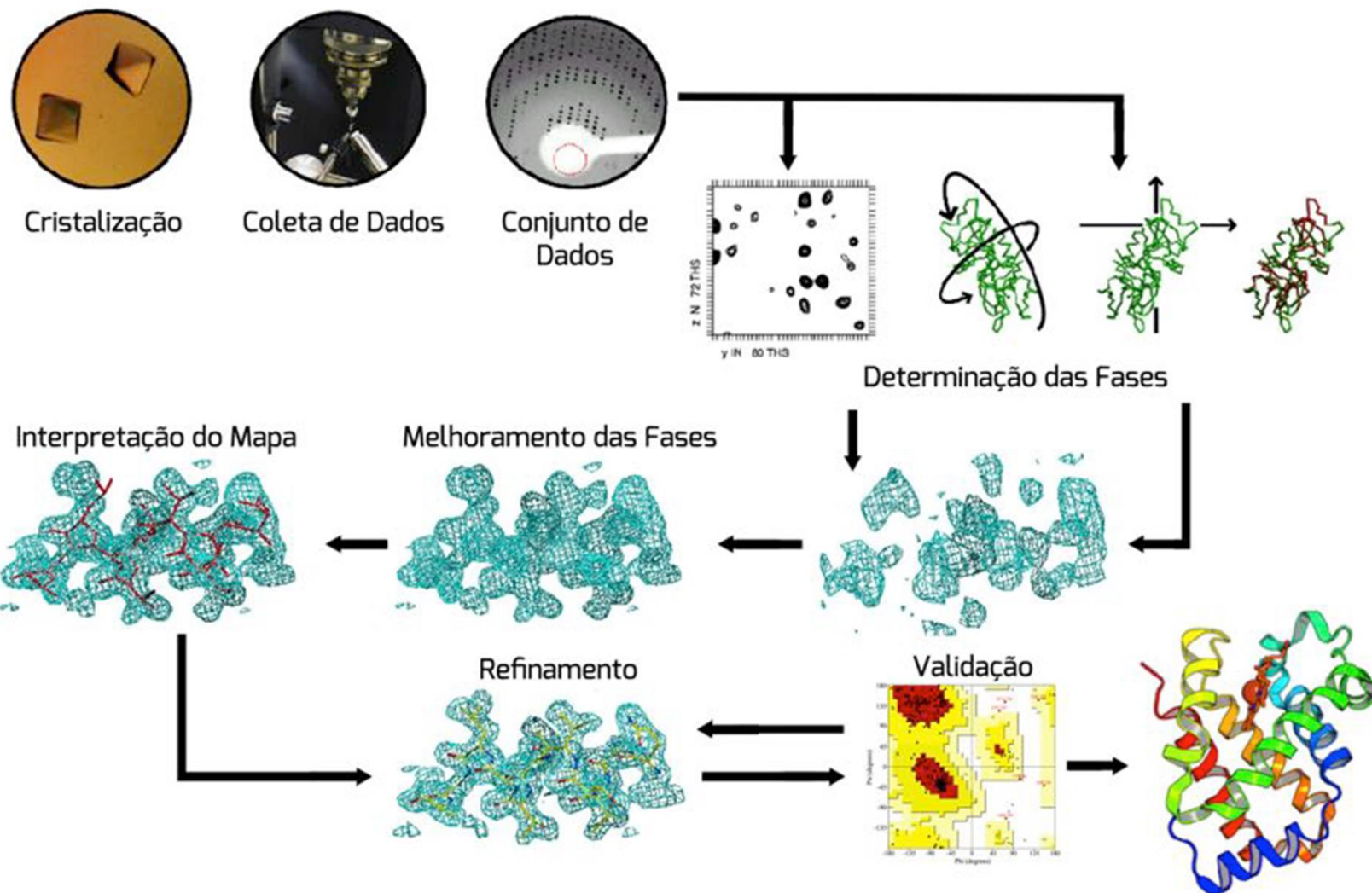
VISITA TÉCNICA ESRF



<https://www.youtube.com/watch?v=QA2KUY0w2KE>



AS ETAPAS DA DETERMINAÇÃO DE MODELOS NA CRISTALOGRAFIA



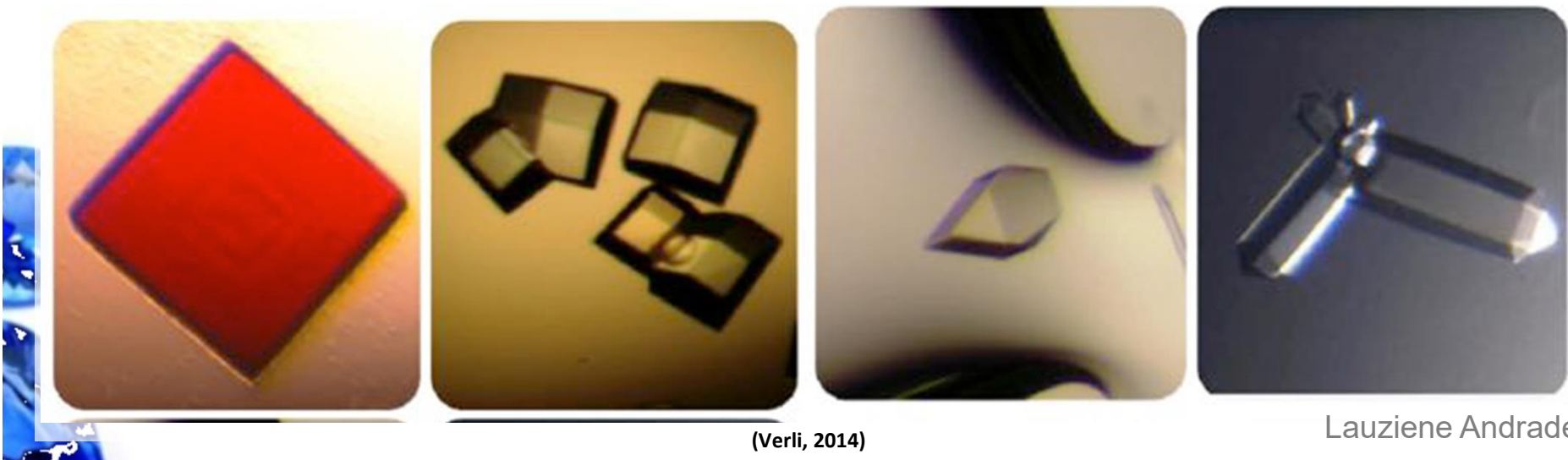
(Verli, 2014)

