

Selma Anita Tamashiro

Enovelamento de Proteínas: A Importância das Interações Eletrostáticas



1910000945





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

Departamento de Física
Programa de Pós-Graduação em Biofísica
Área de concentração Biofísica Molecular

SELMA ANITA TAMASHIRO

**ENOVELAMENTO DE PROTEÍNAS:
A IMPORTÂNCIA DAS
INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS**



Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", como parte das exigências para obtenção
do título de MESTRE EM BIOFÍSICA - Área
de concentração BIOFÍSICA MOLECULAR.

Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

Co-orientador: Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP
MARÇO - 2000

AGRADECIMENTOS

À orientador Prof. Dr. Adonísio Lopes Corrêa, agradeço pela oportunidade de continuar os estudos.

À co-orientador Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto pelo acompanhamento desde a iniciação científica até a final do mestrado.

À coordenador do curso Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, "um físico por formação e um matemático de vocação", pelos esclarecimentos, sua paciência e bom senso demonstrado ao longo destes anos.

À mãe amado por agradecer por sua postura firme, segura e animadora sempre me incentivando a prosseguir por mais difícil que fosse o caminho.

Aos meus queridos irmãos Sérgio Takeshi, Stanley Yone, Sílvia Mauro e Maria do Socorro pelo carinho e incentivo, e às minhas queridas Juliana, Gabriela e na União por existirem.

À querida mugrelo Lílian Riccu Medeiros pelas "inúmeras" horas de agradáveis conversas e principalmente pelo apoio, respeito e confiança em nossa amizade.

À Prof. Dr. Marcelo André Fussey pelo incentivo, desde o início do mestrado até o esperado final.

À Prof. Dr. Jorge Chahine por estar sempre disposto a um diálogo, pela seriedade em discutir os "mistérios do Júbong" e pelo apoio.

Aos professores Drs. Ivair Barbana Pereira Leite, Marco Antônio Cândido Ribeiro, João Ruggiero Neto, José Ramon Beltrán Abrego, Walter Filgueira de Azevedo Jr., Elai da Silva Feitosa, Márcio Colomba, Elso Drigo Filho, Jamhy Rezuan Olivieri e Rajeshvir Krishnaswamy Arni pela disposição em ajudar quando foi necessário.

Aos funcionários Iva Cezílio Bernardes, Paulo Roberto Salazar, Antônio Aparecido Barbosa e Maria José Marques Retuchi pela boa vontade, apoio e simpatia do dia-a-dia.

Em memória de minha mãe, Ana.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio agradeço pela oportunidade de continuar os estudos.

Ao co-orientador Prof. Dr. Augusto Agostinho Neto pelo acompanhamento desde a iniciação científica até o final do mestrado.

Ao coordenador do curso Prof. Dr. José Roberto Ruggiero, 'um físico por formação e um matemático de coração', pelos esclarecimentos, sua paciência e bom senso demonstrado ao longo destes anos.

Ao meu amado pai agradeço por sua postura firme, segura e animadora sempre me incentivando a prosseguir por mais difícil que fosse o caminho.

Aos meus queridos irmãos Sergio Takeshi, Shirley Yone, Silvio Mauro e Maria do Socorro pelo carinho e incentivo, e às minhas queridas Juliana, Gabriela e tia Dinha por existirem.

À querida magrela Lilian Ricco Medeiros pelas 'trocentas' horas de agradáveis conversas e principalmente pelo apoio, respeito e confiança em nossa amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey pelo incentivo, desde o início do mestrado até o esperado final.

Ao Prof. Dr. Jorge Chahine por estar sempre disposto a um diálogo, pela seriedade em discutir os 'mistérios do folding' e pelo apoio.

Aos professores Drs. Vitor Barbanti Pereira Leite, Marco Antônio Cândido Ribeiro, João Ruggiero Neto, José Ramon Beltran Abrego, Walter Filgueira de Azevedo Jr., Eloi da Silva Feitosa, Márcio Colombo, Elso Drigo Filho, Jonhny Rizzieri Olivieri e Raghuvir Krishnaswamy Arni pela disposição em ajudar quando foi necessário.

Aos funcionários Ilva Cecílio Bernardes, Paulo Roberto Salinas, Antônio Aparecido Barbosa e Maria José Marques Retuchi pela boa vontade, apoio e simpatia do dia-a-dia.

Às amigas Eliane Gonçalves e Fernanda Canduri por estarem sempre dispostas a ouvir com carinho alegrando meus dias tenebrosos, pela confiança e amizade nestes anos.

Aos amigos Elias Gonçalves, Classius, Valkirya, Denise e Reinaldo agradeço pelo incentivo, bons conselhos e carinho nestes anos.

Aos amigos Marcelo Menin, Gustavo Q. Romero, Rubens T. Honda, Felipe, Juliana e Adriana agradeço pelo carinho, amizade, confiança e pelas horas agradáveis de bate papo.

Às amigas Neide, Cecília e Janaína companheiras de jornada agradeço pela amizade, confiança e principalmente pelo tempero de bom humor.

Aos amigos Valmir, Gel, Pedro, Osmar, Magaiver, Gláucia, Fábio, Renato, Bernadete, Raquel, Dulcinéia, Giovannie e Flávio agradeço pela agradável convivência do dia-a-dia e pelos bons momentos nestes anos.

Aos amigos Plínio, Ricardo, Hamilton, Baixinho, Norma, Fátima, Milton, Ocimar, Benatti, Sandra e Daniel pela disposição em ajudar quando foi necessário e pelos bons momentos.

Aos colegas de jornada Cecília, Uderley, Jeniffer, Adriana, André, Willian, Charles, João Ricardo e David pelos bons momentos.

Aos novos amigos Luis Paulo, Luis, Luciana, Carla, Sabrina, Marcelo e Angelo alunos recém chegados e que já deram mostras de bom companherismo.

Aos professores do curso de Licenciatura em matemática pela dedicação na formação de seus alunos.

Aos titulares da banca examinadora, Prof. Dr. Pedro Pascutti e Prof. Dr. Antonio Caliri pela seriedade e profissionalismo na apreciação deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada.



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SELMA ANITA TAMASHIRO, APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, NO DIA 24 DE MARÇO DE 2000.

RESUMO 01

ABSTRACT 02

I. INTRODUÇÃO 03

II. MODELO PARA O POTENCIAL DE INTERAÇÃO 10

2.1. Introdução COMISSÃO JULGADORA: 11

2.2. Aproximação do modelo 15

2.3. Implementação do modelo 20

III. FORMA DOS PROGRAMAS 24

3.1. Introdução 24

3.2. Programas 25

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO 27

4.1. Introdução 27

4.2. Apresentação dos resultados 27

4.3. PROF. DR. MARINÔNIO LOPES CORNÉLIO 43

V. CONCLUSÃO 48

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

APÊNDICES 53

A.1. Número PROF. DR. ANTONIO CALIRI 53

A.2. Força resistiva 55

A.3. Torque resistivo 64

B.1. Microdomínio do modelo difusão-colisão 70

B.2. Tensor PROF. DR. PEDRO PASCUTTI 71

B.3. Espaço amostral 72

ÍNDICE

	RESUMO	01
	ABSTRACT	02
I.	INTRODUÇÃO	03
II.	MODELO PARA O POTENCIAL DE INTERAÇÃO	11
	2.1 Introdução	11
	2.2 Aproximação do modelo	15
	2.3 Implementação do modelo	20
III.	FORMA DOS PROGRAMAS	24
	3.1 Introdução	24
	3.2 Programas	25
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
	4.1 Introdução	27
	4.2 Apresentação dos resultados	27
	4.3 Discussão	43
V.	CONCLUSÃO	48
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	APÊNDICES	
	A.1 Número de Reynolds	53
	A.2 Força resistiva	55
	A.3 Torque resistivo	64
	B.1 Microdomínio do modelo difusão-colisão	70
	B.2 Tensor de inércia	71
	B.3 Espaço amostral	72



ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 - Propriedades dos microdomínios.	28
Tabela 4.2 - Comprimento do laço entre dois microdomínios consecutivos	28
Tabela 4.3 - Distância entre centros de massa de pares de microdomínios.	29
Tabela 4.4 - Ângulos entre os pares de vetores dipolos elétricos. (Configuração nativa)	29
Tabela 4.5 - Distância entre os centros de massa. (Configuração nativa).	29
Tabela 4.6 - Distância entre os centros de massa durante a dinâmica do programa A.	30
Tabela 4.7 - Distância entre centros os de massa durante a dinâmica do programa B.	33
Tabela 4.8 - Distância entre os centros de massa durante a dinâmica do programa C.	36
Tabela 4.9 - Distância entre os centros de massa durante a dinâmica do programa C (Continuação).	37
Tabela 4.10 - Distância entre os centros de massa durante a dinâmica do programa D.	40
Tabela 4.11 - Área acessível ao solvente perdida entre pares de hélices. (Configuração nativa)	46



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação estrutural do aminoácido.	03
Figura 2: Caráter de ressonância entre as ligações C=O e N-C.	04
Figura 3: Proteína hemeritrina (a). Elementos básicos do modelo (b).	17
Figura 4: Interação entre sítios de microdomínios.	19
Figura 5: Movimento de translação de um microdomínio (a). Movimento de rotação de um microdomínio (b).	21
Figura 6: Distância mínima entre dois microdomínios.	24
Figura 7: Distância máxima entre dois microdomínios.	24
Figura 8: Sentido de colisão entre dois microdomínios.	25
Figura 9: Esquema dos quatro programas implementados.	25
Figura 10: Configurações do programa A. Inicial (I). Passo 39 (II). Passo 8904 (III).	30
Figura 11: Gráfico das distâncias entre pares de microdomínios do Programa A.	31
Figura 12: Gráfico dos ângulos entre pares de vetores de dipolos elétricos do Programa A.	32
Figura 13: Configurações do programa B. Inicial (I). Passo 32 (II). Passo 2192 (III).	33
Figura 14: Gráfico das distâncias entre pares de microdomínios do Programa B.	34
Figura 15: Gráfico dos ângulos entre pares de vetores de dipolos elétricos do Programa B.	35
Figura 16: Configurações do programa C. Inicial (I). Passo 170 (II). Passo 181 (III). Passo 213 (III).	36

Figura 17: Configurações do programa C (continuação). Passo 255 (V). Passo 423 (VI). Passo 426 (VI).	37
Figura 18: Gráfico das distâncias entre pares de microdomínios do programa C.	38
Figura 19: Gráfico dos ângulos entre pares de vetores de dipolos elétricos do Programa C.	39
Figura 20: Configurações geradas pelo programa D. Inicial (I). Passo 170 (II). Passo 2631 (III). Passo 3042 (IV).	40
Figura 21: Gráfico das distâncias entre pares de microdomínios do Programa D.	41
Figura 22: Gráfico dos ângulos entre pares de vetores de dipolos elétricos do Programa D.	42
Figura 23: Pares de microdomínios obtidos da dinâmica do programa D.	45
Figura 24: Esquema de orientação (a) dos vetores de dipolos elétricos na Configuração nativa da proteína hemeritrina. Vista de um corte transversal (b) aos vetores de dipolos elétricos.	47

Apêndice A.2

Figura A.2.1: Esfera em movimento retilíneo e uniforme.	55
Figura A.2.2: Movimento estacionário em torno de uma esfera.	56
Figura A.2.3: Sistema de coordenada no centro de massa da esfera.	56
Figura A.2.4: Esfera movendo-se com velocidade - $\vec{u}$.	59

Apêndice A.3

Figura A.3.1: O fluido ocupa o volume compreendido entre duas cascas de esferas concêntricas de raios $R_2 > R_1$.	65
--	----



Resumo

Uma dinâmica molecular baseada na interação coulombiana e na força resistiva do fluido é usada para estimar a importância da interação eletrostática entre elementos estruturais secundários de proteínas globulares. Nesta dinâmica, um meio dielétrico contínuo é utilizado, substituindo o modelo discreto de moléculas de água para o solvente. A simulação é feita com quatro hélices- α , cujas estruturas são similares às quatro hélices da proteína hemeritina. Considera-se que há uma distribuição de cargas discretas nas hélices- α modeladas como esferas, separadas por distâncias iguais ao comprimento da β -turn existente entre as hélices- α da hemeritina. Uma boa concordância com dados experimentais foi obtida.

