

PARTE 3

Purificação, eletroforese e *status*
oxidativo de uma proteína

Expressão da proteína em um sistema recombinante



Purificação



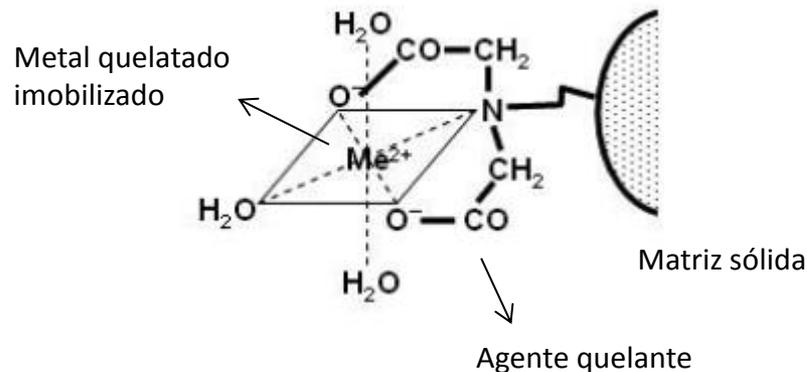
Eletroforese



Ensaio bioquímico

Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

- A técnica de IMAC baseia-se na afinidade que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula, que devem ser doadores de elétrons;

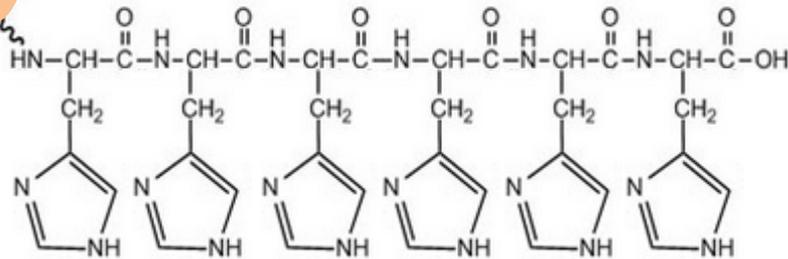


- O agente quelante é acoplado à matriz sólida por ligações covalentes. O íon metálico, por sua vez, é imobilizado ao agente por ligações de coordenação (no exemplo, uma ligação com nitrogênio e duas com oxigênios)

Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

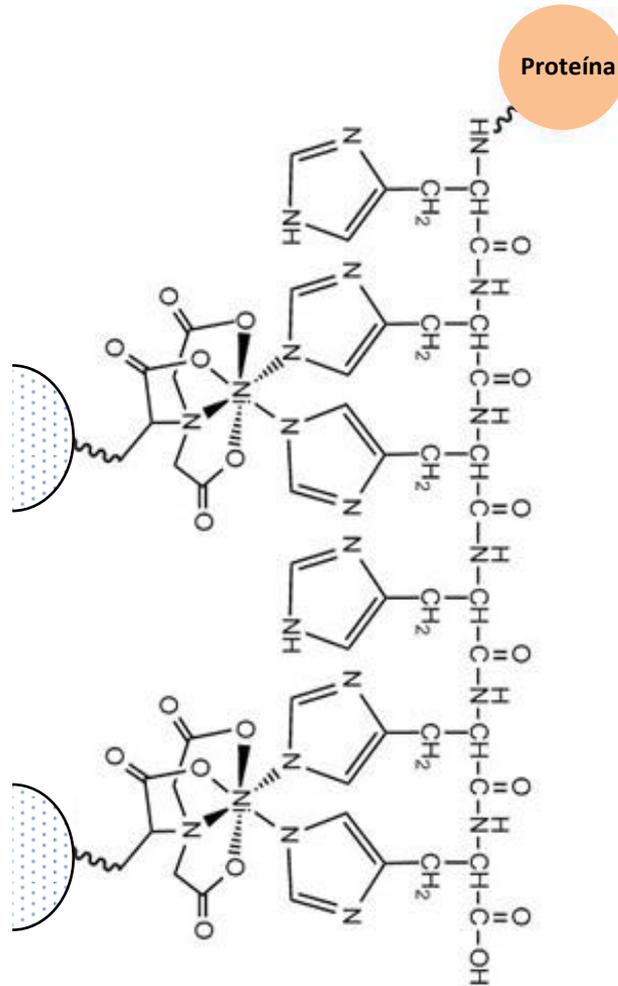
- Com a tecnologia do DNA recombinante foi possível a incorporação de caudas em proteínas que não contêm naturalmente espécies doadoras de elétrons, conferindo à mesma a possibilidade de purificação por IMAC.