Lauziene Andrade

A CRISTALIZAÇÃO



- ✓ Precipitação lenta e ordenada de moléculas, formando cristais (estrutura 3D molecular)
- ✓ Condições controladas: solução supersaturada da proteína + agentes precipitantes + controle da temperatura + força iônica + variação de pH

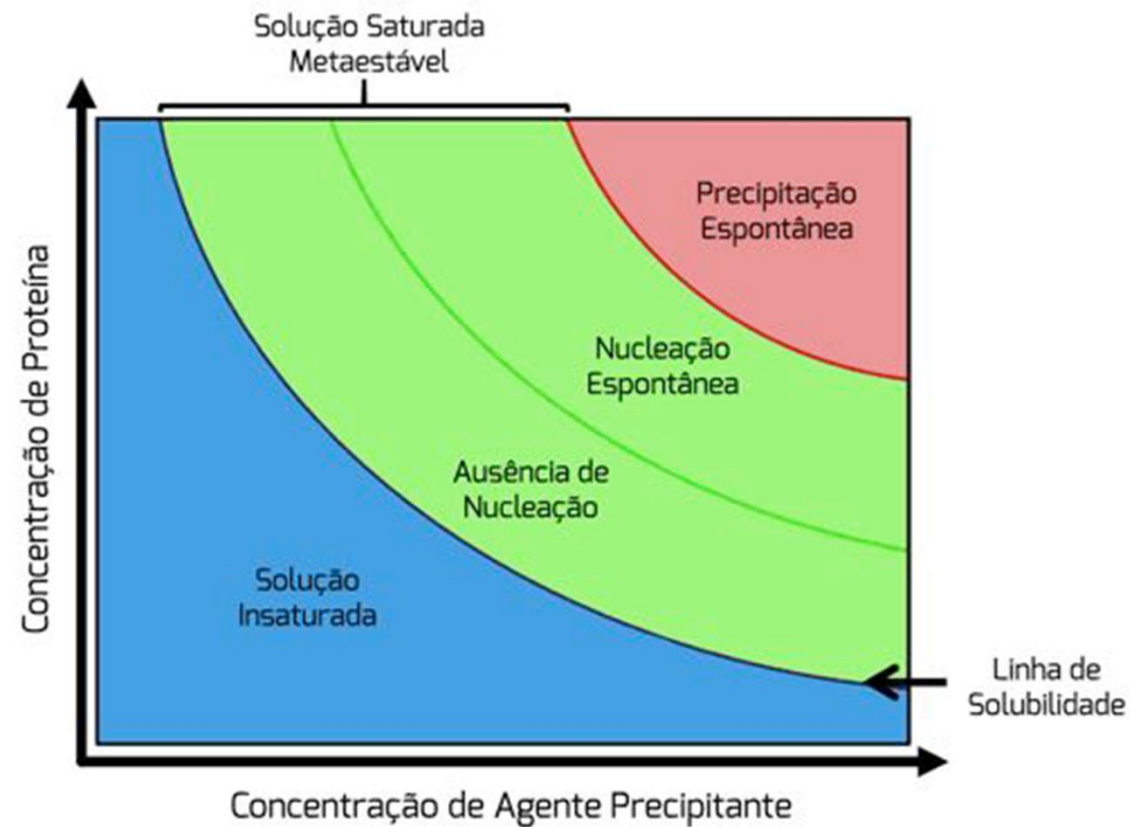


(Verli, 2014)

Lauziene Andrade

SOLUÇÃO EMPREGADA NA CRISTALIZAÇÃO

- ✓ Inicialmente: insaturada
- ✓ Para a cristalização: supersaturada
- ✓ Remoção de solvente + inclusão de agentes precipitantes



(Verli, 2014)

MÉTODOS DE CRISTALIZAÇÃO

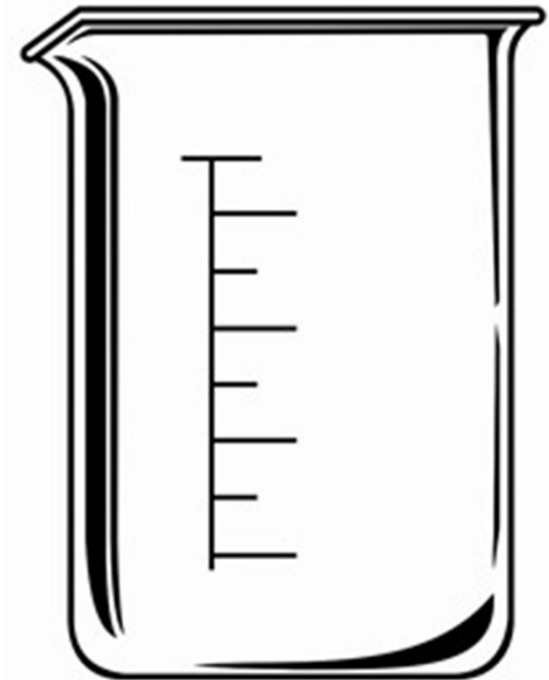
MISTURA EM RECIPIENTE FECHADO E ISOLADO

DIFUSÃO DE VAPOR:

- Gota suspensa
- Gota assentada

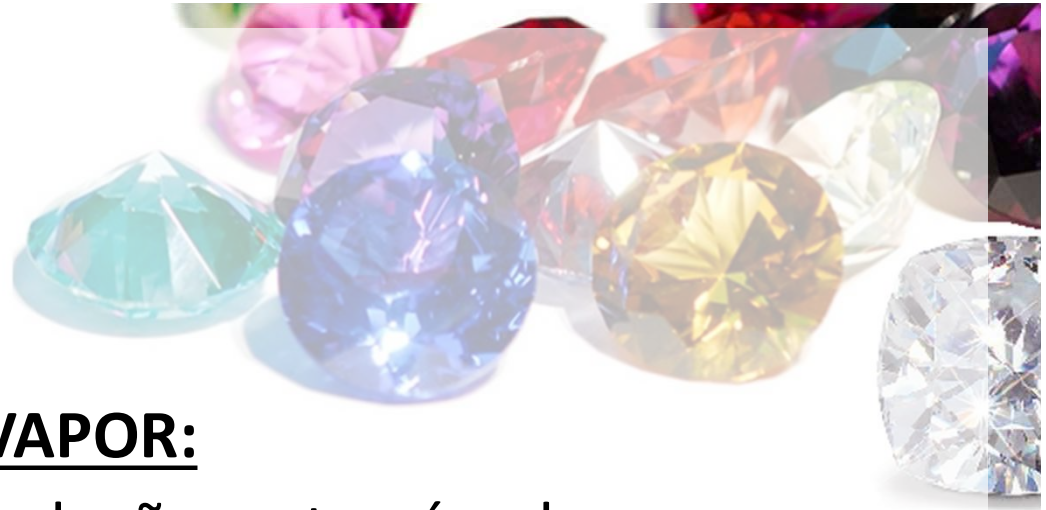


SOLUÇÃO PURA DE
PROTEÍNA
+
SOLUÇÕES DE
CRISTALIZAÇÃO
(agentes
precipitantes)



Lauziene Andrade

MÉTODOS DE CRISTALIZAÇÃO



MÉTODO DE DIFUSÃO DE VAPOR:

- ✓ Equilíbrio entre duas soluções através de vapor em sistema fechado
- ✓ Solução menos concentrada perde solvente
- ✓ Potenciais químicos das soluções se igualam
- ✓ Volume pequeno de proteína contra volume grande de solução precipitante
- ✓ Uma gota da solução de proteína a ser cristalizada é adicionada à solução tampão com agentes precipitantes e é equilibrada



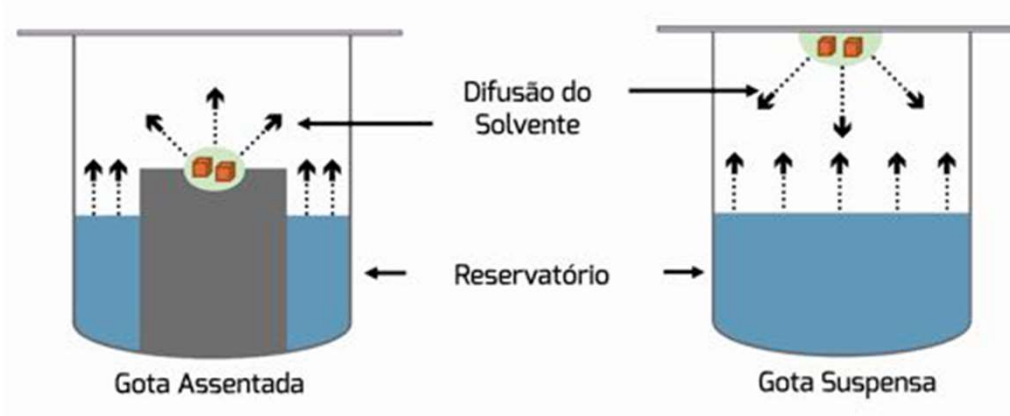
MÉTODOS DE CRISTALIZAÇÃO

GOTA ASSENTADA:

- Gota com proteína em suporte fixado no centro do poço
- Vedado com fita adesiva
- Capacidade de experimentos automatizados
- Tempo de espera rápido da montagem da gota e vedação
- “Condições de cristalização”

GOTA SUSPensa:

- Gota com proteína em lamínula de vidro siliconizada
- Vedada com graxa especial na parte superior do poço
- Fácil e versátil
- Custo elevado de lamínulas e impossibilidade automação
- “Reprodução de cristais”