Abstract

Molecular dynamics based on coulombic interactions and friction forces within the medium is used to study the importance of eletrostatic interaction between secondary structure elements of globular proteins. In this approach, a dielectric continuous medium model in opposition to the water molecular structure as discret model for the solvent is used. Like the hemeritryn, the simulation includes four α -helices. An assumption is made, that there is a discret distribution of charge throughout the α -helix modeled as spheres, separated by a distance equal to the lenght of the β -turn among them in hemeritryn. A good agreement with experimental data was obtained.

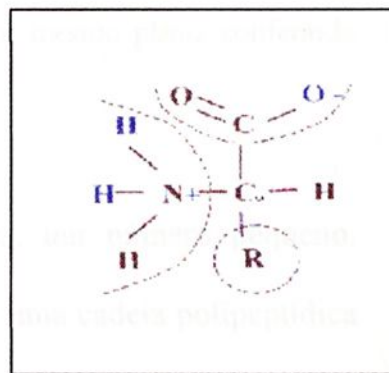


I. Introdução

Proteínas são estruturas biológicas essenciais em todos os organismos, classificadas em fibrosas, de membrana e globulares. A classe fibrosa tem função estrutural, podendo ocorrer em tecidos cutâneos e musculares, entre outros. As proteínas de membrana estão presentes nos ribossomos e nas paredes celulares. As proteínas globulares possuem funções diversas, como regulação de reações químicas, transporte intra e intercelular de oxigênio, íons e nutrientes no sangue. Tais proteínas são chamadas de globulares por possuírem, quando no estado funcional, uma forma compacta aproximadamente esférica (Voet & Voet, 1995).

Proteínas são formadas por longas cadeias de aminoácidos, unidas por ligações peptídicas. Cada aminoácido (Figura 1) contém um grupo amino, um carboxílico e um radical R denominado cadeia lateral, o qual é diferente para cada aminoácido, todos ligados covalentemente ao carbono denominado C_{α} .

Figura 1 – Ilustração da representação estrutural do aminoácido. Composto de um grupo carboxila, um grupo amino, um hidrogênio e um radical R, todos ligados covalentemente ao carbono central, denominado C_{α} . O radical R representa a cadeia lateral que diferencia os aminoácidos.



As ligações peptídicas são formadas através de reações de condensação com dois hidrogênios do grupo amino, de um aminoácido, e o $-O$ do grupo carboxílico, de outro aminoácido, liberando uma molécula de água e dando lugar à ligação peptídica (Voet & Voet, 1995). A ligação peptídica possui uma estrutura planar pelo caráter de dupla ligação ($N=C$), devido à ressonância da ligação $C=O$ e $N-C$, conferindo rigidez à sequência $C\alpha - N - C - C\alpha$ (Figura 2). O conjunto das sequências $C\alpha-N-C-C\alpha$ da cadeia, compõem o esqueleto da proteína (Atkins, 1994; Voet & Voet, 1995).

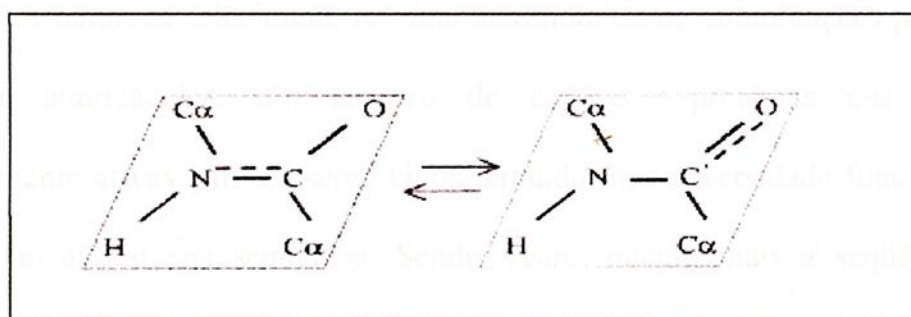


Figura 2 - Ilustração dos átomos envolvidos em uma ligação peptídica entre dois aminoácidos. O segmento tracejado representa o caráter da ressonância entre as ligações $C=O$ e $N-C$. Os seis átomos $C\alpha$, N, C, $C\alpha$, O e H estão no mesmo plano, conferindo rigidez ao conjunto.

Existem apenas vinte aminoácidos naturais, um número pequeno, porém com estes aminoácidos em diferentes posições de uma cadeia polipeptídica de n resíduos, podem-se formar 20^n diferentes sequências teoricamente possíveis (Creighton, 1978). Portanto diferentes proteínas possuem diferentes sequências de aminoácidos.

A sequência de aminoácidos de uma proteína globular é a estrutura primária da proteína. Esta cadeia desenovelada também é denominada forma aleatória ou faixa randômica. Quando em condições adequadas do meio solvente, agrupa-se para formar a estrutura enovelada final da proteína, denominada de nativa ou estrutura terciária. Na estrutura terciária podem ser observados padrões estruturais bem definidos, tais como hélices- α , folhas- β e laços (*turns*) (Chothia & Finkestein, 1990). Os elementos desse conjunto de padrões são chamados de estrutura secundária e na proteína nativa compõem a estrutura terciária (Voet & Voet, 1995).

A natureza selecionou, do total astronômico de combinações possíveis dos vinte aminoácidos, um número de cadeias protéicas que fossem biologicamente ativas para os seres vivos, criando uma diversidade funcional de proteínas ao alterar sua sequência. Sendo assim, quanto mais a sequência de aminoácidos de uma proteína se assemelha à sequência de aminoácidos de outra proteína, maior a probabilidade de terem estruturas homólogas e a mesma função (Voet & Voet, 1995).

O enovelamento, em condições adequadas do solvente, da cadeia de aminoácidos de uma proteína, resulta sempre na mesma estrutura tridimensional final, ou seja, a sequência de aminoácidos de uma dada proteína corresponde a uma estrutura terciária única (Voet & Voet, 1995). Cada resíduo de aminoácido faz duas ligações no esqueleto peptídico e para os ângulos diedrais ϕ (C_{α} -C) e ψ (N- C_{α}), uma certa quantidade de rotações é possível. Considerando-se também os



vários graus de liberdade das cadeias laterais, têm-se como resultado, que a proteína possui um grande potencial conformacional, a nível de conformação tridimensional.

O entendimento de como uma proteína enovela-se em sua conformação nativa é possível, se o caminho entre o estado desenovelado e o estado enovelado é conhecido. Um caminho é definido pelos estados intermediários e estados de transição, que ocorrem entre os estados desenovelado e enovelado final. Em qualquer população desenovelada de uma proteína, cada uma delas pode adquirir uma conformação distinta de qualquer outra da população. Assim, uma igual diversidade de caminhos pode existir nos primeiros estágios do enovelamento.

Qual é a natureza dos estados enovelados e desenovelados?

'Uma cadeia polipeptídica desenovelada, é aquela na qual um grande número de conformações rapidamente interconvertíveis, tem essencialmente energias iguais' (Creighton, 1978). Essas energias dependem das interações, de cada átomo da cadeia polipeptídica com outros átomos da própria cadeia e com os átomos do solvente. A partir de dados de cristalografia, sabe-se que a proteína enovelada possui uma estrutura altamente compacta com uma superfície extremamente irregular. As cadeias laterais, não polares, tendem a estar adentradas, escondidas do solvente, e as cadeias polares preferem ficar na superfície da proteína, em contato com o solvente (Voet & Voet, 1995).

Pode-se encarar o problema do enovelamento de proteínas do ponto de vista estático ou dinâmico. O ponto de vista estático considera a disposição dos aminoácidos na cadeia, aliado ao fato de proteínas, *in vitro*, sob condições

adequadas, enovelarem-se espontaneamente em sua conformação nativa, sem qualquer outra informação além da contida na sequência dos aminoácidos (Anfisen, 1973). Sendo a finalidade do código genético especificar a sequência de aminoácidos, a predição da estrutura de uma proteína a partir da sequência de aminoácidos é uma parte essencial, para a apreciação do problema total do enovelamento de proteínas. Então, do ponto de vista estático, sabe-se que a informação necessária para especificar a estrutura terciária da proteína, está contida na sequência de aminoácidos. O ponto de vista dinâmico diz respeito às forças que dirigem a cadeia de aminoácidos para sua conformação nativa, envolvendo questões, tais como:

- Como descrever a dinâmica do processo de enovelamento?
- Quais as forças que direcionam o enovelamento?
- Como explicar o curtíssimo tempo de enovelamento?
- É possível descrever o mecanismo de enovelamento?

O aspecto dinâmico do problema do enovelamento geralmente é expresso em termos do paradoxo de Levinthal (Levinthal, 1968), onde a realização de uma busca randômica, de todas as estruturas conformacionais possíveis, tomaria um tempo maior que a idade do universo para localizar a conformação nativa.

Sabe-se que a parte dinâmica está relacionada à parte estática, quanto à sequência de aminoácidos, mas não parece provável que a sequência de aminoácidos dependa das forças envolvidas no enovelamento (Karplus & Weaver, 1976).



O enigma do mecanismo de enovelamento, que tanto tem entusiasmado os pesquisadores, deve-se possivelmente à variabilidade de sua cinética, ou seja, o progresso de enovelamento no tempo. O enovelamento pode ter um tempo único de relaxação exponencial, com a mesma constante de razão para todos os processos envolvidos, ou pode apresentar múltiplas fases de cinética (Eaton, *et al.*, 1996).

Pouco se sabe como ou através de qual caminho as proteínas enovelam-se espontaneamente, nem se o fazem de uma das pontas da cadeia, a partir do meio, ou de vários pontos simultaneamente. Entretanto há indícios que o enovelamento espontâneo da cadeia polipeptídica em sua estrutura terciária é altamente cooperativo. Uma vez que uma mínima porção da cadeia tenha se dobrado adequadamente, aumenta muito a probabilidade do restante da cadeia enovelar-se corretamente. Há indícios de uma estrutura intermediária entre a estrutura completamente desenovelada e a estrutura terciária em certas proteínas globulares, chamada de forma colapsada (*molten globule*) (Ohgushi & Wada, 1983), onde há elementos estruturais secundários livremente associados, com uma estimativa de tempo de formação menor que um milissegundo. Do estado de forma colapsada para a estrutura terciária, o tempo pode chegar a segundos (Kuwagima, 1989). Estudos experimentais (Kuwagima *et al.*, 1987) demonstram que algumas proteínas globulares têm os elementos estruturais secundários definidos antes da formação da estrutura terciária. Isto confirma a existência dos padrões estruturais secundários entre a faixa aleatória e a estrutura terciária.

Este trabalho enfoca as proteínas globulares, e dentre estas aquelas que indicam a existência da estrutura intermediária forma colapsada, com elementos estruturais secundários associados livremente. Para estas proteínas, pode-se separar o processo de enovelamento em três fases. A primeira compreende a formação da forma colapsada a partir da cadeia desenovelada. A segunda, da qual trata o problema proposto neste trabalho, diz respeito às forças envolvidas no intervalo entre a estrutura secundária já formada e antes que ocorra a formação completa da estrutura terciária. A terceira é o chamado jogo-final (*endgame*) (Levit *et al.*, 1997), onde entram em ação as forças hidrofóbicas no rearranjo das cadeias laterais, para o alto empacotamento das mesmas.

A teoria atual diz que as principais forças que dirigem e estabilizam o enovelamento de proteínas são as interações eletrostáticas e o efeito hidrofóbico.

Efeito hidrofóbico é o nome dado às influências que substâncias não polares acarretam ao procurar minimizar seu contato com a água. Quando as moléculas de água envolvem resíduos não polares, formam uma estrutura que os encapsula de forma bem ordenada. Estes resíduos não polares ao se enovelarem, provocam o rompimento do encapsulamento destas moléculas de água bem ordenadas, disponibilizando-as de volta para o solvente, aumentando assim a entropia do solvente, o que compensa o decréscimo de entropia da proteína enovelada (Israelachvili, 1982).

