

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 24/03/2025

Carolina Tatiani Alves Ferreira

Pivot-SAXS: Desenvolvimento de uma nova
metodologia para caracterização estrutural e
conformacional de macromoléculas combinando SAXS
e simulações computacionais.

São José do Rio Preto

2023

Pivot-SAXS: Desenvolvimento de uma nova metodologia para caracterização estrutural e conformacional de macromoléculas combinando SAXS e simulações computacionais.

Carolina Tatiani Alves Ferreira

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira

São José do Rio Preto - SP

2023

F383p

Ferreira, Carolina Tatiani Alves

Pivot-SAXS : Desenvolvimento de uma nova metodologia para caracterização estrutural e conformacional de macromoléculas combinando SAXS e simulações computacionais. / Carolina Tatiani Alves Ferreira. -- São José do Rio Preto, 2023

122 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Leandro Cristante de Oliveira

1. Biofísica. 2. Macromoléculas. 3. Desenvolvimento de software. 4. Raios X Espalhamento a baixo ângulo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Pivot-SAXS: desenvolvimento de uma nova metodologia para
caracterização estrutural e conformacional de macromoléculas
combinando SAXS e simulações computacionais

Carolina Tatiani Alves Ferreira

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Leandro Cristante de Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Dr^a. Aline Ribeiro Passos
LNLS – CNPEM

Prof. Dr. Paulo Mascarello Bisch
UFRJ – Câmpus do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antônio Francisco Pereira de Araújo
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Letícia Maria Zanphorlin Murakami
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

São José do Rio Preto - SP

23 de março de 2019

À menina esperta de só 4 anos, à criança teimosa e determinada,
à adolescente confusa e assustada, à jovem adulta perdida e
sonhadora,
à mulher inteira que hoje escreve aqui
e a todas que ainda serei.
Não esqueça, essa é pra mim mesma.

Agradecimentos

- Agradeço ao Universo por cada uma das oportunidades que surgiram no meu caminho.
- Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais por todo o amor e carinho, além de serem o melhor exemplo profissional que eu poderia ter.
- Agradeço ao meu orientador, Dr. Leandro Cristante, pela paciência e por me proporcionar uma excelente orientação através de uma nova linha de pesquisa. Aos meus colegas do grupo DoPreDin pelo apoio, contribuições e discussões extremamente valiosas.
- To my foreign advisor, Dr. Sichun Yang, thank you for receiving me during the sandwich period and continuing to advise me even after that.
- Aos meus amigos, fisicamente próximos ou espalhados pelo globo, pela companhia e perseverança durante esses anos e por me permitirem fazer parte dessa família. Eu sei que posso ser difícil, então muito obrigada.
- Aos meus médicos e terapeutas, que me permitiram finalizar esse ciclo em meio a condições menos do que ideais.
- Ao corpo docente e aos funcionários da Escola Bilíngue América pelo apoio nessa reta final.
- Às meninas do grupo Time to Work - PrintGirls, sem vocês eu não teria conseguido escrever nenhuma linha, se esse trabalho existe é por vocês me inspirarem e me lembrarem o quanto a ciência é incrível e que existe espaço pra nós.
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.
- Aos meus professores por construírem meu conhecimento.
- A todos que foram parte da minha vida nesse período e, portanto, me ajudaram a construir esta conquista, eu agradeço e ofereço meu carinho.

"Recognize who you are sometimes, I know it's so hard...
...Realize how far you've come this time, you won't be outdone...
...Give yourself some applause, you deserve it give yourself some
respect 'cause you've earned it..."