POSSÍVEIS RESULTADOS DE CRISTAIS

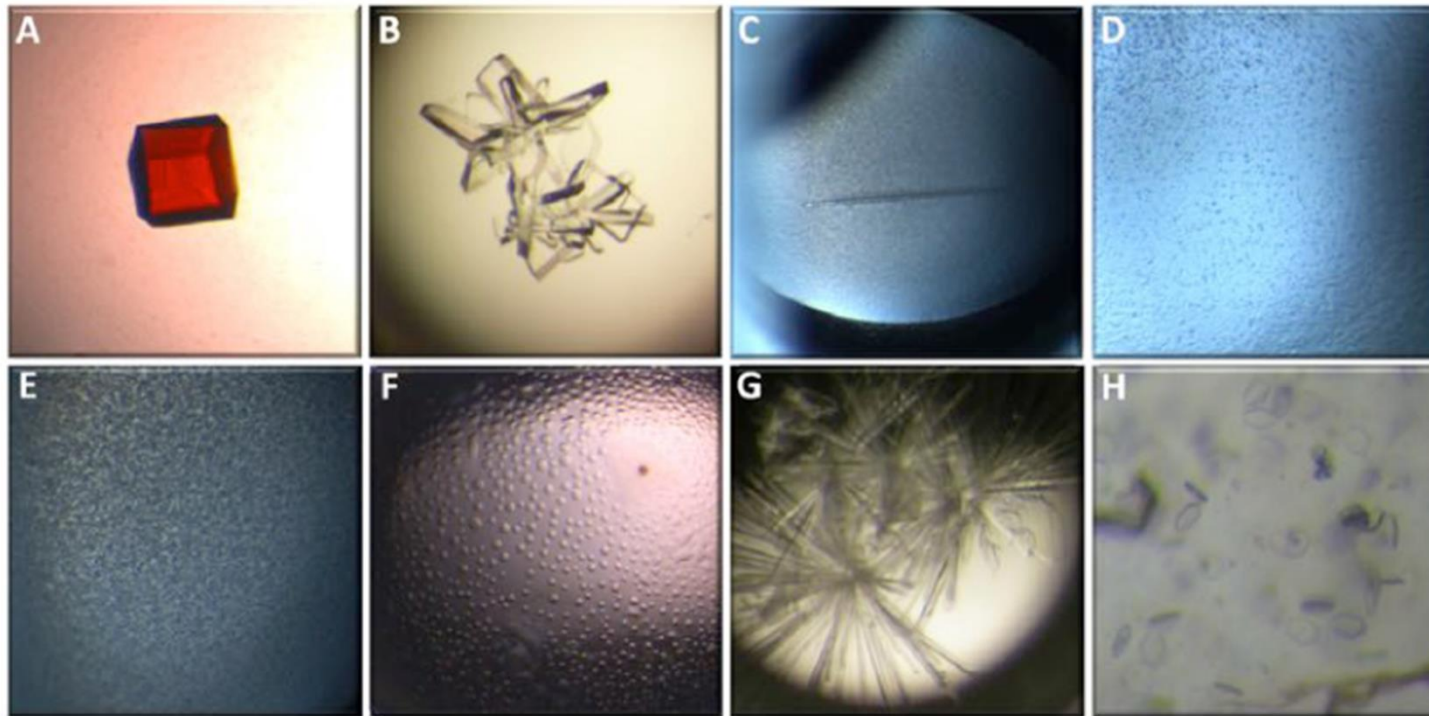
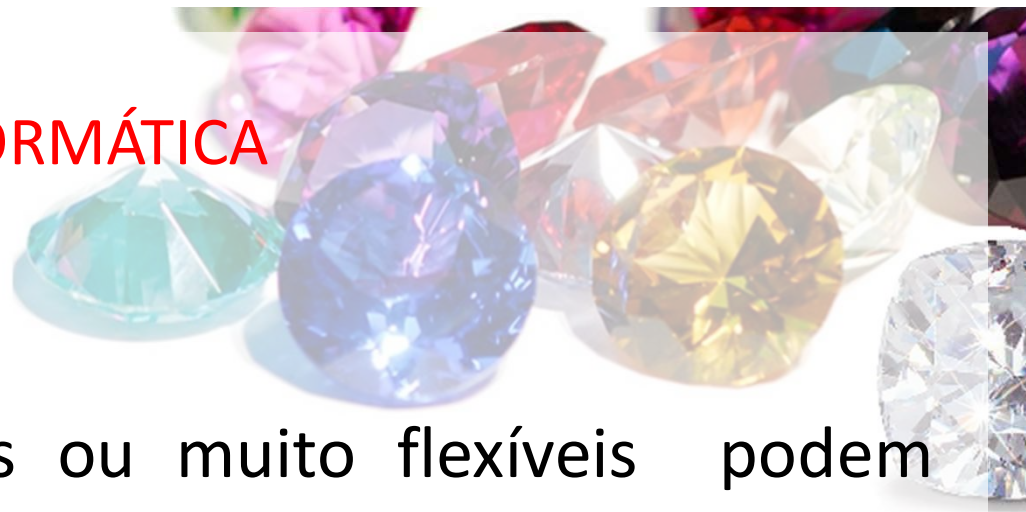


Figura 10-13: Resultados possíveis em experimentos de cristalização. A) cristal bem formado, B) placas, C) agulhas, D) precipitado leve, E) precipitado intenso, F) separação de fase, G) aglomerados de agulhas e H) microcristais.



CONTRIBUIÇÕES DA BIOINFORMÁTICA NA CRISTALIZAÇÃO



- ✓ Regiões desordenadas ou muito flexíveis podem interferir no processo de cristalização
- ✓ Propriedades: número de aminoácidos, tamanho da região desordenada, estabilidade
- ✓ XtalPred: software que avalia essas propriedades e as comparam com bancos de dados de proteínas

The logo for XtalPred-RF, featuring the text "XtalPred-RF" in a bold, sans-serif font. The "X" is red, and the rest of the text is black. The logo is set against a background of a protein crystal structure.

XtalPred-RF

Prediction of Protein Crystallizability

Sequence submission:

Paste your sequences in FASTA format ([examples](#)): ?

(Please, do not exceed 5000 residues per sequence, 10 sequences per submission)

☐ Also submit this job to the SERp server for analysis (links to SERp results will be added to XtalPred output).

Optional features: ?

☐ Find close bacterial homologs more likely to crystallize.

☐ Find close homologs in the full NR database.

Send e-mail to: when finished.

Server policy (*The server is available only to academic and non-profit users.*): ?

☐ I am using this server for educational purposes or for basic research intended to advance scientific knowledge.