A proposta deste trabalho é estimar a importância das interações eletrostáticas entre elementos estruturais secundários já formados e antes que ocorra a formação completa da estrutura terciária. Foi testada a idéia de que a força

eletrostática, existente entre estes elementos estruturais secundários, seja importante para aproximar tais estruturas secundárias, trazendo-as perto o suficiente para que se dê início à fase jogo-final.

Para dar execução a esta idéia, foram considerados somente os elementos estruturais secundários, desconsiderando os laços entre eles. Foi feita uma aproximação geométrica destes elementos isolados à esferas. Estas esferas podem girar e transladar em um meio fluido viscoso incompressível. O elemento estrutural é considerado neutro como um todo, mas devido à localização espacial dos átomos, há uma distribuição de cargas parciais característica, em cada elemento estrutural secundário. Por causa dessa distribuição característica há uma interação eletrostática entre estes elementos, que se orientam no meio fluido buscando o mínimo da interação. Esta interação pode ser atrativa ou repulsiva dependendo da orientação dos elementos estruturais secundários, os quais podem então, aproximar-se ou afastar-se.

Para implementar este projeto, criou-se quatro programas em fortran77, especialmente desenvolvidos para a dinâmica molecular em um meio fluido contínuo. A partir dos resultados obtidos, pode-se observar o comportamento destes elementos estruturais secundários, sob ação da interação eletrostática e da resistência do fluido.

Os parâmetros básicos foram obtidos a partir de dados de entrada do programa Gromos (Van Gunsteren & Berendsen, 1983), que realiza dinâmica molecular de açúcares e proteínas, e da literatura de estudos de fluidos (Landau & Lifchitz, 1971).



II. MODELO PARA O POTENCIAL DE INTERAÇÃO

2.1 Introdução

Enovelamento de proteínas ocorre somente em meio líquido, e em condições adequadas deste meio. Um meio solvente pode ser visto como um sistema discreto ou contínuo.

No estudo de um meio solvente, por exemplo a água, como um sistema discreto, considera-se como elemento do sistema cada molécula de água. Neste caso, o líquido é visto como um sistema denso, onde as moléculas de água estão muito próximas umas das outras, em constante movimento de rotação e translação. Este comportamento leva a inúmeros efeitos das forças intermoleculares.

No estudo de um meio solvente como um sistema contínuo, considera-se como elemento do sistema, um elemento de volume infinitesimal do fluido. Neste caso o líquido é comparado a um meio contínuo, onde um elemento de volume é considerado 'fisicamente' infinitesimal. Os fenômenos estudados na mecânica dos fluidos são encarados de um ponto de vista macroscópico. O elemento de volume de fluido infinitesimal, mesmo sendo visto como um ponto em hidrodinâmica, é tão grande que contém um número considerável de moléculas.

A descrição do estado de um fluido em movimento contém cinco grandezas, três são as componentes do vetor velocidade do fluido $\vec{v} = \vec{v}(x, y, z, t)$, e duas são grandezas termodinâmicas, a pressão $p(x, y, z, t)$, e a densidade $\rho(x, y, z, t)$. As funções a serem determinadas e as grandezas termodinâmicas relacionam-se aos

pontos do espaço, e não a um elemento de fluido que se desloca no curso do tempo, no espaço.

Para um fluido perfeito, um sistema completo de equações hidrodinâmicas deve conter cinco equações (Landau & Lifchitz, 1971):

$$1- \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \nabla) \vec{v} = -\frac{1}{\rho} \text{grad } p$$

$$4- \frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div } \rho \vec{v} = 0$$

$$2- \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \nabla) \vec{v} = -\nabla H$$

$$5- \frac{\partial s}{\partial t} + \vec{v} \text{ grad } s = 0$$

$$3- \frac{\partial}{\partial t} \text{rot } \vec{v} = \nabla \times (\vec{v} \times \nabla \times \vec{v})$$

As três primeiras são as chamadas equações de Euler, a quarta é a equação de continuidade e a quinta é a equação que exprime a adiabaticidade do sistema. Sendo H a entalpia e s a entropia do sistema. Para um fluido viscoso incompressível bastam duas equações para se obter um sistema completo de equações hidrodinâmicas. Se o movimento for estacionário, o estado deste fluido para um número de Reynolds pequeno (Apêndice A.1) é determinado por:

$$\text{Equação de Navier-Stokes: } \eta \nabla^2 \vec{v} = \nabla p \quad (1)$$

$$\text{Equação de continuidade } \text{div } \vec{v} = 0 \quad (2)$$

onde η é a viscosidade dinâmica.

Para um fluido viscoso incompressível a viscosidade é descrita por um só coeficiente. Sendo o solvente a água, têm-se $\eta = 0.010 \text{ gs}^{-1} \text{cm}^{-1}$ à temperatura de 20°C . Assim, a equação que permite descrever o movimento estacionário de um

fluido viscoso incompressível, para um número de Reynolds pequeno, onde não atua um campo gravitacional, é a equação de Navier-Stokes (1).

Para um corpo movendo-se em um fluido viscoso incompressível, pode-se separar o movimento em translação e rotação. Se este corpo for uma esfera de raio R , movendo-se com velocidade linear $\vec{u} = \text{constante}$ e girando com velocidade angular $\vec{\Omega} = \text{constante}$, a força resistiva (Apêndice A.2) e o momento das forças de atrito (Apêndice A.3) que atuam sobre ela, são dados por:

$$F_{\text{res}} = 6 \pi \eta R u \quad (3)$$

$$M_{\text{at.}} = -8 \pi \eta R^3 \Omega \quad (4)$$

No estudo das forças moleculares, o potencial de pares é muito utilizado para descrever interações de muitos corpos, onde os efeitos médios de três corpos podem ser parcialmente incluídos através de um potencial efetivo de pares. O potencial de pares pode ser dividido em intramolecular e intermolecular.

O potencial intramolecular descreve as distorções moleculares. Como neste projeto utiliza-se o modelo de molécula rígida, este potencial não é empregado.

O potencial intermolecular pode ser dividido em repulsivo e atrativo. O potencial repulsivo representa a repulsão eletrostática que surge entre as nuvens eletrônicas de dois átomos muito próximos. Esta força de repulsão determina o quão

perto um átomo pode chegar do outro. Um potencial repulsivo muito utilizado é o potencial de esfera dura, dado por:

$$U(r) = \begin{cases} \infty & r < \sigma \\ 0 & r > \sigma \end{cases} \quad (5)$$

onde $\frac{\sigma}{2}$ é o raio da esfera impenetrável.

O potencial atrativo representa a interação atrativa entre átomos e moléculas, classificado em eletrostático, de indução e de dispersão. Os potenciais atrativos de indução e de dispersão tem origem quântica e descrevem a interação entre os momentos de multipolo permanente com momentos de multipolo induzido e a interação entre os momentos de multipolo induzido com momentos de multipolo induzido, respectivamente.

O potencial eletrostático descreve as interações entre momentos de multipolo permanente: monopolos (q), dipolos (μ), etc. Estas interações podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da orientação dos multipolos.

O potencial eletrostático entre duas moléculas a e b é dado por:

$$U_{ab}(r) = \frac{q_a q_b}{r} - \frac{q_a \mu_b}{r^2} \cos \theta_b - \frac{\mu_a \mu_b}{r^3} (2 \cos \theta_a \cos \theta_b - \sin \theta_a \cos \theta_b \cos \phi) - \dots$$

onde θ_a , θ_b e ϕ são os ângulos que definem a orientação dos momentos de multipolo permanente das moléculas.

A média orientacional do potencial eletrostático é dado por:

$$U_{ab}(r) = \frac{q_a q_b}{r} - \frac{1}{kT} \left[\frac{q_a^2 \mu_b^2}{3r^4} + \frac{2\mu_a^2 \mu_b^2}{3r^6} + \dots \right] \quad (6)$$

onde k é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta.

No modelo proposto utiliza-se o primeiro termo do potencial eletrostático, a interação entre cargas, a conhecida interação coulombiana.

2.2 Aproximação para o modelo

Nosso trabalho se baseia na existência de elementos estruturais secundários livremente associados, presumivelmente no estado de forma colapsada, antes da estrutura terciária estar formada.

As evidências experimentais para a existência destes elementos estruturais foram apontados por Kuwagima e colaboradores para a α -lactoglobulina, lisosima, citocromo c , β -lactoglobulina (Kuwagima *et al.*, 1985; 1987), por Labhardt para a RNase S (Labhardt, 1984), por McCoy e colaboradores para a anidrase carbônica (McCoy *et al.*, 1980) em estudos cinéticos de CD.

Para as proteínas acima, não existe ainda evidência direta quanto a natureza da estrutura secundária, ou seja, não se sabe se os elementos da estrutura secundária possuem contatos terciários ou se são incipientes. Entretanto, foi apontado por Dyson e seus colaboradores para a síntese de fragmentos de seqüências das proteínas miohemeritina e plastocianina (Dyson *et al.*, 1992a; Dyson *et al.*, 1992b), evidências da existência de elementos estruturais secundários

nos fragmentos, tendo uma estrutura secundária bem definida, com contatos nativos. Estes estudos foram feitos com técnicas de NMR.

Experimentos sobre a relação viscosidade/enovelamento em oligopeptídeos (Haas *et al.*, 1978), ribonuclease A (Tsong, 1982) e a subunidade α do triptofano sintase da *Escherichia coli* (Hurle *et al.*, 1987; Chrnyk & Matthews, 1990) indicam uma clara dependência das razões do enovelamento com a viscosidade do solvente.

Na modelagem matemática do enovelamento de proteínas deve levar em conta, dada a extrema complexidade do processo de enovelamento, a dificuldade em equacionar todas as interações envolvidas. Simplificações e restrições são necessárias e bem vindas nos vários passos do desenvolvimento.

Pode ser empregado como elemento básico para o modelo, o elemento estrutural secundário, por exemplo uma hélice- α , ou pode ser usado um pedaço formado de um elemento estrutural secundário, como as estruturas- β que compõem uma folha- β .

Escolheu-se como elemento básico a hélice- α . Foi feita uma pesquisa no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*), para localizar uma proteína pequena, que só contivesse hélices- α . Encontrou-se, sob o código 2MHR, uma proteína chamada hemeritrina, contendo um feixe de quatro hélices- α e uma pequena hélice 3_{10} (Figura 3a). Esta hélice 3_{10} foi anexada à última hélice- α .

Ignorando os laços e considerando os elementos estruturais secundários isolados (Figura 3b), o modelo passou a ter quatro elementos básicos, quatro microdomínios.

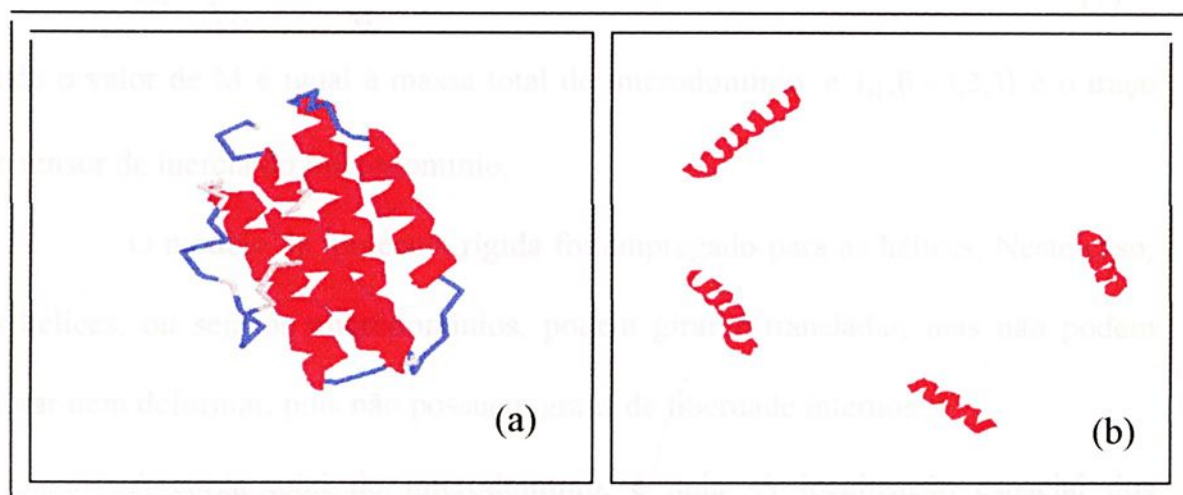


Figura 3 - Ilustração da proteína hemeritina (a), um feixe de quatro hélices- α e uma 3_{10} apresentadas em vermelho no formato faixa larga e os laços em azul e branco no formato conformação de esqueleto. Ignorando-se todas as partes da cadeia que não fazem parte das hélices, têm-se somente as quatro hélices (b) apresentadas no formato faixa larga. Representações do programa de visualização Rasmol. Estas hélices serão os elementos básicos do modelo.