Diane Warren & Sofia Carson, Applause

Resumo

A comunidade científica já se utiliza da combinação de técnicas experimentais e computacionais em suas investigações, especialmente para sistemas biológicos complexos devido à dinâmica das macromoléculas em solução e mudanças conformacionais. No entanto, a predição da estrutura de moléculas biológicas em solução é um problema desafiador para teóricos e experimentalistas, dada a falta de técnicas disponíveis para observar esses sistemas. O espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) é uma técnica experimental que fornece informações quantitativas, como raio de giro e distância entre pares, mas não informações estruturais precisas. No entanto, combinado com uma técnica computacional, SAXS já é capaz de analisar estruturalmente estes sistemas gerando o "envelope", por exemplo. Assim, foi desenvolvido o programa Pivot-SAXS para ampliar as possibilidades de estudos conformacionais. O programa usa uma estrutura inicial e informações de estrutura secundária para criar um potencial baseado em um fator de esfera rígida, que proíbe choques estéricos e minimiza o espaço conformacional. O programa gera novas conformações usando um algoritmo de pivot e avalia a similaridade entre as curvas de espalhamento teórica e experimental, completando o potencial usando o critério de Metropolis. O código está disponível em [Github](#). Os resultados obtidos pelo Pivot-SAXS foram satisfatórios e congruentes com outras metodologias, o que indica sua aplicabilidade em estudos futuros.

Palavras Chaves: Algoritmo. Análise conformacional. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Modelagem computacional. Predição de estrutura.

Abstract

The scientific community widely recognizes the importance of combining experimental and computational techniques, especially in complex biological systems due to the dynamic behavior of macromolecules in solution and conformational changes. However, predicting the structure of biological molecules in solution has been a challenging problem for both experimentalists and theoreticians, and there are only a limited number of techniques available to observe these system variations. Small Angle X-ray Scattering (SAXS) is a low-resolution experiment that provides only quantitative information, such as the gyration radius and pair distance. Nevertheless, SAXS can address these systems by providing the "envelope" of the protein. When combined with computational techniques, it becomes a powerful tool for characterizing macromolecules in solution. To address this problem, we developed the Pivot-SAXS software for theoretical protein structure prediction and conformational analysis. The program uses an input conformation to model the molecule and considers information from the secondary structure to build a potential based on a hard-sphere factor to forbid steric clashes and minimize the conformational space. New conformations are generated using a pivot algorithm, and they are assessed by a potential factor that calculates the similarity between the theoretical scattering curve and the experimental profile. This process is completed by evaluating the potential using the Metropolis criteria. It is possible to access the code on [Github](#). The software has achieved satisfactory and coherent results with other methodologies, indicating its potential for future studies.

Key Words: Algorithm; Computational modeling; Small angle X-ray scattering; Structure prediction;

Lista de Figuras

1.1	Planta baixa do Sirius no LNLS.	21
2.1	Ilustração geométrica da lei da reciprocidade.	24
2.2	Esboço de curvas de espalhamento qualitativas para a incidência de ondas com o mesmo comprimento de onda sobre partículas de diferentes tamanhos e formas.	24
2.3	Esquema de montagem do experimento de SAXS.	25
2.4	Espalhamento de raios-X por dois elétrons.	27
2.5	Curvas de espalhamento devido à diferentes geometrias.	35
2.6	Gráfico de Guinier para a lisozima.	38
2.7	Representação de uma partícula e seu “fantasma”, formado pelo deslocamento.	38
2.8	Gráfico de Porod para a lisozima.	39
2.9	Diferentes curvas de espalhamento analisadas pelo gráfico de Kratky.	40
2.10	Macromolécula envolta por uma camada de hidratação de espessura Δ .	41
3.1	Gráficos de correlação entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.	51
3.1	Gráficos de correlação entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS. (cont.)	52
3.2	Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.	53

3.2 Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.(cont.)	54
3.2 Comparativo entre os programas SAXS-factor, Crysol, Fast-SAXS-pro e FoXS.(cont.)	55
4.1 Representação da estrutura geral de um aminoácido. Fonte: Autoria própria.	58
4.2 Representação das cadeias laterais de todos os aminoácidos essenciais. Fonte: Nelson e Cox [1].	59
4.3 Representação dos ângulos em um aminoácido. Fonte: Nelson e Cox [1].	59
4.4 Conformação totalmente planar de uma ligação peptídica. Os ângulos φ e ψ estão em posição de 180° . Fonte: Autoria própria.	60
4.5 Ramachandram plot	60
4.6 Representação do sistema de coordenadas 'linha' formado a partir da rotação de ω em torno de Z . Fonte: Autoria própria.	62
4.7 Validação do potencial do Pivot-SAXS	66
4.8 Conformação de menor chi gerado pelo programa Pivot-SAXS sobreposta à estrutura cristalográfica e à estrutura de entrada.	68
4.9 Diversas conformações obtidas pelo Pivot-SAXS para XylLich	69
4.10 Conformação com menor chi encontrada pelo Pivot-SAXS	71
4.11 Comparação dos perfis experimentais da GH5 com o perfil teórico calculado pelo SAXS-factor	72
4.12 Representação das quatro regiões utilizadas como pivot nas simulações. Fonte: Autoria própria.	73
4.13 Comparação entre as conformações iniciais e finais da GH5	74
A.1 Relação entre $f(q)$ e q para diferentes elementos químicos. Fonte:autoria própria	84