A COLETA DE DADOS



CRISTAIS ADEQUADOS



TESTE DE CAPACIDADES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X



COLETA DE DADOS CRISTALOGRÁFICOS

Difração de raios-x:

- Obtenção de informação da estrutura molecular
- Interação radiação eletromagnética/matéria/dispersão

OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS O INÍCIO

- ✓ IDEAL: Quantidade e pureza >95%
- ✓ Proteínas extraídas de fonte natural



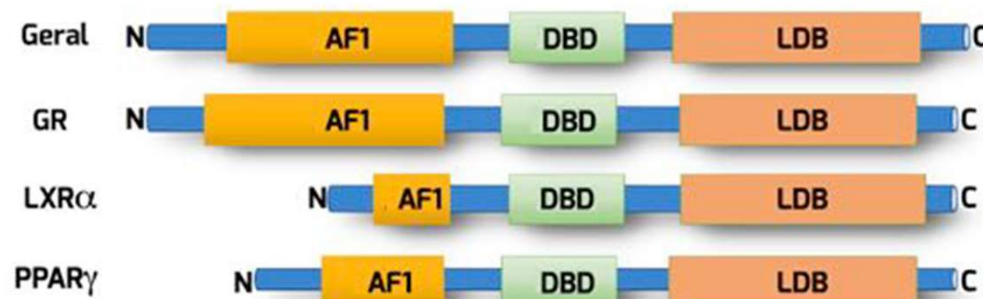
LIMITAÇÕES:

- Baixa concentração para estudos estruturais;
- Modificações pós-traducionais → dificuldade em separação de componentes → impacto na qualidade e formação dos cristais

OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS

ATUALMENTE

- ✓ Fonte natural: Anticorpos, proteínas de membrana e proteínas fúngicas (produção de bioetanol)
- ✓ Sistemas heterólogos (organismo hospedeiro)
- ✓ DNA recombinante (fragmento codificante) / PCR
- ✓ Bioinformática: planejamento de construções genéticas de alta eficiência
- ✓ Ex: Receptores nucleares (controle de expressão gênica)

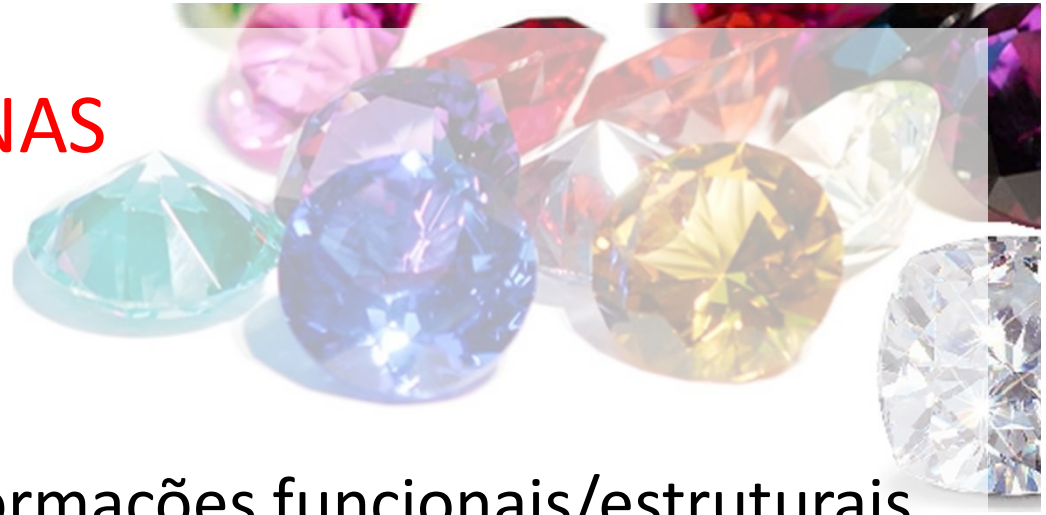


(Verli, 2014)

Alexandre Castelo Branco

OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS

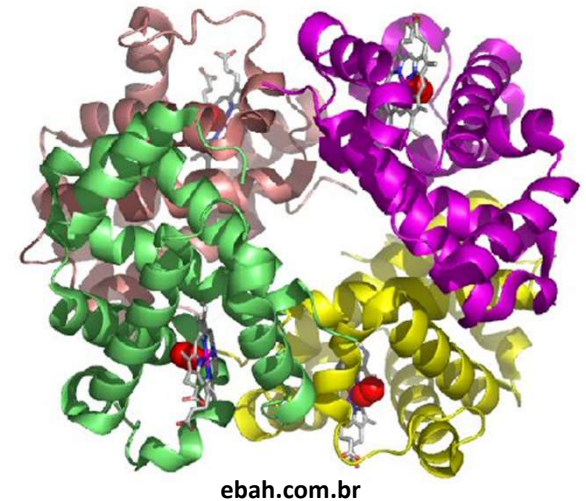
CONTRIBUIÇÕES DA BIOINFORMÁTICA



- ✓ Métodos que obtém informações funcionais/estruturais
- ✓ Elaboração de construções gênicas eficientes
- ✓ Predição de propriedades moleculares

EXEMPLOS:

- Distribuição de estrutura secundária
- Presença de peptídeos de sinalização
- Regiões flexíveis e desordenadas



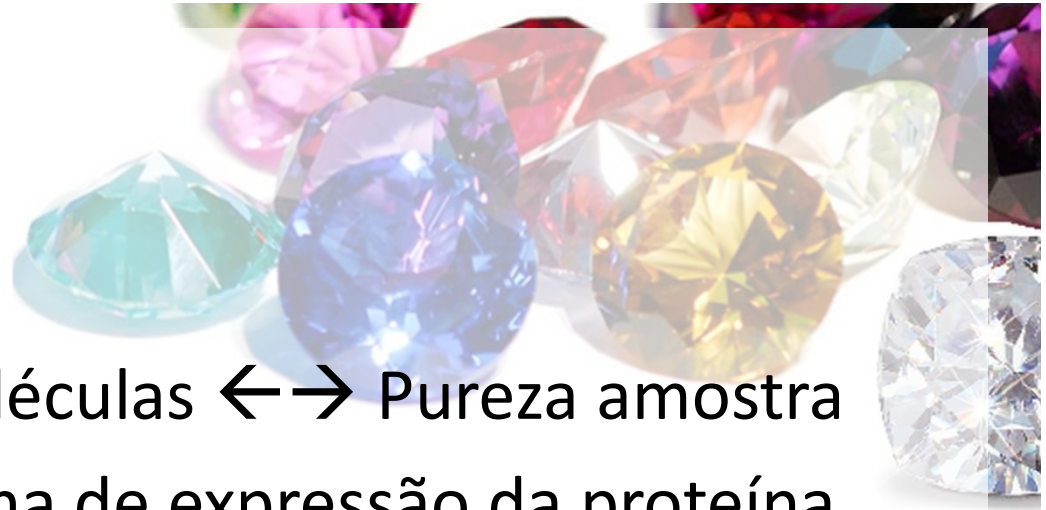
A IMPORTÂNCIA DA ESCOLHA DOS ORGANISMOS DE EXPRESSÃO



- ✓ Aspecto importante: necessidade de modificações pós-traducionais (estrutura protéica)
- ✓ Ausência das modificações:
 - Proteína não funcional ou enovelada incorretamente
 - Benéfica para a cristalização (↑ da heterogeneidade)