O conceito de microdomínio para o elemento estrutural secundário do modelo difusão-colisão, (Apêndice B.1) foi empregado sob duas considerações:

1- Aproximação geométrica das 4 hélices- α , os microdomínios, por esferas.

2- Modelo de molécula rígida para o microdomínio.

Os microdomínios foram aproximados à esferas para tratamento matemático em meio fluído viscoso, sendo a força resistiva e o torque resistivo dados pelas equações (3) e (4). Para se obter o raio de um microdomínio, divide-se por três o traço do tensor de inércia do microdomínio (Apêndice B.2), e iguala-se o

resultado ao momento de inércia de uma esfera sólida, de massa M e raio R_1 , o raio do microdomínio a ser calculado:

$$R_1 = \sqrt{\frac{5}{6} \frac{(I_{11} + I_{22} + I_{33})}{M}} \quad (7)$$

onde o valor de M é igual à massa total do microdomínio, e $I_{ii}, (i = 1, 2, 3)$ é o traço do tensor de inércia do microdomínio.

O modelo de molécula rígida foi empregado para as hélices. Neste caso, as hélices, ou seja os microdomínios, podem girar e transladar, mas não podem vibrar nem deformar, pois não possuem graus de liberdade internos.

A carga total do microdomínio, é nula. A localização espacial dos átomos nos microdomínios, promove uma distribuição de cargas característica para cada microdomínio. O primeiro termo da interação eletrostática é utilizado entre os microdomínios. Calculam-se a força elétrica ($\vec{F}_{el.}$) e o torque elétrico ($\vec{T}_{el.}$) atuantes em cada microdomínio, dados por:

$$\vec{F}_{el.}(I) = \sum_{i=1}^{n_I} \sum_{\substack{J=1 \\ J \neq I}}^4 \sum_{j=1}^{n_J} \left(\frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \right) \left(\frac{q_{iI}q_{jJ}}{|\vec{r}_{iI,jJ}|^3} \right) \vec{r}_{iI,jJ} \quad (8)$$

$$\vec{T}_{el.}(I) = \sum_{i=1}^{n_I} \sum_{\substack{J=1 \\ J \neq I}}^4 \sum_{j=1}^{n_J} \left(\vec{r}_{iI} \times \vec{F}_{el.iI,jJ} \right) \quad (9)$$

onde,

q_{iI} = carga do átomo i da hélice I ,

$\vec{r}_{iI,jJ}$ = vetor da distância do átomo i da hélice I ao átomo j da hélice J ,

$\vec{r}_{iI}$ = vetor posição do átomo i no sistema de coordenadas do centro de massa da hélice I,

$\vec{F}_{iI,jJ}$ = vetor força elétrica atuante no átomo i da hélice I devido ao átomo j da hélice J,

n_I = número de átomos da hélice I,

ϵ_0 = permissividade no vácuo,

ϵ_r = constante dielétrica do meio.

Devido a complexidade da dependência radial e angular, o potencial intermolecular do Gromos é descrito através do somatório de potenciais de sítio. Estes sítios (Figura 4) descrevem a distribuição de cargas nos microdomínios. A interação entre dois microdomínios I e J é dada por:

$$U_{IJ} = \sum_{i=1}^{\text{número de sítios de I}} \sum_{j=1}^{\text{número de sítios de J}} U(r_{ij})$$

onde r_{ij} é a distância entre os sítios i e j .

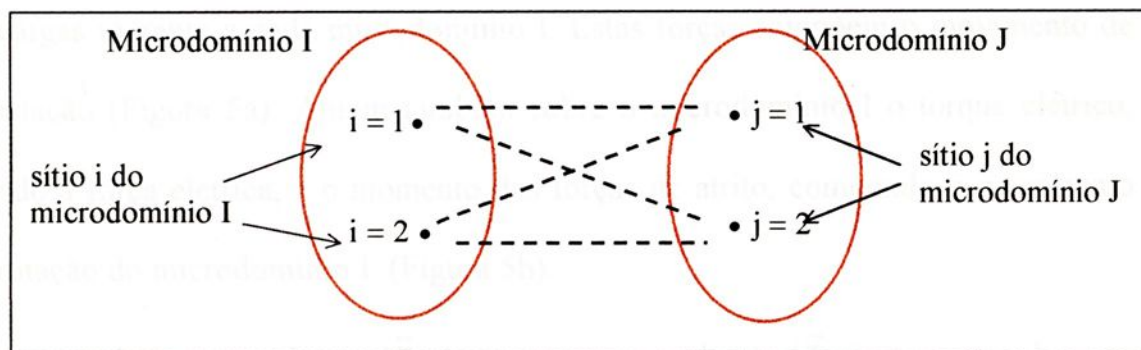


Figura 4 - Ilustração da interação entre dois microdomínios I e J. Neste exemplo, cada microdomínio tem dois sítios. Sendo i um sítio do microdomínio I e j um sítio do microdomínio J. O potencial entre os microdomínios I e J é composto pela soma de quatro termos: $U(r_{iI,jJ})$

$$U(r_{iI,jJ}), U(r_{iI,jJ}), U(r_{iI,jJ}), U(r_{iI,jJ}).$$

Desse modo, mesmo que sejam acessados todos os átomos dos microdomínios nos cálculos computacionais, a força elétrica e o torque elétrico estarão sendo calculados entre os sítios e não entre os átomos dos microdomínios.

Para que não ocorra a superposição dos átomos dos microdomínios durante a simulação, torna-se necessário especificar um raio de corte (R_2), uma distância mínima de aproximação entre os microdomínios. É utilizado o potencial repulsivo de esfera dura, dado pela equação (5), para o microdomínio, onde σ é a maior distância entre dois átomos do microdomínio I. Sendo $\frac{\sigma}{2} = R_2(I)$, o raio da esfera que envolve todos os átomos do microdomínio.

2.3 Implementação do modelo

Sobre um microdomínio I de massa $M(I)$ e raio $R_1(I)$ atuam uma força resistiva, devido à viscosidade do fluido, e uma força elétrica, devido à distribuição de cargas inerente a cada microdomínio I. Estas forças compõem o movimento de translação (Figura 5a). Atuam também sobre o microdomínio I o torque elétrico, devido à força elétrica, e o momento das forças de atrito, compondo o movimento de rotação do microdomínio I. (Figura 5b).

A força resultante ($\vec{F}_R$) e o torque resultante ($\vec{T}_R$) atuantes sobre um microdomínio são escritos como:

$$\vec{F}_R = \vec{F}_{el.} + \vec{F}_{res.} \quad (10)$$

$$\vec{T}_R = \vec{T}_{res.} + \vec{T}_{el.} \quad (11)$$

A força resultante ($\vec{F}_R$) e o torque resultante ($\vec{T}_R$) também podem ser escritos como:

$$\vec{F}_R = M \frac{d\vec{v}}{dt} \quad (12)$$

$$\vec{T}_R = I \frac{d\vec{\Omega}}{dt} \quad (13)$$

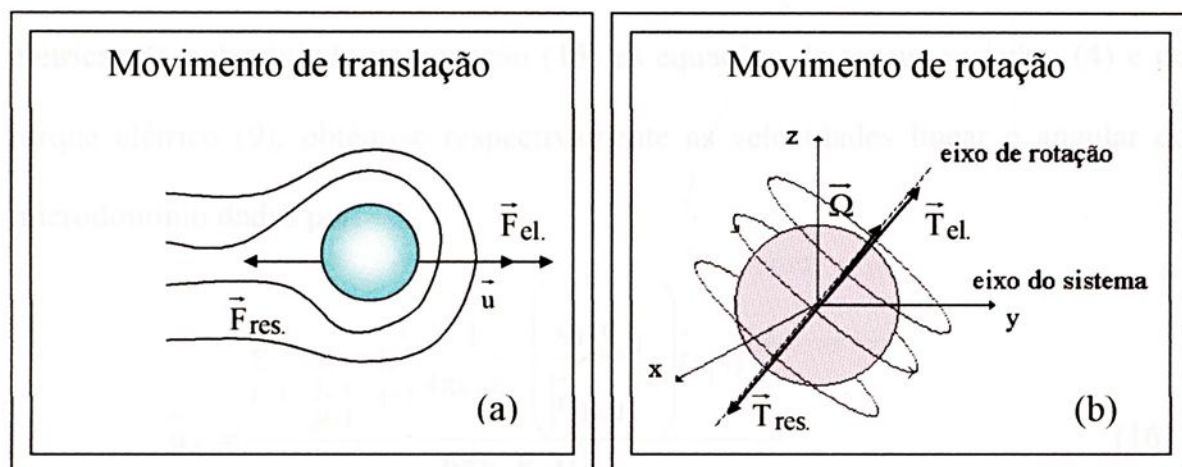


Figura 5 - Ilustração (a) do movimento de translação de um microdomínio de massa M e raio R , sob ação de uma força resistiva devido a viscosidade do fluido e uma força coulombiana devido a distribuição de cargas. Ilustração (b) do movimento de rotação de um microdomínio de massa M e raio R , girando em torno do eixo de rotação, sob ação do torque elétrico e do torque resistivo.

Suponha uma formiga e um elefante caindo de um galho de árvore ao mesmo tempo. O elefante tem uma massa grande, sendo sua inércia alta. Assim, o elefante demora a alcançar a velocidade limite e chega ao chão primeiro. A formiga tem uma massa bem menor e sua inércia é pequena. Assim, a formiga alcança rapidamente a velocidade limite e demora mais para chegar ao chão.

Equivalentemente, a massa do microdomínio é pequena e sua aceleração pode ser grande, mas a inércia é muito pequena. Assim, o microdomínio

rapidamente alcança a velocidade limite. Desse modo, pode-se escrever para o microdomínio:

$$\vec{F}_{el.} = -\vec{F}_{res.} \quad (14)$$

$$\vec{T}_{el.} = -\vec{T}_{res} \quad (15)$$

Substituindo na equação (14) as equações da força resistiva (3) e da força elétrica (8), substituindo na equação (15) as equações do torque resistivo (4) e do torque elétrico (9), obtém-se respectivamente as velocidades linear e angular do microdomínio dadas por:

$$\vec{u}_I = \frac{\sum_{i=1}^{n_I} \sum_{\substack{J=1 \\ J \neq I}}^4 \sum_{j=1}^{n_J} \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \left(\frac{q_{iI} q_{jJ}}{|\vec{r}_{iI,jJ}|^3} \right) \vec{r}_{iI,jJ}}{6\pi\eta R_I(I)} \quad (16)$$

$$\vec{\Omega}_I = \frac{\sum_{i=1}^{n_I} \sum_{\substack{J=1 \\ J \neq I}}^4 \sum_{j=1}^{n_J} \left(\vec{r}_{iI} \times \vec{F}_{el.iI,jJ} \right)}{8\pi\eta R_I^3(I)} \quad (17)$$

Um microdomínio ao mover-se num meio fluido, provoca o deslocamento do fluido em torno dele. Se existir um outro microdomínio próximo, então, devido ao movimento de fluido deslocado pela primeiro, este microdomínio próximo também se deslocará. Relevando-se este deslocamento de fluido, provocado pelo movimento de um microdomínio, para o equacionamento conjunto dos quatro microdomínios, obtém-se um modelo simplificado e que pode ser facilmente equacionado. Assim, para o modelo proposto, o deslocamento de um

microdomínio próximo a outro, não faz com que este outro se desloque devido ao movimento do primeiro. As únicas forças que atuam para os quatro microdomínios em um meio fluído viscoso são a eletrostática e a resistiva.