B.1 Fluxograma do critério de Metropolis.	87
C.1 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1HYPHP.	88
C.2 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1RECBP.	89
C.3 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 1XYNTP.	90
C.4 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para 2HYPHP.	91
C.5 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para APSODP.	92
C.6 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para AT5GHP.	93
C.7 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para C3bEiP.	94
C.8 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para LAR12P.	95
C.9 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para MnmG2X.	96

C.10 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para MRERAP.	97
C.11 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA32.	98
C.12 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA62.	99
C.13 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDA78.	100
C.14 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAA2.	101
C.15 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAB2.	102
C.16 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAC2.	103
C.17 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAH2.	104
C.18 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAJ5.	105

C.19 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAK2.	106
C.20 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAK6.	107
C.21 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAL2.	108
C.22 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAN2.	109
C.23 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAQ2.	110
C.24 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDAX6.	111
C.25 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDB52.	112
C.26 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDB76.	113
C.27 Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDBT4.	114

C.28	Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDCD6.	115
C.29	Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDCJ6.	116
C.30	Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDH9.	117
C.31	Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDL3.	118
C.32	Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDDL6.	119
C.33	Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEL6.	120
C.34	Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEV5.	121
C.35	Comparativos entre as curvas experimentais e teóricas calculadas pelos softwares Crysol, FoXS, Fast-SAXS-pro e SAXS-factor para SASDEY3.	122

Lista de Tabelas

3.1	Valores de χ^2 calculados pelos programas SAXS-factor, FoXS, Crysol e Fast-SAXS-pro	49
4.1	Valores de χ^2 e RMSD entre a conformação com menor χ^2 e a estrutura cristalográfica.	67
A.1	Valores de a_i , b_i e c para diversos elementos químicos.	85

Sumário

1	Introdução.	19
2	Fundamentação teórica e metodológica.	23
2.1	Lei da reciprocidade.	23
2.2	Espalhamento da Luz	25
2.3	A interferência e o vetor momento de transferência \vec{q} .	27
2.4	Espalhamento por vários elétrons.	28
2.5	Função de auto-correlação.	30
2.6	Aproximação de Debye e função de correlação.	31
2.7	Sistema em solução.	33
2.8	Análises das curvas experimentais de SAXS.	36
2.9	Análise computacional dos dados de SAXS.	40
3	SAXS-Factor	44
3.1	Introdução ao SAXS-factor	44
3.2	Camada de hidratação	45
3.3	Cálculo do fator de espalhamento.	46
3.4	Cálculos Possíveis	47
3.5	Resultados	48
4	Pivot-SAXS	56
4.1	Introdução ao Pivot-SAXS	56
4.2	Dados de entrada	57
4.3	Matrizes de rotação	58
4.4	Potencial do Pivot-SAXS	63
4.5	Resultados	65

5 Conclusão.	75
Referências.	76
Anexo A Parâmetros de Cromer-Mann.	83
Anexo B Critério de Metropolis.	86
Anexo C Curvas teóricas	88

1. Introdução.

Conhecer a estrutura terciária de uma macromolécula é um passo fundamental para estudos tanto do comportamento da proteína em diversos ambientes[2, 3, 4, 5, 6] quanto de sua interação com outras moléculas[7, 8, 9, 10]. Assim, muitas técnicas experimentais foram desenvolvidas para tentar observar o arranjo conformacional das macromoléculas, cada qual com suas vantagens e desvantagens, possibilitando hoje a existência de um banco de dados de estruturas de proteínas com mais de 202000 sequências depositadas até dia 15 de março de 2023, o PDB - do inglês Protein Data Bank[11]. As técnicas de caracterização conformacional em solução disponíveis atualmente, tais quais o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), a ressonância magnética nuclear (RMN) e transferência ressonante de energia por fluorescência(FRET), possuem fatores limitantes ao estudo das proteínas que dificultam a observação de macromoléculas biológicas muito grandes, muito flexíveis ou com alguma dinâmica conformacional, abrindo espaço para a predição teórica de estruturas.