A IMPORTÂNCIA DA PURIFICAÇÃO

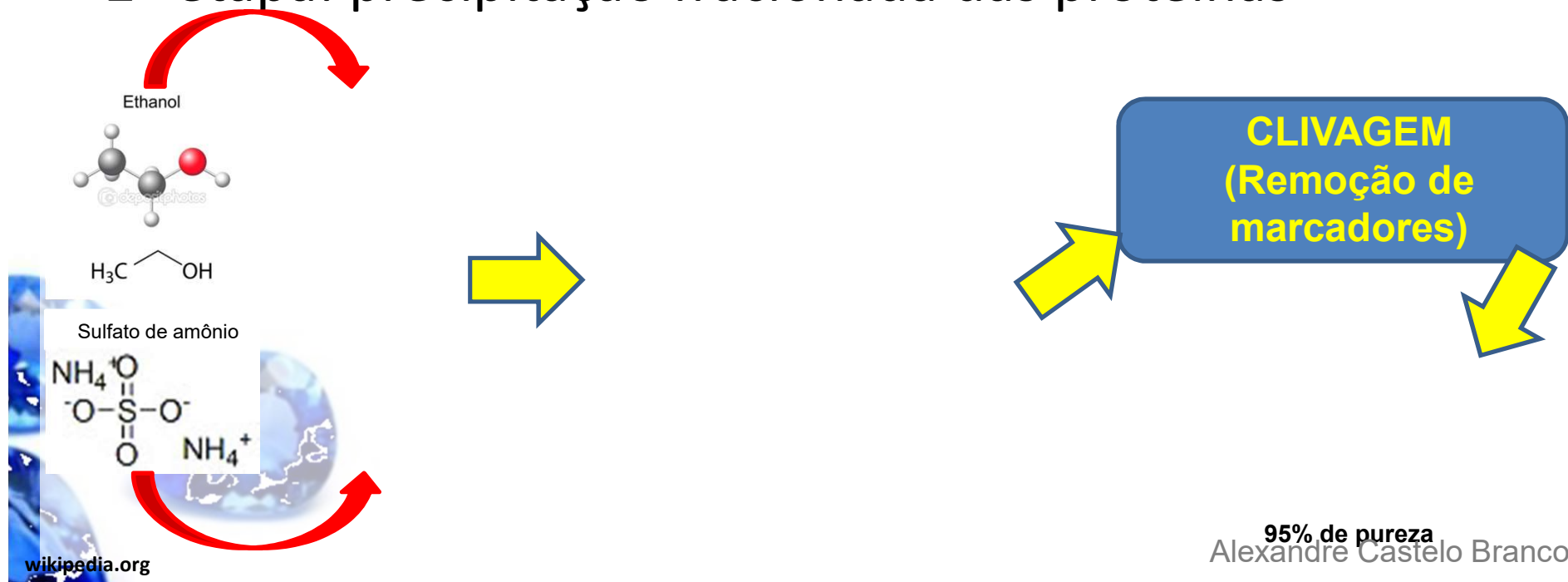


✓ Cristalização macromoléculas $\leftrightarrow$ Pureza amostra

✓ Purificação $\leftrightarrow$ Sistema de expressão da proteína

1ª etapa: lise da célula de expressão

2ª etapa: precipitação fracionada das proteínas



DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PROTEÍNAS



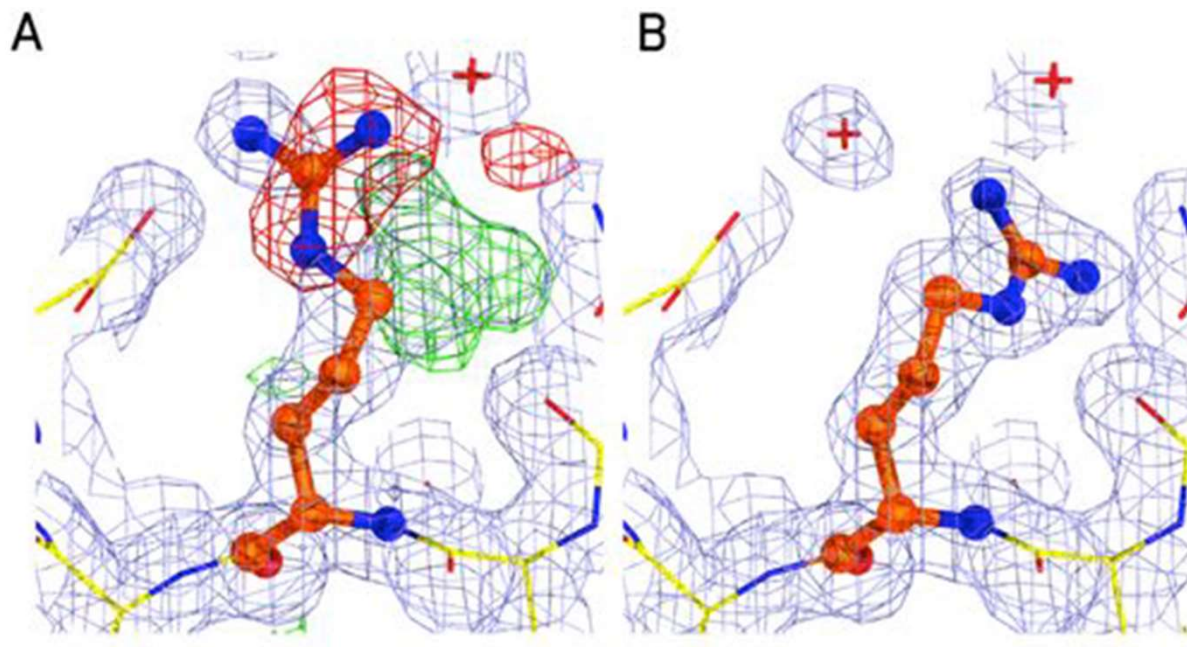
- ✓ Raios-x: comprimento de onda da mesma ordem de uma ligação covalente entre átomos
- ✓ Grande número de moléculas amplificam sinal e gera feixes de radiação de alta intensidade