Numa dinâmica molecular, parte-se da configuração inicial do sistema, definida pelas posições atômicas $\mathbf{r} = (\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)$ dos átomos. Usando o potencial de interação $U(\mathbf{r})$, calculam-se as forças que atuam nos átomos, $\mathbf{F} = -\frac{dU}{d\mathbf{r}}$. Resolvem-se as equações de movimento para um intervalo de tempo Δt . Por fim, encontra-se a próxima configuração que define as novas posições dos átomos.

Na dinâmica molecular do modelo proposto, por se lidar com corpos rígidos, parte-se de uma configuração inicial definida pelas posições atômicas e pelo centro de massa do microdomínio. Usando as forças que atuam nos microdomínios, a integração das equações de movimento fornecem a velocidade do centro de massa e a velocidade angular de cada microdomínio. Estas velocidades quando aplicadas a todos os átomos do microdomínio para um intervalo de tempo $\Delta t = 1.0 \cdot 10^{-2} \mu\text{s}$, fornecem as novas posições atômicas e do centro de massa, gerando a nova configuração do sistema.

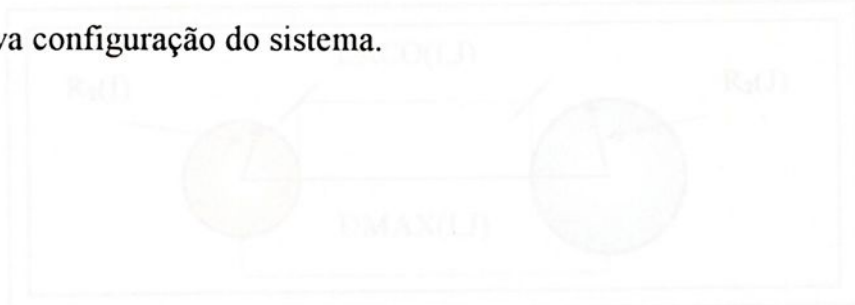


Figura 7 - Ilustração da dinâmica molecular proposta entre dois microdomínios $R_1(t)$ e $R_2(t)$, de raio de centro $R_1(t)$ e $R_2(t)$, respectivamente. O comprimento $L(t)$ representa o comprimento de interação, sendo $1.0 \text{ \AA}$ o comprimento médio de um resíduo de aminoácido, formado de C_α e C_β , no resíduo de aminoácido.

III. FORMA DOS PROGRAMAS

3.1 Introdução

Para estipular os intervalos de distâncias permitidos entre pares de microdomínios, definem-se distância mínima e máxima da seguinte forma:

- Distância mínima permitida entre dois microdomínios I e J (Figura 6) é fornecida pelo raio de corte (R_2) dos dois microdomínios:

$$DMIN(I,J) = R_2(I) + R_2(J)$$

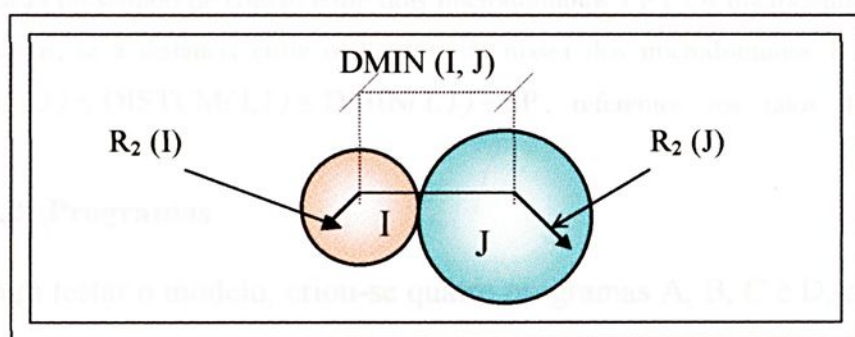


Figura 6 – A distância mínima permitida entre dois microdomínios I e J é igual à soma do raio de corte do microdomínio I, $R_2(I)$, com o raio de corte do microdomínio J, $R_2(J)$.

- Distância máxima permitida entre dois microdomínios (Figura 7):

$$DMAX(I,J) = R_2(I) + R_2(J) + LAÇO(I,J)$$

$$LAÇO(I,J) = 3.5 * m$$

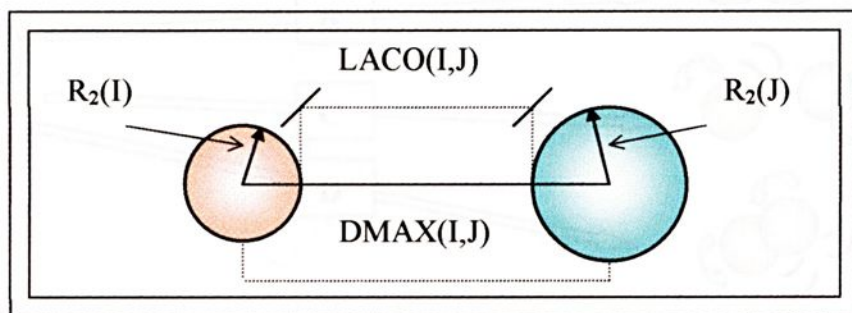


Figura 7 - Ilustração da distância máxima permitida entre dois microdomínio I e J, de raios de corte $R_2(I)$ e $R_2(J)$, respectivamente. O laço entre I e J possui m resíduos de aminoácidos, sendo 3.5 Å o comprimento médio de um resíduo de aminoácido, estimado de C_α a C_α na cadeia de aminoácidos.

Uma colisão entre dois microdomínios I e J, significa que a distância ($\text{DISTCM}(I,J)$) entre os centros de massa dos microdomínios I e J está no intervalo $[\text{DMIN}(I,J); \text{DMIN}(I,J)+\text{SP}]$, onde SP pode assumir valores entre $(0.5 \text{ \AA} \leq \text{SP} \leq 2 \text{ \AA})$.

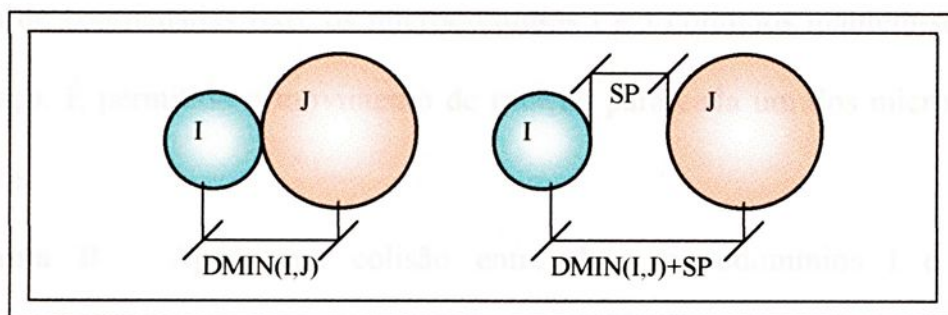


Figura 8 – Ilustração do sentido de colisão entre dois microdomínios I e J. Os microdomínios I e J são considerados colididos, se a distância entre os centros de massa dos microdomínios I e J estão no intervalo $\text{DMIN}(I,J) \leq \text{DISTCM}(I,J) \leq \text{DMIN}(I,J) + \text{SP}$, referentes aos raios de corte dos microdomínios.

3.2 Programas

Para testar o modelo, criou-se quatro programas A, B, C e D, os quais seguem os critérios descritos pelas ilustrações abaixo (Figura 9):

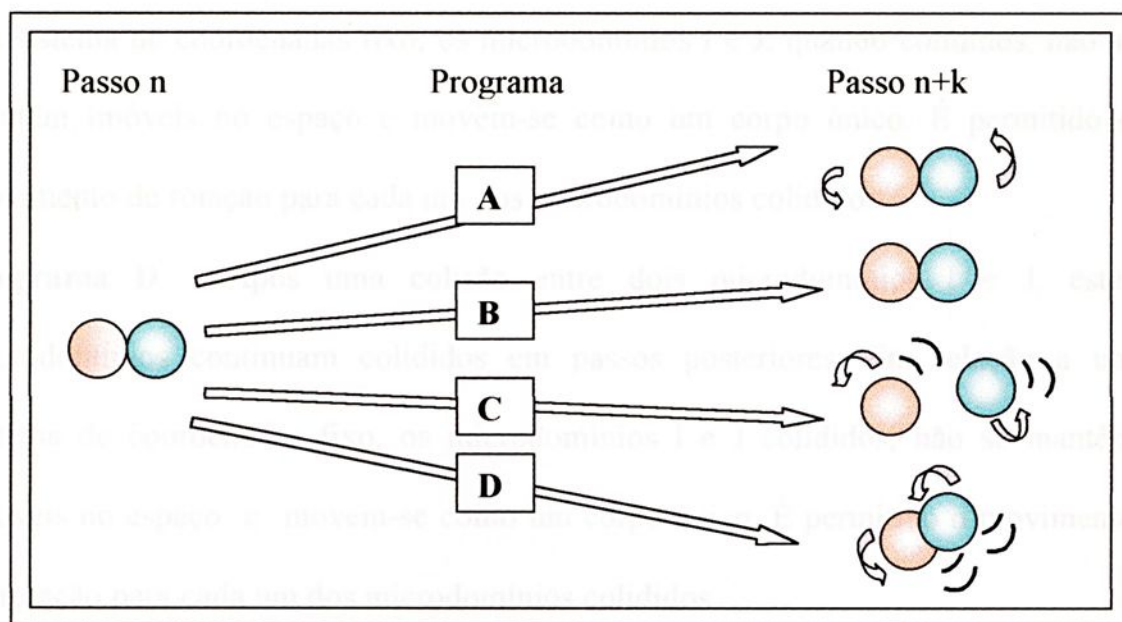


Figura 9 - Esquema ilustrativo dos quatro programas A, B, C, D. A diferença básica consiste no procedimento a ser utilizado, após uma colisão entre dois microdomínios. Esta colisão também pode ocorrer entre um microdomínio e um agregado maior, o qual possui dois ou mais microdomínios colididos. ($k \geq 1$)

Programa A – Após uma colisão entre dois microdomínios I e J, estes microdomínios continuam colididos em passos posteriores. Em relação a um sistema de coordenadas fixo, os microdomínios I e J colididos mantêm-se imóveis no espaço. É permitido o movimento de rotação para cada um dos microdomínios colididos.

Programa B – Após uma colisão entre dois microdomínios I e J, estes microdomínios continuam colididos em passos posteriores. Em relação a um sistema de coordenadas fixo, os microdomínios I e J colididos mantêm-se imóveis no espaço. Não é permitido o movimento de rotação para nenhum dos microdomínios colididos.

Programa C – Após uma colisão entre dois microdomínios I e J, estes microdomínios podem não continuar colididos em passos posteriores. Em relação a um sistema de coordenadas fixo, os microdomínios I e J, quando colididos, não se mantêm imóveis no espaço e movem-se como um corpo único. É permitido o movimento de rotação para cada um dos microdomínios colididos.

Programa D – Após uma colisão entre dois microdomínios I e J, estes microdomínios continuam colididos em passos posteriores. Em relação a um sistema de coordenadas fixo, os microdomínios I e J colididos, não se mantêm imóveis no espaço e movem-se como um corpo único. É permitido o movimento de rotação para cada um dos microdomínios colididos.

Os possíveis contatos entre os quatro microdomínios, estão ilustrados no apêndice B.3.



IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Introdução

Parte-se de uma configuração inicial dos microdomínios, sob ação da interação eletrostática e da força resistiva. Através da simulação computacional, as novas configurações sucessivas dos microdomínios são geradas, para intervalos de tempo $10^{-2} \mu\text{s}$. A configuração do microdomínio é avaliada, podendo ser aceita ou recusada. Se a nova configuração gerada não está dentro das restrições das distâncias mínimas e máximas, entre pares de microdomínios, ela é descartada e em seu lugar é utilizada a última configuração aceita. A distância máxima de afastamento está limitada pelo comprimento do laço entre os microdomínios. A distância mínima de aproximação está limitada pelo raio de corte R_2 . Esta distância mínima pode permitir a ação da interação hidrofóbica, para a fase jogo-final, com o rearranjo e empacotamento final das cadeias laterais para a estrutura nativa.

4.2 Apresentação dos resultados

A configuração inicial, no começo de cada dinâmica, e as configurações obtidas em cada colisão, representam os vários passos de aproximação e/ou afastamento dos microdomínios. Observa-se, nos quatro procedimentos, o comportamento mostrado pelos microdomínios. Os procedimentos A e B foram os primeiros a serem construídos, sendo um esboço inicial do projeto proposto. Posteriormente pensou-se nos procedimentos C e D. O procedimento C procura



avaliar a idéia de cooperatividade no enovelamento. O procedimento D é aquele que abrange a idéia proposta neste projeto.

As propriedades dos microdomínios estão descritas na tabela 4.1. e na tabela 4.2. As distâncias máximas e mínimas permitidas estão na tabela 4.3. Os ângulos entre pares de dipolos elétricos e a distância entre os centros de massa de pares de hélices, na configuração nativa, estão na tabela 4.4 e 4.5 respectivamente. As figuras 11, 14, 18 e 21 são gráficos que representam as distâncias entre os centros de massa. As figuras 12, 15, 19 e 22 são gráficos que representam os ângulos entre os vetores dipolo elétrico, sendo estes vetores calculados para cada microdomínio. Após a apresentação dos resultados dos quatro procedimentos, discutem-se os resultados.

TABELA 4.1 Propriedades dos microdomínios.

MICRODOMÍNIOS	RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS	MASSA (uma)	RAIO NO FLUÍDO ($\text{\AA}$)	RAIO NA INTERAÇÃO ($\text{\AA}$)
A	19-37	2329.69	12.13	15.46
B	41-64	2645.99	13.71	19.46
C	71-84	1747.16	9.65	12.62
D	93-113	2492.89	12.16	17.09

TABELA 4.2 Comprimento do laço entre dois microdomínios consecutivos.

PAR DE MICROD. CONSECUTIVOS	COMPRIMENTO DO LAÇO ($\text{\AA}$)
A B	10.50
B C	21.00
C D	28.00

TABELA 4.3 Distâncias permitidas entre os centros de massa de um par de microdomínios.

PAR DE MICROD.	DISTÂNCIA MÍN. (Å)	DISTÂNCIA MÁX. (Å)
A B	34.92	45.42
A C	28.07	98.50
A D	32.55	156.21
B C	32.08	53.08
B D	36.55	110.79
C D	29.51	57.71

TABELA 4.4 Ângulos entre pares de vetores dipolo elétricos na proteína hemeritrina.

PAR DE HÉLICES.	ÂNGULO
AB	163.90
AC	17.09
AD	159.84
BC	149.28
BD	28.14
CD	168.91

TABELA 4.5 - Distância nativa entre centros de massa das hélices da proteína hemeritrina.

PAR DE HÉLICES	DISTÂNCIA (Å)
AB	10.575
AC	17.595
AD	12.333
BC	10.709
BD	13.900
CD	11.339

Dinâmica do programa A. Os microdomínios giram entre si após uma colisão. Quando colididos mantêm-se fixos no espaço. **SP = 2.0 Å.**

TABELA 4.6 Distância entre pares de microdomínios durante a dinâmica.

PAR DE MICRODOMÍNIOS	DISTÂNCIA DE COLISÃO (Å)	DISTÂNCIA (Å)	DISTÂNCIA (Å)	DISTÂNCIA (Å)
A B	34.92 - 36.92	39.42	40.28	34.92*
A C	28.07 – 30.07	51.69	54.83	51.87
A D	32.55 – 34.55	71.56	68.12	63.55
B C	32.08 – 34.08	38.96	40.91	45.56
B D	36.55 – 38.55	56.74	54.62	60.26
C D	29.51 – 31.51	37.78	29.51*	29.51

Tempo da dinâmica (μs):

00.3989.04

(*colisão)

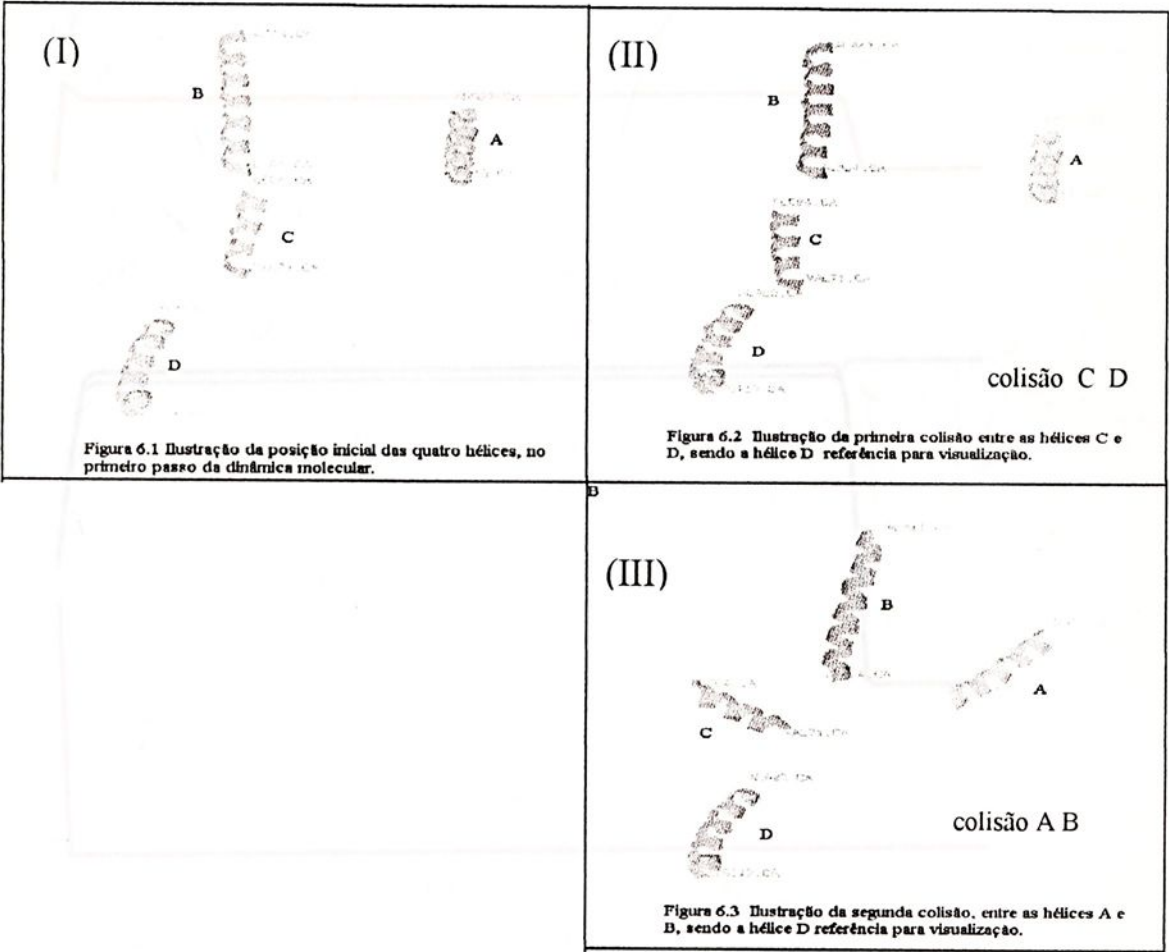


Figura 10 – Configurações resultantes da dinâmica do programa A. Configuração inicial do sistema (I). Configuração no passo 39 (II). Configuração no passo 8904 (III).

Figura 11 - Distâncias entre pares de microdomínios. Programa A.

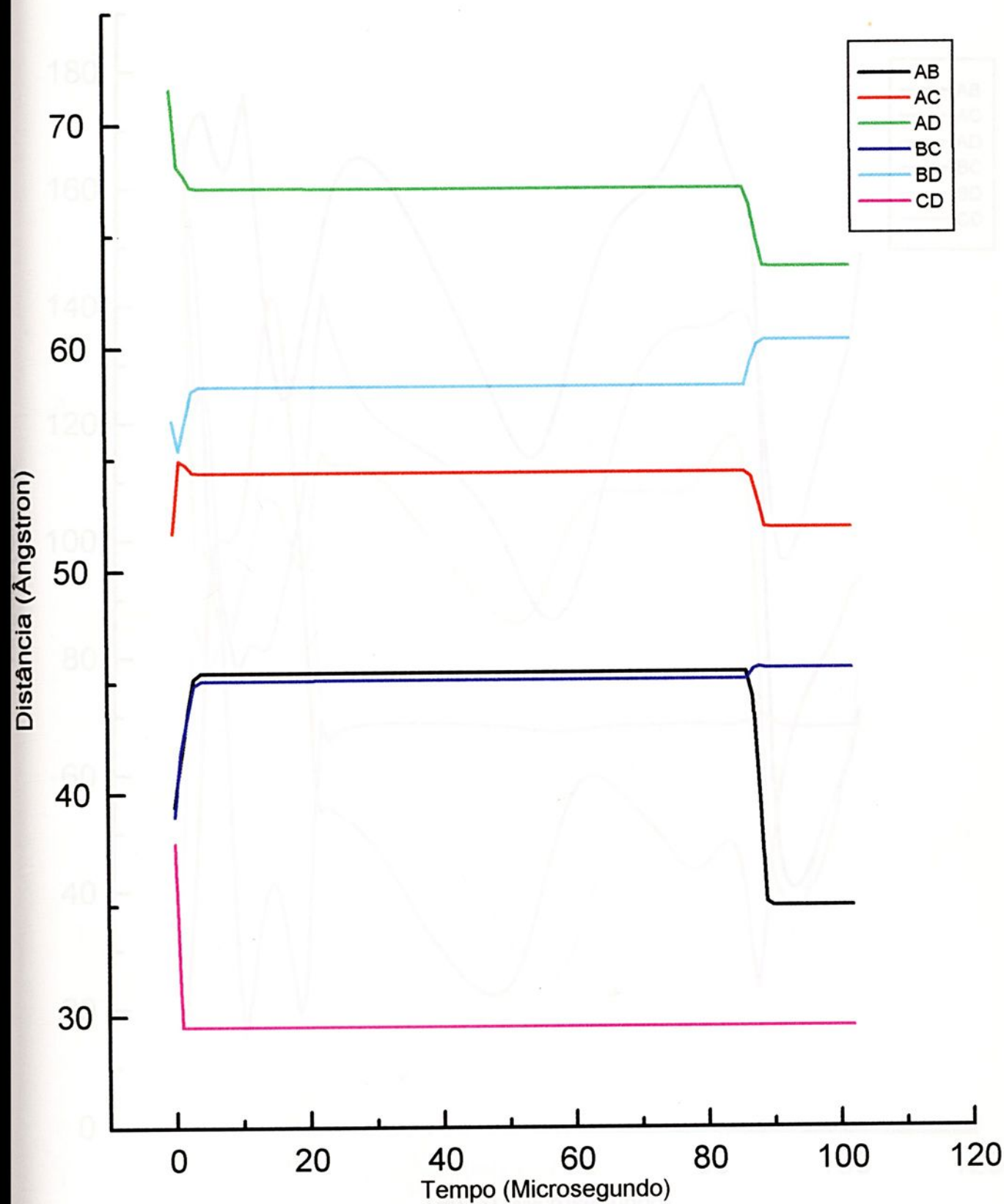


Figura 11 - Distâncias entre pares de microdomínios. Programa A.