A partir do estudos de Anfinsen[12], diversas teorias sobre como a conformação final está codificada na estrutura primária surgiram e possibilitaram o desenvolvimento de métodos de predição baseados na sequência de resíduos de aminoácidos[13, 14, 15, 16] e na homologia com estruturas cristalográficas já depositadas no PDB. Nesses casos, a mobilidade e as possibilidades de mudanças conformacionais ainda não são plenamente consideradas. Assim, uma combinação entre técnicas experimentais de estudos em solução e métodos teórico-computacionais se mostra uma boa alternativa à investigação do sistema biológico e suas dinâmicas.

A técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo ou SAXS, do

nome em inglês *small angle X-ray scattering* é muito eficiente para a observação do comportamento estrutural da proteína em solução e está disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), o único laboratório de luz síncrotron da América Latina. Porém a falta de ferramentas capazes de calcular modelos estruturais que satisfaçam o dado experimental, leva ao descarte destes dados e à busca por outras técnicas mais cara e complexas.

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado no campus do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-SP, possui laboratórios de ponta que oferecem uma infraestrutura avançada para a obtenção de dados de SAXS. Anteriormente, o local abrigava o UVX, que era o único equipamento desse tipo na América Latina na época de sua inauguração e possuía um anel de cerca de 93 metros de circunferência e 30 metros de diâmetro. No entanto, o UVX foi desativado para dar lugar ao Sirius, um projeto revolucionário na ciência brasileira, cuja construção teve início em 2014 e foi inaugurado em 14 de novembro de 2018. O Sirius abriga um anel de cerca de 518 metros de circunferência e 165 metros de diâmetro, com até 38 linhas de luz e a capacidade de alcançar energias de 3 GeV [17]. Em 2020, a primeira linha de luz do Sirius foi ativada, o que tem auxiliado em estudos importantes, incluindo pesquisas relacionadas à COVID-19. Para melhor compreensão da estrutura do Sirius, é possível conferir o esquema na figura 1.1.

O Brasil oferece tecnologia avançada para a comunidade científica, incluindo equipamentos de ponta para análise de SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP, como descrito anteriormente. No entanto, é importante destacar que essa técnica também está acessível a outros pesquisadores, pois existem equipamentos de bancada disponíveis que permitem a obtenção de dados de boa qualidade de forma simples e prática. Dessa forma, o SAXS é uma ferramenta amplamente disponível e pode ser utilizada em diversas áreas de pesquisa.

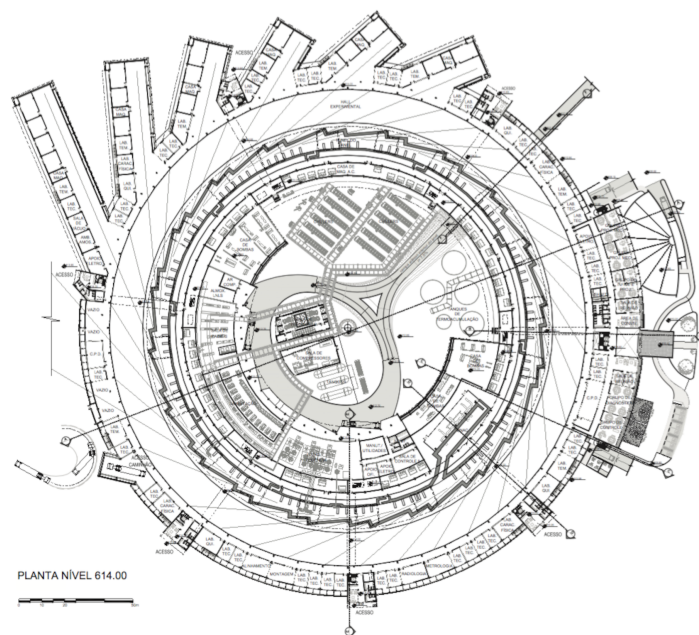


Figura 1.1: Planta baixa do Sirius no LNLs. A figura mostra o anel do Sirius em detalhes, incluindo suas 40 linhas de luz e as estações de pesquisa. [17].
 Fonte: CNPEM [17].