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE:

- Intensidade das reflexões (I)
- Danos causados pela radiação (Rdano)
- Sobreposição das reflexões (O)
- Fator R (Rmerge)
- Completeza (C)



OS MAPAS DE DENSIDADE ELETRÔNICA



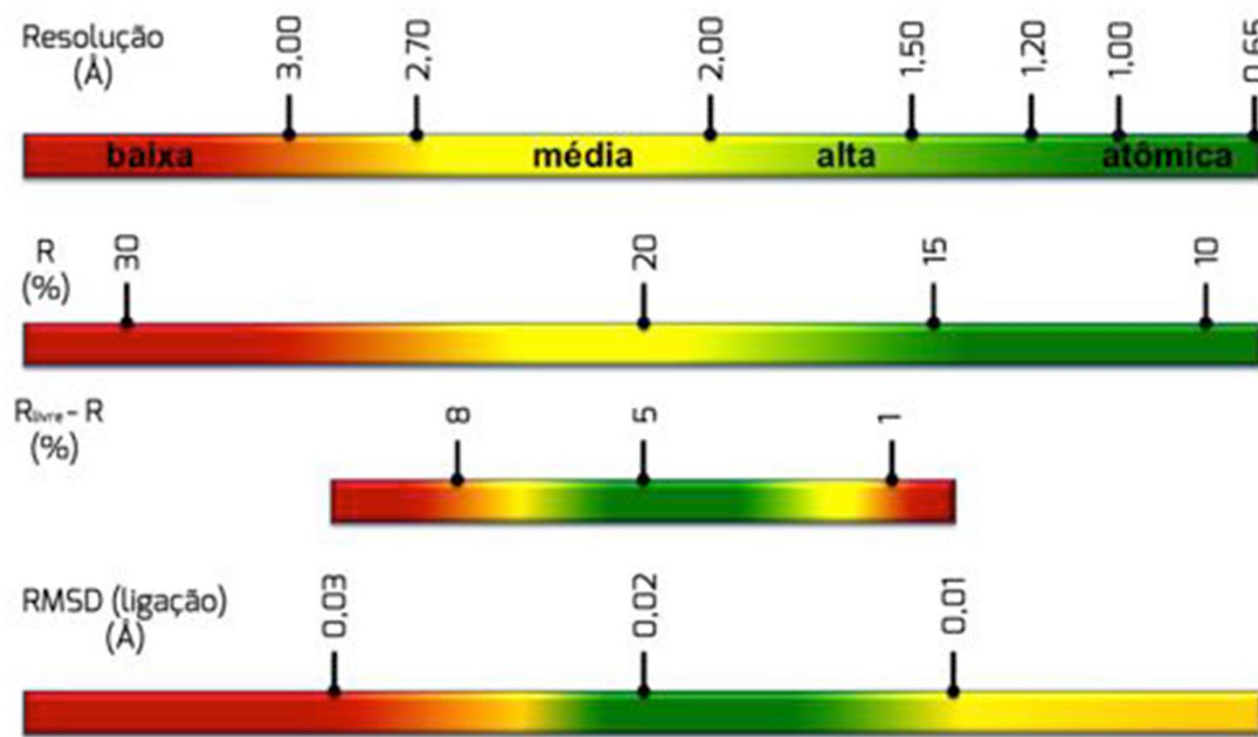
(Verli, 2014)

- ✓ Resultado final da difração de raios-x
- ✓ Em seguida: interpretação e construção do modelo estrutural
- ✓ Melhoramentos de mapas:
 - Achatamento do solvente (acentua fronteira solv/mol)
 - Promedição (aumenta relação sinal-ruído)



REFINAMENTO

- ✓ Proporciona modelos precisos
- ✓ Cálculos para manter precisão/veracidade do modelo



(Verli, 2014)

PROGRAMAS DE VALIDAÇÃO

EMBL-EBI

Services Research Training About us

PROCHECK and PROCHECK-NMR

- Home
- Download
- Manual
- NMR Manual
- References
- Contact

Groups > Thornton > Software > PROCHECK

PROCHECK checks the stereochemical quality of a protein structure, producing a number of PostScript plots analysing its overall and residue-by-residue geometry. It includes **PROCHECK-NMR** for checking the quality of structures solved by NMR.

Download

PROCHECK is available free. Download details are given [here](#). We request that you complete and sign the **Confidentiality Agreement** (see below) and return by post, fax or e-mail (see [Contact details](#)). Non-academic users can strike out Clause 7 of the agreement.

Confidentiality Agreement

 **PROCHECK Confidentiality Agreement**

Notes

→ You can upload your structure

PROCHECK

Quality Control Check v3.1

Send bug reports, comments to [Abhinav Kumar](#)

[Program Documentation](#)

Enter the file names in appropriate boxes

PDB File: Nenhum arquivo selecionado

SEQ File: Nenhum arquivo selecionado
(fasta/pir format)

MTZ File: Nenhum arquivo selecionado

LOG File: Nenhum arquivo selecionado

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB Login

RCSB PDB An Information Portal to 122799 Biological Macromolecular Structures

Search by PDB ID, author, macromolecule, sequence, or ligands

Advanced Search | Browse by Annotations

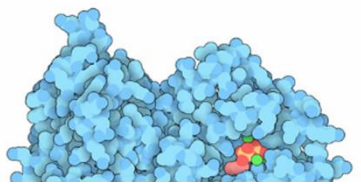
A Structural View of Biology

This resource is powered by the Protein Data Bank archive-information about the 3D shapes of proteins, nucleic acids, and complex assemblies that helps students and researchers understand all aspects of biomedicine and agriculture, from protein synthesis to health and disease.