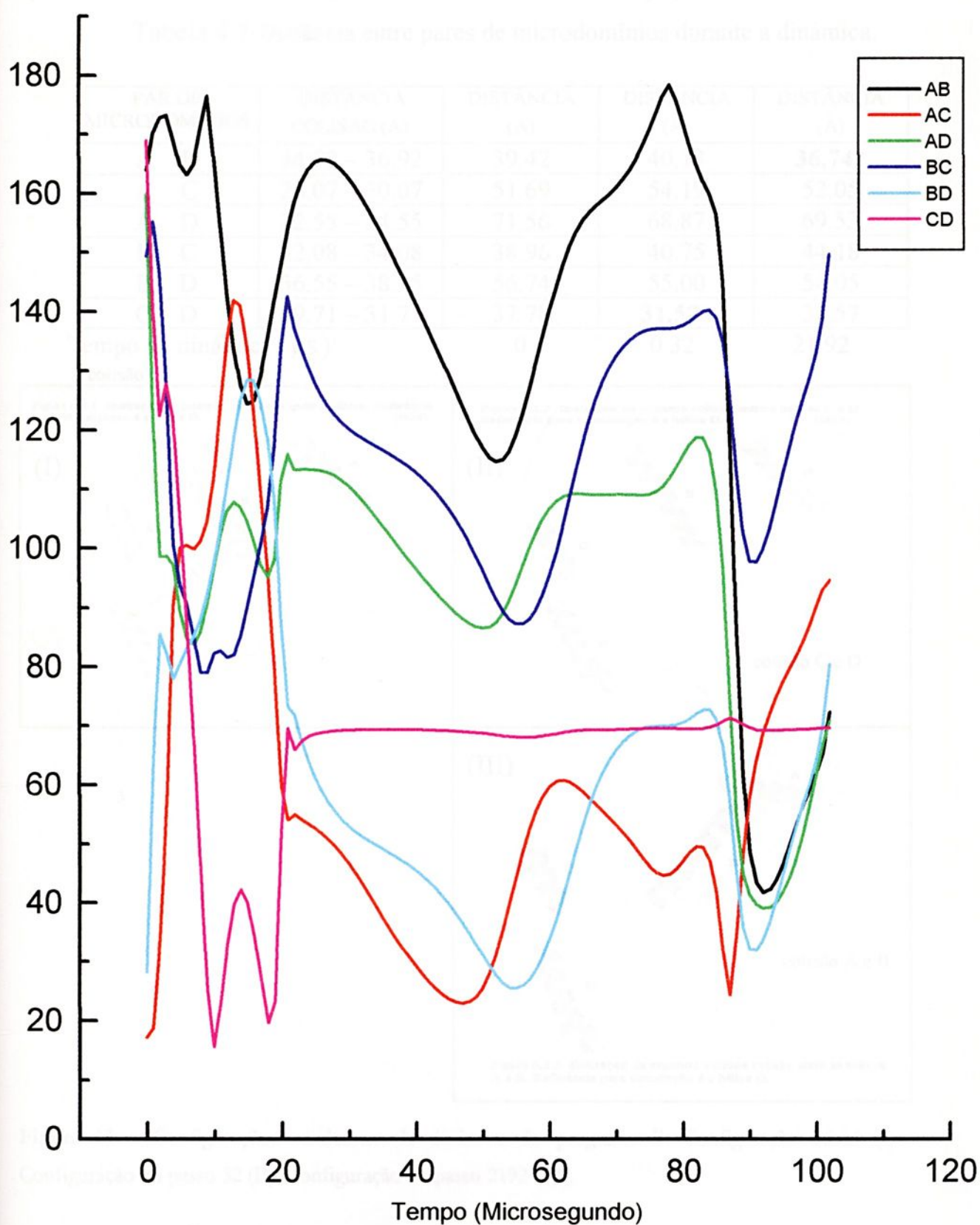


Figura 12 - Ângulos entre pares de vetores de dipolos elétricos. Programa A.

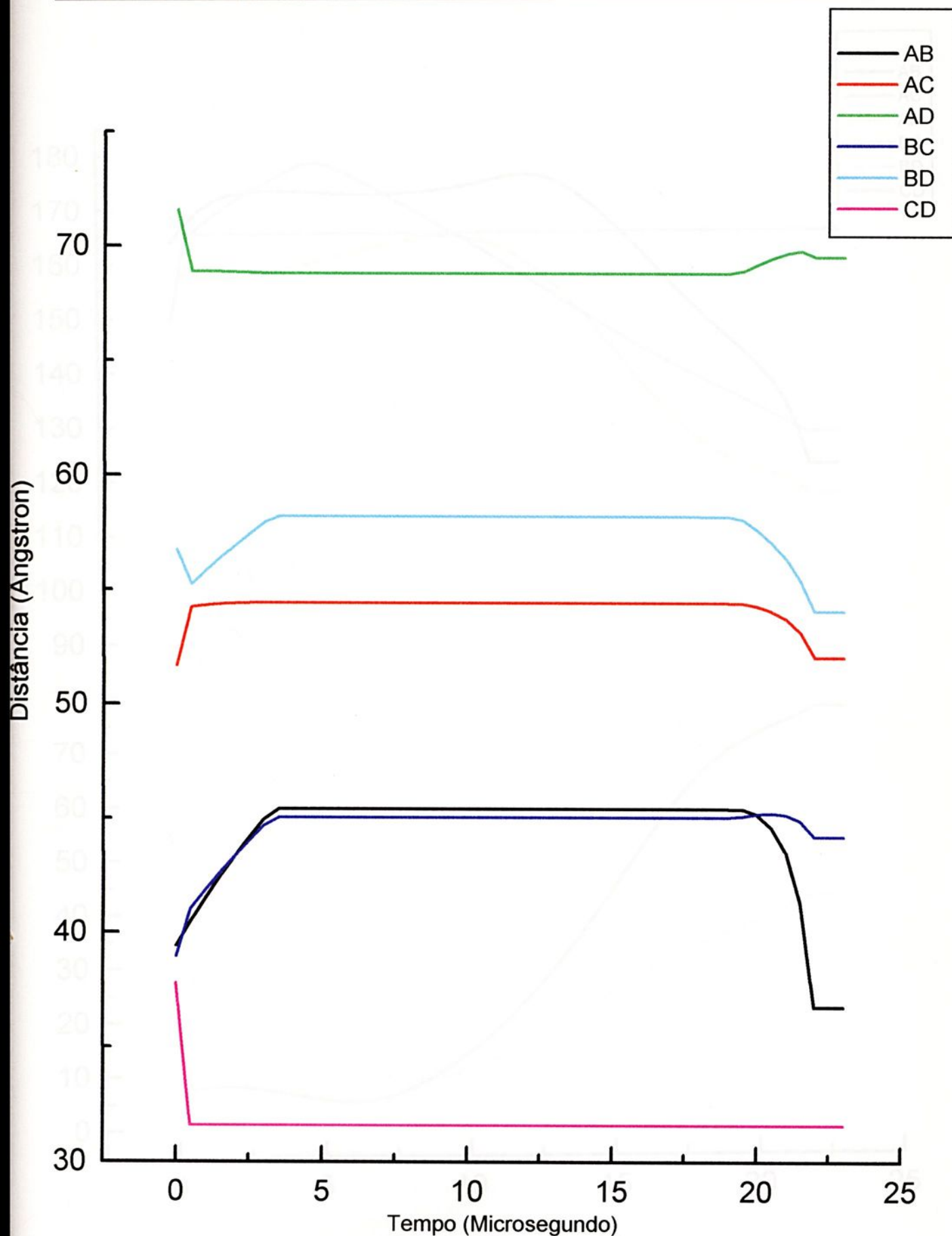


Figura 14 - Distâncias entre pares de microdomínios. Programa B.

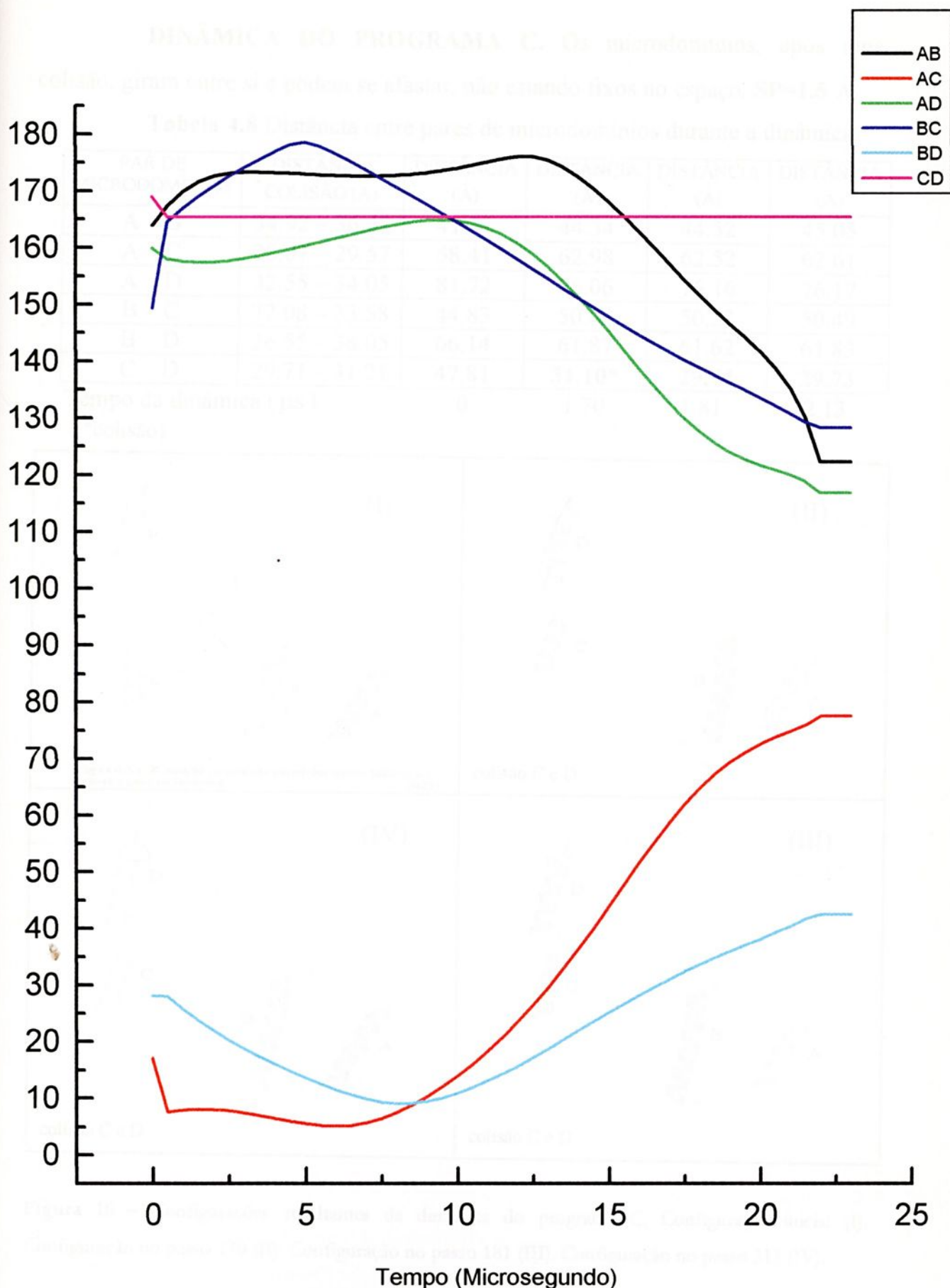


Figura 15 - Ângulos entre pares de vetores dipolos elétricos. Programa B.