Proteína



Fusão de sequência de 6 histidinas na porção C ou N-terminal da proteína alvo

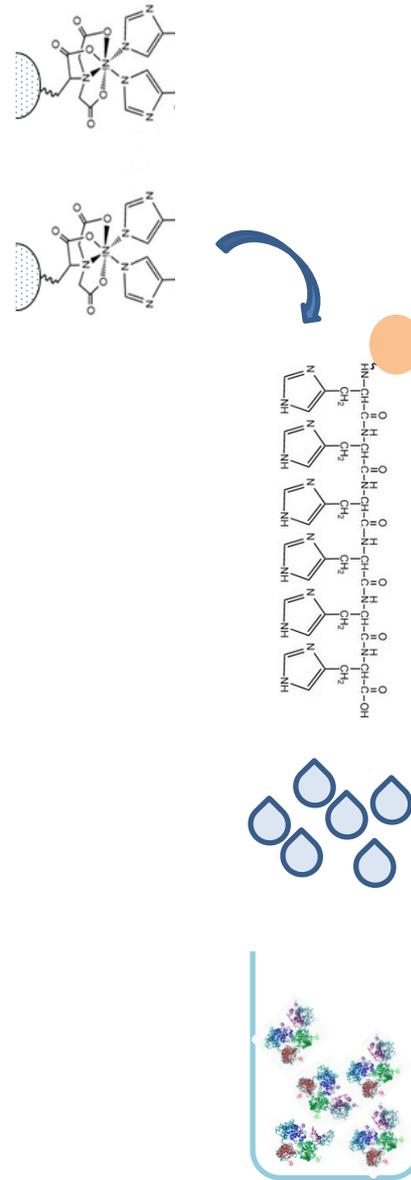
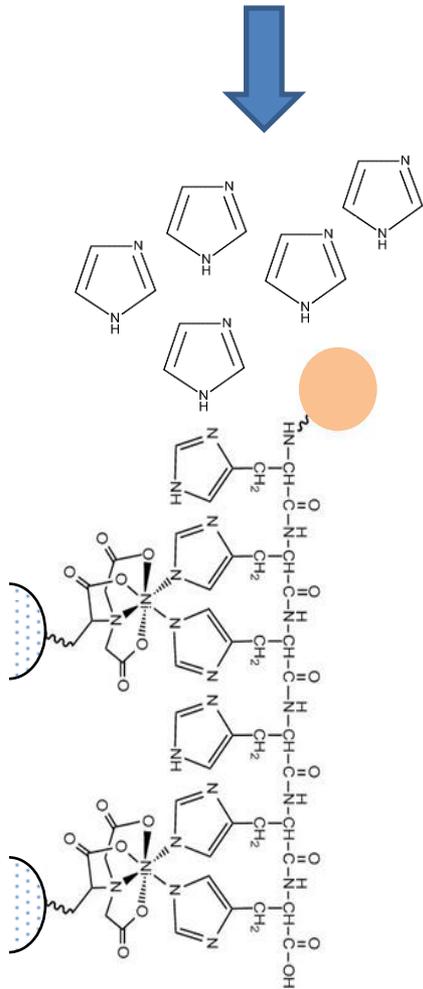
Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)



- Ligações de coordenação reversíveis serão formadas entre o íon metálico quelatado e resíduos de aminoácidos como o imidazol (histidina), tiol (cisteína) e indol (triptofano), os quais doam elétrons para o íon metálico, atuando como base de Lewis

Cromatografia de afinidade por íons metálicos immobilizados (IMAC)

Adição de um competidor forte para eluição da proteína

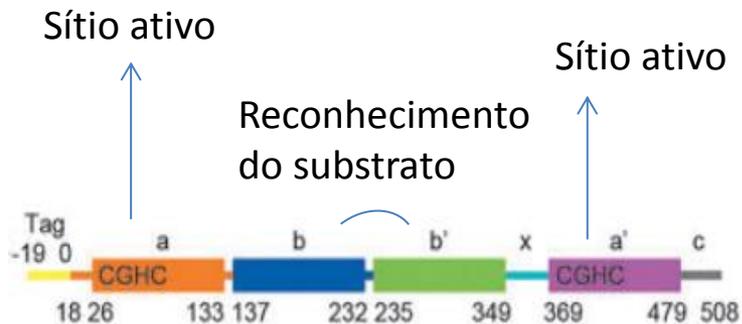


Link para o vídeo de eletroforese

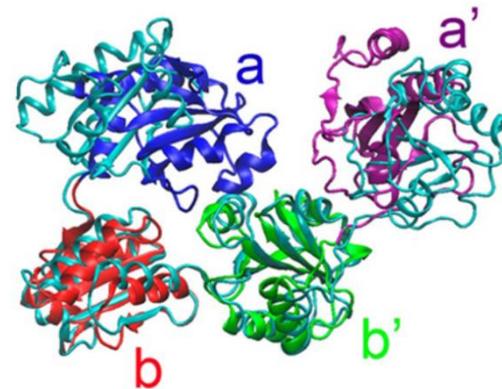
Proteína dissulfeto isomerase (PDI)