Por si só, os dados de SAXS já permitem diversas análises estruturais [18, 19] tais como raio de giro, estado de enovelamento, distância de pares [20] e mudanças conformacionais. SAXS é uma técnica de baixa resolução, ou seja, limitações intrínsecas do método, discutidas na seção 2.4, impossibilitam a recuperação completa das posições atômicas tridimensionais e assim, a associação com algoritmos computacionais foi essencial para que as análises estruturais tivessem maior precisão. Stuhmann [21] foi pioneiro no cálculo do envelope das proteínas a partir de uma curva experimental, desde então já se desenvolveram programas capazes de calcular uma curva de espalhamento teórica a partir de posições atômicas fornecidas, dentre os mais conhecidos estão o Crysol [22] e FoXS [23]. A combinação das ferramentas teórico e experimental se prova, assim, muito proveitosa para enriquecer os estudos sobre a superfície da molécula [24, 25, 26], enovelamento [5] e mudanças conformacionais [27, 28].

Este trabalho teve como objetivo expandir a aplicabilidade da técnica SAXS, utilizada em estudos de superfície de proteínas, para análises estruturais mais complexas. Para isso, foi desenvolvido o programa Pivot-SAXS, que utiliza o perfil de espalhamento e movimentos de pivot para estimar possíveis estruturas terciárias da proteína em solução. A utilização desta informação é importante para o estudo de mudanças conformacionais, mecanismos de funcionamento e para a possibilidade de utilização em conjunto com preditores de estrutura secundária para estruturas não cristalizáveis. Neste estudo, são descritos os algoritmos utilizados no Pivot-SAXS, incluindo o algoritmo SAXS-factor, que é semelhante a outros softwares utilizados pela comunidade científica. O algoritmo SAXS-factor foi validado no capítulo [3](#) e, em seguida, incorporado ao Pivot-SAXS no capítulo [4](#).

Nos capítulos seguintes detalharemos mais sobre a teoria do espalhamento de raios-X a baixo ângulo, demonstraremos os passos e explicaremos todas as etapas de validação que foram necessárias durante a construção do programa final.

5. Conclusão.

O objetivo do trabalho consistiu em utilizar somente movimentos de pivot para transformar uma estrutura inicial em uma estrutura alvo representativa em solução. A fim de alcançar tal objetivo, utilizou-se um potencial que consistiu em um potencial de esfera rígida e o fator de discrepância entre as curvas de espalhamento experimentais e da conformação gerada pelo programa. Além da minimização do potencial, o programa teve que gerar uma nova conformação por meio da rotação de um dos ângulos diedrais, calcular a curva de espalhamento desta configuração e o χ . O programa SAXS-factor foi desenvolvido para essa finalidade e comparado com programas já utilizados pela comunidade científica, a fim de validar a sua eficiência.

No capítulo [3](#) pode-se notar a alta correlação entre o programa desenvolvido e outros amplamente utilizados pela comunidade científica. Por ter sido criado com o objetivo de integrar o Pivot-SAXS, a validação do SAXS-factor é importante para consolidar a originalidade e eficácia do Pivot-SAXS como um software capaz de avaliar estruturas de acordo com os dados experimentais de SAXS.

Para realizar os primeiros testes com Pivot-SAXS, foi necessário utilizar estruturas abertas geradas pelo software Chimera. Os resultados comparativos do capítulo [4](#), juntamente com os valores de RMSD da tabela [3.1](#), demonstram que o potencial formado pelas energias de esfera rígida e χ é altamente eficiente no tratamento de proteínas pequenas. A estruturação de folhas- β é mais complexa devido ao direcionamento necessário das cadeias laterais para formar interações de hidrogênio. Implementar um potencial que leve em consideração tais interações é bastante complicado, sendo necessário analisar se o ganho real de acurácia é maior do que o custo em tempo

computacional para obter tais resultados.