As a member of the wwPDB, the RCSB PDB curates and annotates PDB data.

The RCSB PDB builds upon the data by creating tools and resources for research and education in molecular biology, structural biology, computational biology, and beyond.

September Molecule of the Month



Alexandre Castelo Branco

BANCO DE DADOS

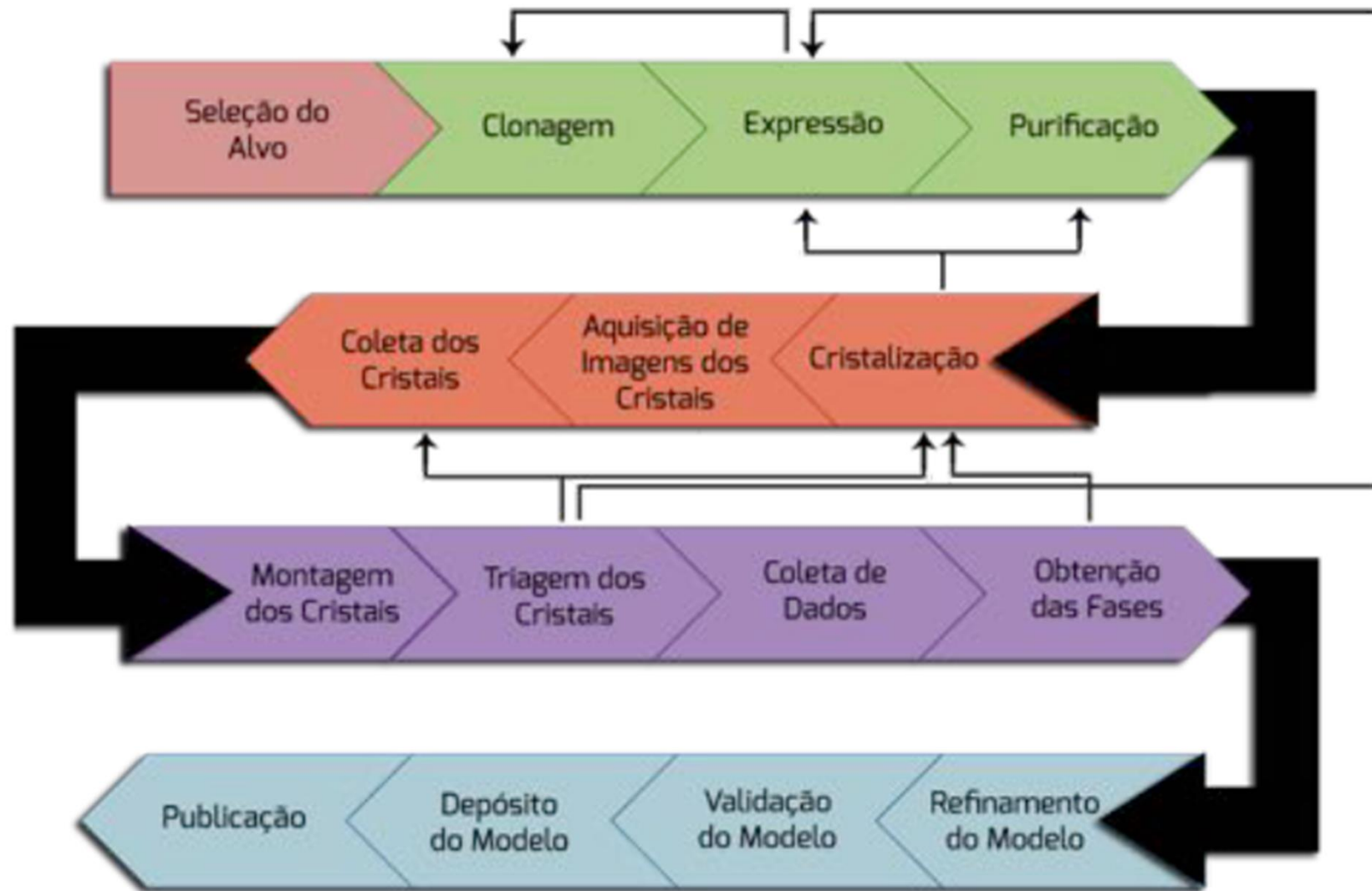
- ✓ Conhecimento 3D detalhado da macromolécula
- ✓ Origem da Informação



Tabela 1-13: Estruturas de macromoléculas depositadas no PDB (estatísticas de janeiro/2014).

Método experimental	Proteínas	Ác. nucleicos	Complexos proteína-DNA/RNA	Outras macromoléculas	Total
Cristalografia	79.922	1.497	4.162	4	85.585
RMN	8.990	1.065	197	7	10.259
Microscopia eletrônica	496	51	170	0	717
Híbridos	55	3	2	1	61
Outros	153	4	6	13	176
Total	89.616	2.620	4.537	25	96.768

PROJETO DE GENOMA ESTRUTURAL.



VISITA TÉCNICA



<https://www.youtube.com/watch?v=n4R5IRposXE>



Lauziene Andrade



“A Honra é um cristal
puro que com um
sopro se quebra.”

Félix Lopes de Vega

Alexandre Castelo Branco





CRISTALOGRAFIA

Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos

Bioinformática



Alexandre Castelo Branco
PPGBiotec Doutorado

Lauziene Andrade Soares
PPGBiotec Mestrado

SETEMBRO | 2016