A proteína que vocês receberão e que passou pelos processos vistos anteriormente é a PDI

- Expressa em quase todos os tecidos de mamíferos
- Abundante no RE, mas é expressa na membrana plasmática de alguns tipos celulares
- 4 domínios distintos (em sequência: **a**, **b**, **b'**, **a'**), uma sequência interdomínio **x** e uma sequência **c** terminal que possui a sequência KDEL



Wang C, *et al.*, Antioxid Redox Signal, 2013



Yang S, *et al.*, Plos One, 2014

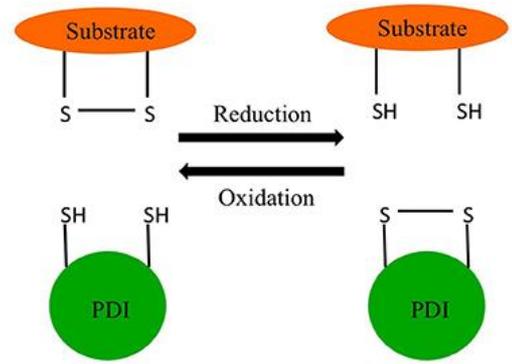
Proteína disulfeto isomerase (PDI)

PDI

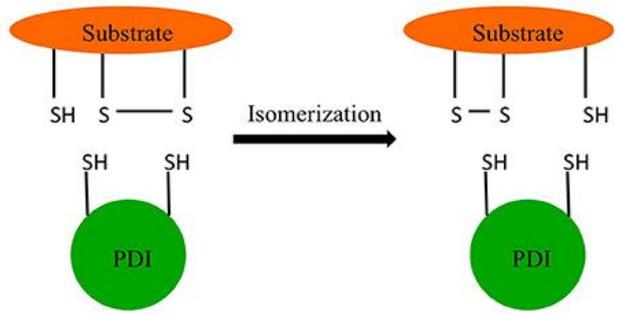
Chaperona



Oxidoreductase

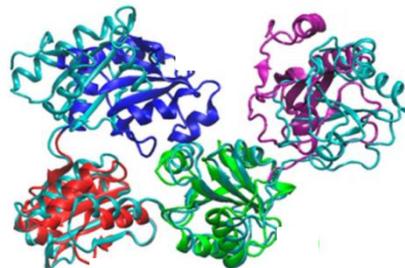


Isomerase



- Oxidação e redução de proteínas tiol são dois dos mais importantes mecanismos pelos quais reativos oxidantes integram as vias de transdução de sinal intracelulares;
- Dessa forma, produtos do *burst* oxidativo poderiam afetar grupos tiólicos da PDI, alterando seu padrão de oxidação

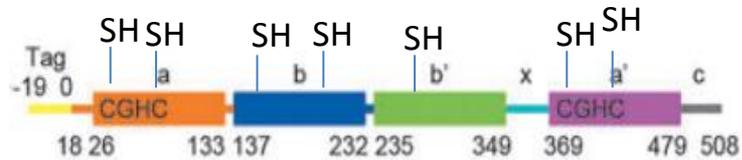
HOCl



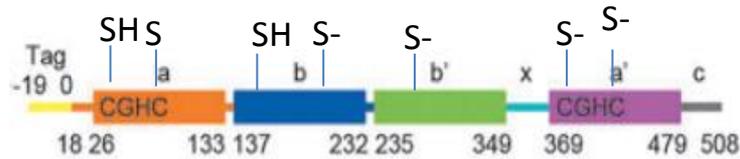
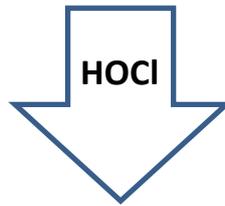
-SH (forma reduzida)

-S⁻ (forma oxidada)

Status oxidativo da PDI – Quantificação de tióis livres usando DTNB



PDI reduzida – 7 tióis livres (forma reduzida)



PDI oxidada – quantos tióis terão se oxidado com o tratamento?

DTNB - ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico): usado para quantificar o número ou a concentração de tióis em uma amostra



- Tíol reage com o composto, clivando a ponte dissulfeto para gerar o TNB⁻ (2-nitro-5-tiobenzoato), o qual ioniza ao diânion TNB²⁻ em meio neutro e alcalino.
- A reação é rápida e estequiométrica, de forma que a adição de 1 mol de tíol libera 1 mol de TNB.
- O TNB²⁻ tem cor amarela e pode ser quantificado em espectrofotômetro pela leitura da absorbância a 412 nm ($\epsilon = 14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).