O software Pivot-SAXS é uma ferramenta versátil que se mostrou eficiente na caracterização de macromoléculas em solução, sendo capaz de prever a estrutura de proteínas e avaliar alterações conformacionais. A seção 4.5 apresenta uma análise que comprova a funcionalidade do Pivot-SAXS não apenas para quimeras, mas também para outras macromoléculas que possuem subunidades bem estruturadas.

O método Pivot-SAXS se mostrou capaz de detectar mudanças conformacionais em proteínas, utilizando apenas informações estruturais. Isso o torna útil em circunstâncias em que a resolução dos dados experimentais é baixa e não é possível obter uma estrutura final. Em tais casos, o Pivot-SAXS pode procurar a estrutura ótima e encontrar várias estruturas possíveis que minimizam o fator de discrepância. Ele é capaz de explorar o espaço conformacional e aceitar apenas estruturas fisicamente possíveis. Essas características tornam o Pivot-SAXS uma excelente opção para estudos que envolvem a caracterização de macromoléculas em solução.

Pode-se concluir que o movimento de pivot é eficiente para todos os objetivos propostos. Se mostrando versátil e adaptável à cada um dos problemas propostos.

Referências.

- 1 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6 ed.. ed. Porto Alegre: Dykinson, 2014. 425 p. ISBN 9781429234146.
- 2 YANG, J. S. et al. All-Atom Ab Initio Folding of a Diverse Set of Proteins. *Structure*, v. 15, n. 1, p. 53–63, 1 2007. ISSN 09692126.
- 3 AHLSTROM, L. S. et al. Multiscale modeling of a conditionally disordered pH-sensing chaperone. *Journal of Molecular Biology*, Elsevier Ltd, v. 427, n. 8, p. 1670–1680, 2015. ISSN 10898638.
- 4 CONTESSOTO, V. d. G. et al. TKSA-MC: A web server for rational mutation through the optimization of protein charge interactions. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, v. 86, n. 11, p. 1184–1188, 11 2018. ISSN 08873585.
- 5 HARAN, G. How, when and why proteins collapse: The relation to folding. *Current Opinion in Structural Biology*, Elsevier Ltd, v. 22, n. 1, p. 14–20, 2012. ISSN 0959440X.
- 6 CONTESSOTO, V. d. G. et al. NTL9 folding at constant pH: The importance of electrostatic interaction and pH dependence. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 12, n. 7, p. 3270–3277, 2016. ISSN 15499626.
- 7 BERTOZO, L. d. C. et al. Oxidative Alteration of Trp-214 and Lys-199 in Human Serum Albumin Increases Binding Affinity with Phenylbutazone: A Combined Experimental and Computational Investigation. *Int. J. Mol. Sci., Int J Mol Sci*, v. 19, n. 10, 2018. ISSN 1422-0067.
- 8 DAMÁSIO, A. R. L. et al. Understanding the function of conserved variations in the catalytic loops of fungal glycoside hydrolase family 12. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 111, n. 8, p. 1494–1505, 2014. ISSN 10970290.
- 9 HAVRANEK, J. J.; DUARTE, C. M.; BAKER, D. A Simple Physical Model for the Prediction and Design of Protein–DNA Interactions. *Journal of Molecular Biology*, Academic Press, v. 344, n. 1, p. 59–70, 11 2004.
- 10 DIAS, R. V. R. et al. Csk α C Helix: A Computational Analysis of an Essential Region for Conformational Transitions. *The journal of physical*

chemistry. B, J Phys Chem B, v. 126, n. 50, p. 10587–10596, 12 2022. ISSN 1520-5207.

11 BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, v. 58, n. 6 I, p. 899–907, 2002. ISSN 09074449.

12 ANFINSEN, C. B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. Science, v. 181, n. 4096, p. 223–230, 7 1973. ISSN 0036-8075.

13 ROHL, C. A. et al. Modeling structurally variable regions in homologous proteins with rosetta. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, John Wiley & Sons, Ltd, v. 55, n. 3, p. 656–677, 4 2004. ISSN 08873585.

14 ARAÚJO, A. F. Pereira de; ONUCHIC, J. N. A sequence-compatible amount of native burial information is sufficient for determining the structure of small globular proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 45, p. 19001–19004, 11 2009. ISSN 0027-8424.

