Disciplina: Cristalografia de proteínas – FFF-757
Professor responsável: Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima – Mauricio@pharma.ufrj.br
Carga horária total: 90 horas.aula
Horário: A combinar
Pré-requisitos: Sem pré-requisito
Outros requisitos: Disponibilidade de microcomputador para instalação de programas de processamento de dados; requisitos mínimos a ser informados oportunamente.

Objetivo:

Fundamentos, estratégias e práticas de cristalização, coleta de dados e resolução de estruturas de proteínas e seu uso nas ciências da saúde, biológicas e demais.

Ementa

Estudo de fenômeno de difração de raios-X por cristais de proteínas e outras macromoléculas na aplicação na determinação estrutural. Métodos de cristalização. Instrumentação. Manipulação de cristais. Estratégia de coletas de dados. Resolução de estrutura. Refinamento. Construção de modelos. Validação estrutural. Interpretação de estruturas e aplicações.

Programa Preliminar
Teórico:

Aspectos históricos

Descoberta dos raios-X e suas propriedades
Aplicação da difração de raios-X nas descobertas da ciência
Resolução estrutural: mioglobina, hemoglobina, lisozima.

Princípio físicos da difração:

Cristais, simetria, grupos pontuais e sistemas cristalinos.
Difração de mono- e poli-cristais
Espaço recíproco; esfera de Ewald
Mosaicidade, intensidade integrada de reflexão
Cálculo da densidade eletrônica
Simetria no padrão de difração
A função de Patterson
Espalhamento anômalo

Cristalização

Planejamento: biologia molecular estrutural, genômica estrutural, química medicinal.
Qualidade do material: proteínas recombinantes, peptídeos e demais produtos sintéticos
Diagrama de fases
Estratégias de cristalização
Métodos contemporâneos de cristalização de macromoléculas
Otimização de amostras e condições de cristalização: estabilização, derivatização química, nicks em ácidos nucléicos, manipulação do construto macromolecular
Cristalização de complexos
Manipulação, montagem e armazenamento de cristais
Criocristalografia: vantagens e desvantagens, manipulação, soluções, instrumentação.
Morfologia e propriedades óticas de cristais
Volume parcial molar e densidade de macromoléculas
Densidade, hidratação e solvente em cristais – conceitos, aplicações e manipulação

Instrumentação e coleta de dados

Fontes, geração de raios-X: tubos selados, anodos rotatórios e síncrotrons
Propriedades de feixes de raios-X
Ótica / Geometria

Detectores de raios-X
Geometria de coleta: Laue, goniostato, método de rotação
Distância cristal-detector:
Estratégias e planejamento de coleta de dados
Danos de cristais por raios-X: origem, conseqüências e prevenção

Resolução de estruturas: estratégias, fundamentos, programas
Indexação
Substituição Molecular: alinhamento, famílias de proteínas
Métodos diretos
Substituição isomorfa
Dispersão anômala
Modificação de densidade
Combinação de fases

Construção de modelos e computação gráfica: estratégias, fundamentos, programas
Programas para visualização de modelos estruturais e mapas de densidade eletrônica

Refinamento de estruturas: estratégias, fundamentos, programas
Restrições e estratégias de construção de modelo e refinamento
Métodos de mínimos quadrados
Anelamento simulado
Construção de solvente

Validação de estruturas: estratégias, fundamentos, programas

Análise, classificação e deposição de estruturas
Bancos de dados de estruturas cristalográficas, RMN, crioeletromicroscopia
Análise estrutural de peptídeos, proteínas e ácidos nucléicos.
Aspectos da interações proteína:proteína, proteína:carboidratos, proteínas:ácidos nucléicos, proteína:ligantes.

Outros métodos estruturais
Difração de nêutrons: métodos e informações
Difração de fibras: princípios, preparo de amostra, coleta, processamento e determinação de estruturas.
Crioeletromicroscopia de partículas únicas: fundamentos, métodos, preparo de amostra, resolução de estrutura
Ressonância magnética nuclear (RMN) de macromoléculas.
Simulação: modelagem e dinâmica molecular e suas aplicações em resolução de estruturas de proteínas e avaliação de modelos cristalográficos.
Espalhamento a baixos-ângulos por sistemas biológicos.

Uso de estruturas em biologia molecular estrutural e química medicinal

Prático:
- Cristalização de proteínas
- Manipulação de cristais
- Análise de dados de difração de raios-X: resolução de estrutura por substituição molecular.
- Faseamento por espalhadores anômalos.

Critério de Avaliação
- Apresentação e discussão de artigos científicos
- Apresentação, em relatório, de análise de resultados experimentais primários e/ou secundários, com embasamento nos conhecimentos obtidos em aula.