15 HARDIN, C. et al. Associative memory Hamiltonians for structure prediction without homology: α/β proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 4, p. 1679–1684, 2003. ISSN 00278424.

16 ROST, B. Review: Protein Secondary Structure Prediction Continues to Rise. Journal of Structural Biology, Academic Press Inc., v. 134, n. 2-3, p. 204–218, 5 2001. ISSN 10478477.

17 LNLS. Historia de Pionerismo. Disponível em: <https://lnls.cnpem.br/sobre/historia/>.

18 GLATTER, O.; KRATKY, O. Small Angle X-ray Scattering. 1^a edição. ed. New York, New York: Academic Press, 1982. 515 p. ISSN 1521-4044. ISBN 0-12-286280-5.

19 FEIGN, L. A.; SVERGUN, D. I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. 1^a edição. ed. New York: Plenum Press, 1987. v. 40. 352 p. ISSN 03237648. ISBN 0-306-42629-3.

20 CHEN, P.-c.; HENNIG, J. The role of small-angle scattering in structure-based screening applications. Biophysical Reviews, Biophysical Reviews, v. 10, n. 5, p. 1295–1310, 10 2018. ISSN 1867-2450.

21 STUHRMANN, H. B. Interpretation of small-angle scattering functions of dilute solutions and gases. A representation of the structures related to a one-particle scattering function. Acta Crystallographica Section A:

Foundations of Crystallography, International Union of Crystallography, v. 26, n. 3, p. 297–306, 5 1970. ISSN 0567-7394.

22 SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal*, v. 76, n. 6, p. 2879–2886, 1999. ISSN 0006-3495.

23 SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; HAMMEL, M.; SALI, A. FoXS: a web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles. *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. Web Server, p. W540–W544, 7 2010. ISSN 0305-1048.

24 SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. J. Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. *Biophysical Journal*, Elsevier, v. 80, n. 6, p. 2946–2953, 6 2001. ISSN 00063495.

25 SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports on Progress in Physics*, v. 66, n. 10, p. 1735–1782, 2003. ISSN 0034-4885.

26 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, v. 36, n. 3, p. 860–864, 6 2003. ISSN 0021-8898.

27 DONIACH, S. Changes in Biomolecular Conformation Seen by Small Angle X-ray Scattering. *Chemical Reviews*, American Chemical Society, v. 101, n. 6, p. 1763–1778, 6 2001. ISSN 0009-2665.

28 JAMROS, M. A. et al. Proteins at work: A combined small angle x-ray scattering and theoretical determination of the multiple structures involved on the protein kinase functional landscape. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 46, p. 36121–36128, 2010. ISSN 00219258.

29 PUTNAM, D. K.; LOWE, E. W.; MEILER, J. Reconstruction of Saxes Profiles From Protein Structures. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 8, n. 11, p. e201308006, 2013. ISSN 20010370.

30 PATTERSON, A. L. A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Physical Review*, v. 46, n. 5, p. 372–376, 9 1934. ISSN 0031-899X.

31 DEBYE, P.; ANDERSON, H. R.; BRUMBERGER, H. Scattering by an Inhomogeneous Solid. II. The Correlation Function and Its Application. *Journal of Applied Physics*, v. 28, n. 6, p. 679–683, 6 1957. ISSN 0021-8979.