Bibliografia

- C. Giacovazzo, H.L. Monaco, G. Artioli, D. Viterbo, G. Ferraris, G. Gilli, G. Zanotti, M. Catti - Fundamentals of Crystallography. 2nd Edition, International Union of Crystallography, Oxford Science Publications, 2002

- Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: a practical approach, 2nd Ed, Edited by Arnaud Ducruix and Richard Giegé, Oxford University Press, 1999

- Gale Rhodes - Crystallography Made Crystal Clear, Third Edition: A Guide for Users of Macromolecular Models. Academic Press; 3 edition (2006)

http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125870733
http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/CMCC/index.html

- International Tables for Crystallography, Volume F – Crystallography of biological macromolecules. Edited by Michael G. Rossmann and Eddy Arnold, 1st Edition, Int. Union of Crystallography / Kluwer Academics Publishers, 2001

- A Hypertext Book of Crystallographic Space Group: Diagrams and Tables - http://img.chem.ucl.ac.uk/sgp/

- IUCr teaching pamphlets - www.iucr.org/iucr-top/comm/cteach/pamphlets.html

- Protein Crystallography Course - http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/course.html

- Rupp's "Crystallography 101" - www.ruppweb.org/Xray/101index.html

- Kevin Cowtan's Book of Fourier - http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html

- Kevin Cowtan's structure factor applet - http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/sfapplet/sfintro.html

- Ethan Merritt's anomalous scattering plots - www.bmsc.washington.edu/scatter/AS_form.html

- Proffen & Neder's Interactive Diffraction tutorial - www.uni-wuerzburg.de/mineralogie/crystal/teaching/teaching.html

- Chapuis & Hardaker's course on symmetry - www-sphys.unil.ch/x-ray/

- ACA: www.hwi.buffalo.edu/ACA/educationsites.html

- Interactive crystallography - http://lcr.epfl.ch/page37304.html

- Validation - http://xray.bmc.uu.se/embo2001/modval/

- Difração de Bragg - http://www.bmsc.washington.edu/people/merritt/bc530/bragg/

- Atlas of Side Chain Interaction - http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/sidechains/index.html PDBsum - http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/

- A tutorial for learning and teaching macromolecular crystallography - http://www.embl-hamburg.de/Xray_Tutorial/

- JCSG XtalPred server: http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl (Bioinformatics. 2007 Dec 15;23(24):3403-5. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability).

- Biotech Validation Suite for Protein Structures - http://mbcf.dfci.harvard.edu/cmsmbr/biotools/biotools9.html

- LABELIT: Data characterization for macromolecular crystallography - http://adder.lbl.gov/labelit/

Programas

- Suíte CCP4 (Win / Linux / Mac) - www.ccp4.ac.uk http://www.ccp4.ac.uk/download.php
- Suíte Phenix (Linux) - http://www.phenix-online.org/
- Coot (Win / Linux / Mac) - http://biop.ox.ac.uk/coot/
- PyMOL (Win / Linux / Mac) - http://pymol.org/

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
UFRJ

Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

***Disciplina*: Cristalografia de Proteínas FFF 757 (Mestrado / Doutorado)**

Quadro de Horário Preliminar

Semana 1	**Segunda**	**Terça**	**Quarta**	**Quinta**	**Sexta**
08-12 AT	Introdução Cristalização de Proteínas	Intro, Histórico, Princípios de difração	Instrumentação / coleta de dados	Resolução de estrutura: estratégias, fundamentos, programas.	Refinamento / Validação
13-18 AP	Cristalização, mnipulação de cristais; visualização, corantes, congelamento	Proteína #1: Programas de manipulação de estruturas: PyMol; Rasmol; CCP4MG; Coot. ntegração de imagens de difração; escalonamento	Proteína #1: substituição molecular: Molrep; Phaser; Amore; Refmac "rigid body"; visualização de solução	Proteína #1: Refinamento; lidação de estrutura; deposição	Proteína #1: Refinamento; lidação de estrutura; deposição

Semana 2	**Segunda**	**Terça**	**Quarta**	**Quinta**	**Sexta**
08-12 AT	Proteína #2: estudo dirigido				
13-18 AP					

 # Avaliação

- Elucidação estrutural de uma proteína a partir de difração de monocristal de lisozima de clara de ovo, cristalizada por difusão de vapor por gota pendente, equilibrando 1 uL de 20 mg/mL lisozima com 1 uL de solução do poço (100 mM Acetato de Sódio pH 4.6, 1.0 M NaCl) a 20 ^{o}C.
http://hamptonresearch.com/experiments.aspx
http://www.jbc.org/content/238/8/2698.full.pdf
http://lysozyme.co.uk/

- Etapas:
Integração - Mosflm
Escalonamento - Scala
Substituição molecular: AMoRe | MolRep (+ Reindex) | Phaser
Descrever escolha do modelo para substituição molecular
Ciclos alternados de refinamento espaço recíproco (Refmac) / real (COOT)
Validação: ProCheck / SFCheck /

- Dados a constar do relatório:
- Análise estrutural: detalhes da proteína, ligantes, contatos, sítio ativo, alinhamento
- Preencher e encaminhar a tabela cristalográfica de coleta/integração, refinamento, validação
- Encaminhar os arquivos PDB e MTZ finais de refinamento

Tabela 1. Resumo de estatística de coleta e processamento de dados

Data Collection	
X-ray source	
Detector	
Space group	
Unit cell dimension, Å	a = , b = , c = , α, β, γ
Monomers / asymmetric unit	
Number of reflections	
Multiplicity	### (###)
Completeness, %	### (###)
{I/σ(I)}	### (###)
Rmerge	### (###)
Structure Solution	
Structure solution	
Program	
Model (PDB ID)	
Solution statistics	
Structure Refinement	
Resolution range, Å	### ~ ### (### ~ ###)
Reflection in working/free, %	### / ###
Rwork / Rfree	### / ###
Overall Bfactor, Å^2	###
Ramachandran outliers	###
rmsd bond length, Å	###
rmsd bond angles, ^{o}	###

Number in parentheses indicates the highest resolution shell.
R_{free} calculated for ≥ 5 % randomly chosen reflections that were excluded from the refinements.