- 32 POROD, G. Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen. *Kolloid-Zeitschrift*, Springer-Verlag, v. 124, n. 2, p. 83–114, 11 1951. ISSN 0303-402X.
- 33 GUINIER, A.; FOURNET, G. Small-angle scattering of X-rays. 1^a edição. ed. New York, New York: Wiley, 1955. 268 p. ISSN 01463535. ISBN 0146-3535.
- 34 HURA, G. L. et al. Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nature Methods*, v. 6, n. 8, p. 606–612, 8 2009. ISSN 1548-7091.
- 35 SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, International Union of Crystallography, v. 28, n. 6, p. 768–773, 12 1995. ISSN 00218898.
- 36 FRANKE, D.; SVERGUN, D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, v. 42, n. 2, p. 342–346, 4 2009. ISSN 00218898.
- 37 CHACÓN, P. et al. Low-Resolution Structures of Proteins in Solution Retrieved from X-Ray Scattering with a Genetic Algorithm. *Biophysical Journal*, v. 74, n. 6, p. 2760–2775, 6 1998. ISSN 00063495.
- 38 CHACÓN, P. et al. Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm. *Journal of Molecular Biology*, v. 299, n. 5, p. 1289–1302, 6 2000. ISSN 00222836.
- 39 DEBYE, P. Zerstreung von Röntgenstrahlen. *Annalen der Physik*, WILEY-VCH Verlag, v. 351, n. 6, p. 809–823, 1 1915. ISSN 00033804.
- 40 TONG, D.; YANG, S.; LU, L. Accurate optimization of amino acid form factors for computing small-angle X-ray scattering intensity of atomistic protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 49, n. 4, p. 1148–1161, 8 2016. ISSN 16005767.
- 41 TONG, D. Computer modeling of solution X-ray scattering intensity for biomacromolecules. 2016.
- 42 BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem*, v. 91, p. 6269–6271, 1987.
- 43 RAVIKUMAR, K. M.; HUANG, W.; YANG, S. Fast-SAXS-pro: a unified approach to computing SAXS profiles of DNA, RNA, protein, and

- their complexes. *The Journal of chemical physics*, v. 138, p. 7, 2013. ISSN 1089-7690.
- 44 VALENTINI, E. et al. SASBDB, a repository for biological small-angle scattering data. *Nucleic Acids Research*, 2015. ISSN 13624962.
- 45 JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, *J Mol Biol*, v. 292, n. 2, p. 195–202, 9 1999. ISSN 00222836.
- 46 RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, v. 23, n. C, p. 283–437, 1968. ISSN 00653233.
- 47 KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, v. 4, n. 12, p. 1395–1400, 12 1996. ISSN 09692126.
- 48 HO, B. K.; THOMAS, A.; BRASSEUR, R. Revisiting the Ramachandran plot: Hard-sphere repulsion, electrostatics, and H-bonding in the α -helix. *Protein Science*, v. 12, n. 11, p. 2508–2522, 1 2003. ISSN 09618368.
- 49 HO, B. K.; BRASSEUR, R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. *BMC structural biology*, v. 5, p. 14, 2005. ISSN 1472-6807.
- 50 BATSANOV, S. S. Van der Waals Radii of Elements. *Inorganic Materials Translated from Neorganicheskie Materialy Original Russian Text*, v. 37, n. 9, p. 871–885, 2001. ISSN 0020-1685, 1608-3172.
- 51 TATIANI, C. Desenvolvimento de ferramentas computacionais para o estudo de macromoléculas. [S.l.]: Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2016. 80 p.
- 52 ZWANZIG, R.; SZABO, A.; BAGCHI, B. Levinthal's paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 1, p. 20–22, 1992. ISSN 0027-8424.
- 53 THORNTON, S. T.; MARION, J. B. *Classical Dynamics of Particles and Systems*. [S.l.]: Brooks/Cole, 2004. 672 p. ISSN 00160032. ISBN 0-534-40896-6.
- 54 METROPOLIS, N. et al. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics*, v. 21, n. 6, p. 1087–1092, 6 1953. ISSN 0021-9606.
- 55 CLARKE, N. D. et al. Structural studies of the engrailed homeodomain. *Protein science : a publication of the Protein Society*, v. 3, n. 10, p. 1779–87, 1994. ISSN 0961-8368.

56 MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. [S.l.], 2000. v. 16, n. 4, 404–405 p.

57 COTA, J. et al. Assembling a xylanase-lichenase chimera through all-atom molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, Elsevier B.V., v. 1834, n. 8, p. 1492–1500, 8 2013. ISSN 18781454.

58 OLIVEIRA, L. C. d. et al. Conformational Changes in a Hyperthermostable Glycoside Hydrolase: Enzymatic Activity Is a Consequence of the Loop Dynamics and Protonation Balance. *PLoS ONE*, Public Library of Science, v. 10, n. 2, p. e0118225, 2 2015. ISSN 1932-6203.

59 BROWN, P. J. et al. Intensity of diffracted intensities. In: PRINCE, E. (Ed.). *International Tables for Crystallography*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. C, p. 554–595. ISBN 978-1-4020-5408-2.