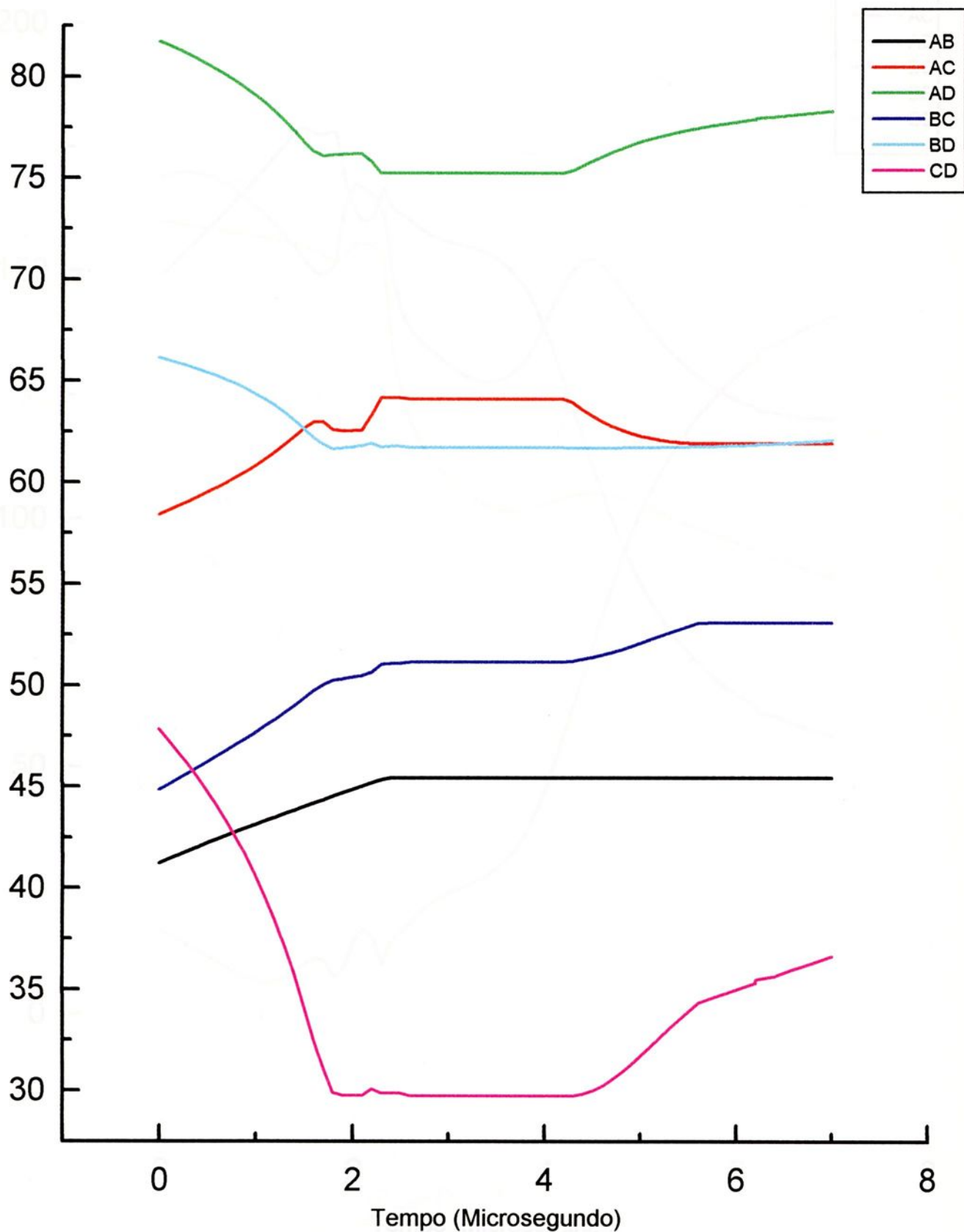


Figura 18 - Distâncias entre pares de microdomínios. Programa C.

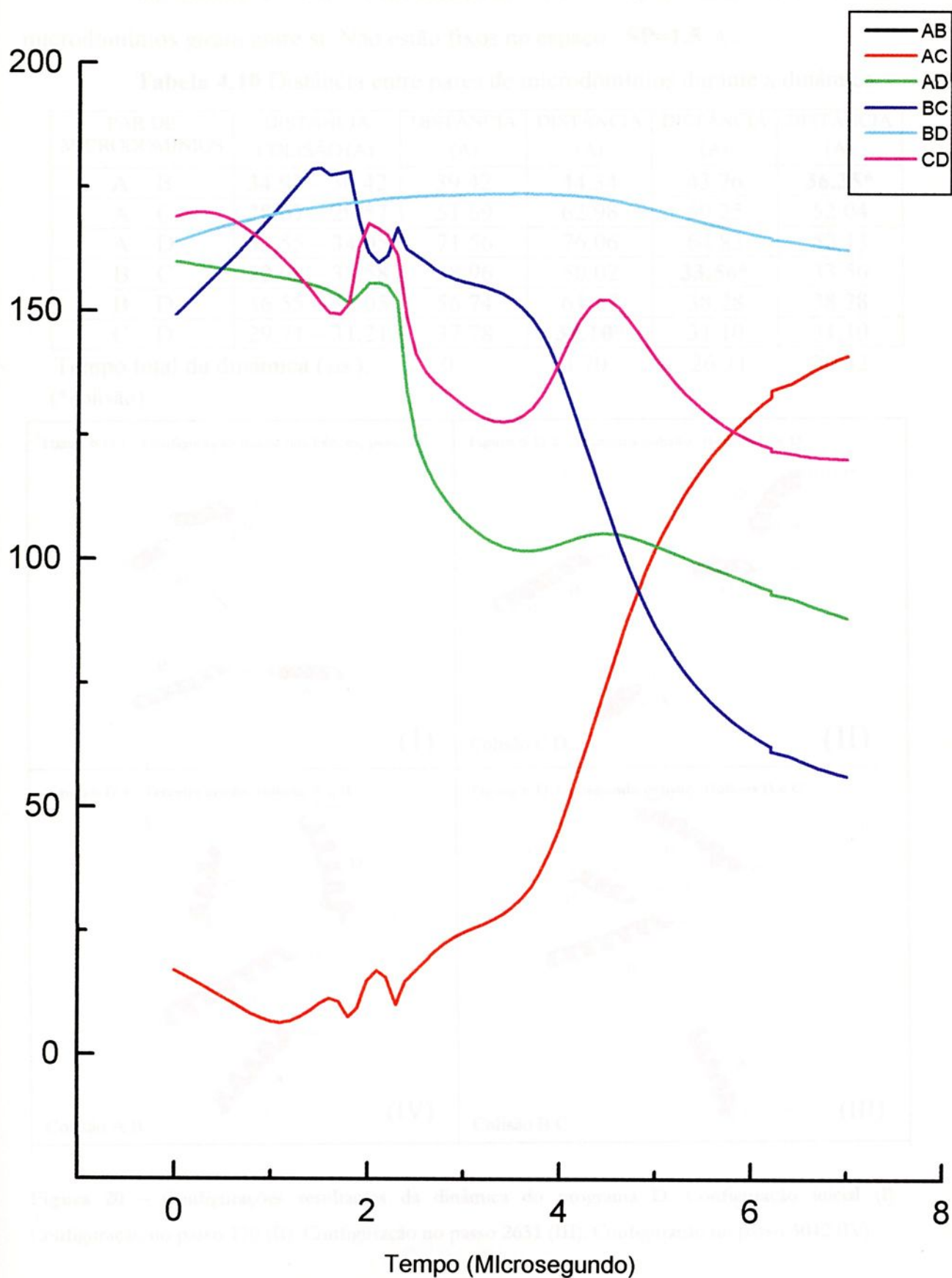


Figura 19 - Ângulos entre pares de vetores de dipolos elétrico. Programa C.

DINÂMICA DO PROGRAMA D. Após uma colisão os microdomínios giram entre si. Não estão fixos no espaço. $SP=1.5 \text{ \AA}$.

Tabela 4.10 Distância entre pares de microdomínios durante a dinâmica.

PAR DE MICRODOMÍNIOS	DISTÂNCIA COLISÃO (Å)	DISTÂNCIA (Å)	DISTÂNCIA (Å)	DISTÂNCIA (Å)	DISTÂNCIA (Å)
A B	34.92 – 36.42	39.42	44.34	43.26	36.35*
A C	28.07 – 29.57	51.69	62.98	59.25	52.04
A D	32.55 – 34.05	71.56	76.06	64.83	52.13
B C	32.08 – 33.58	38.96	50.02	33.56*	33.56
B D	36.55 – 38.05	56.74	61.87	38.28	38.28
C D	29.71 – 31.21	37.78	31.10*	31.10	31.10

Tempo total da dinâmica (μs): 0 1.70 26.31 30.42

(*colisão)

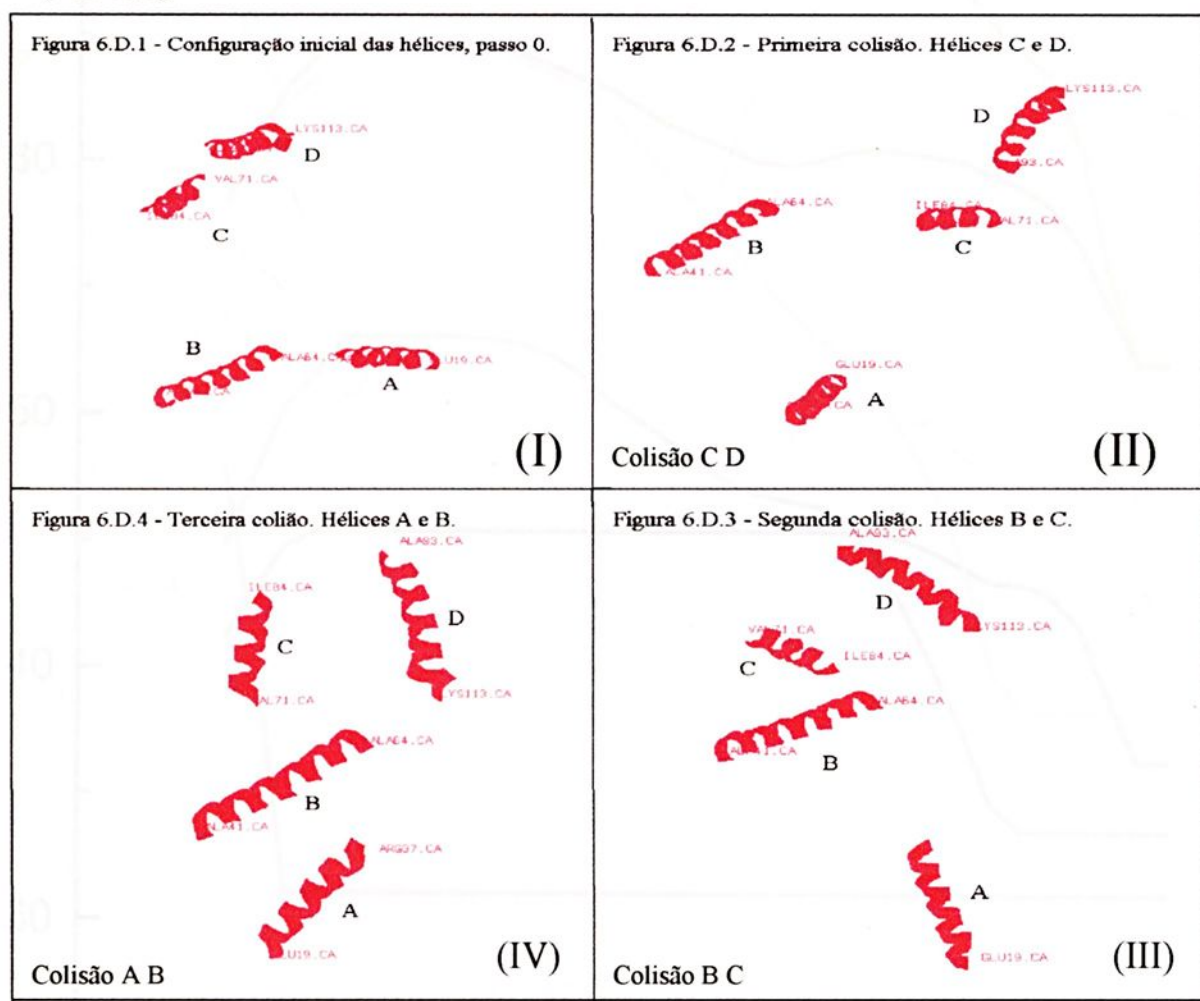


Figura 20 – Configurações resultantes da dinâmica do programa D. Configuração inicial (I). Configuração no passo 170 (II). Configuração no passo 2631 (III). Configuração no passo 3042 (IV).

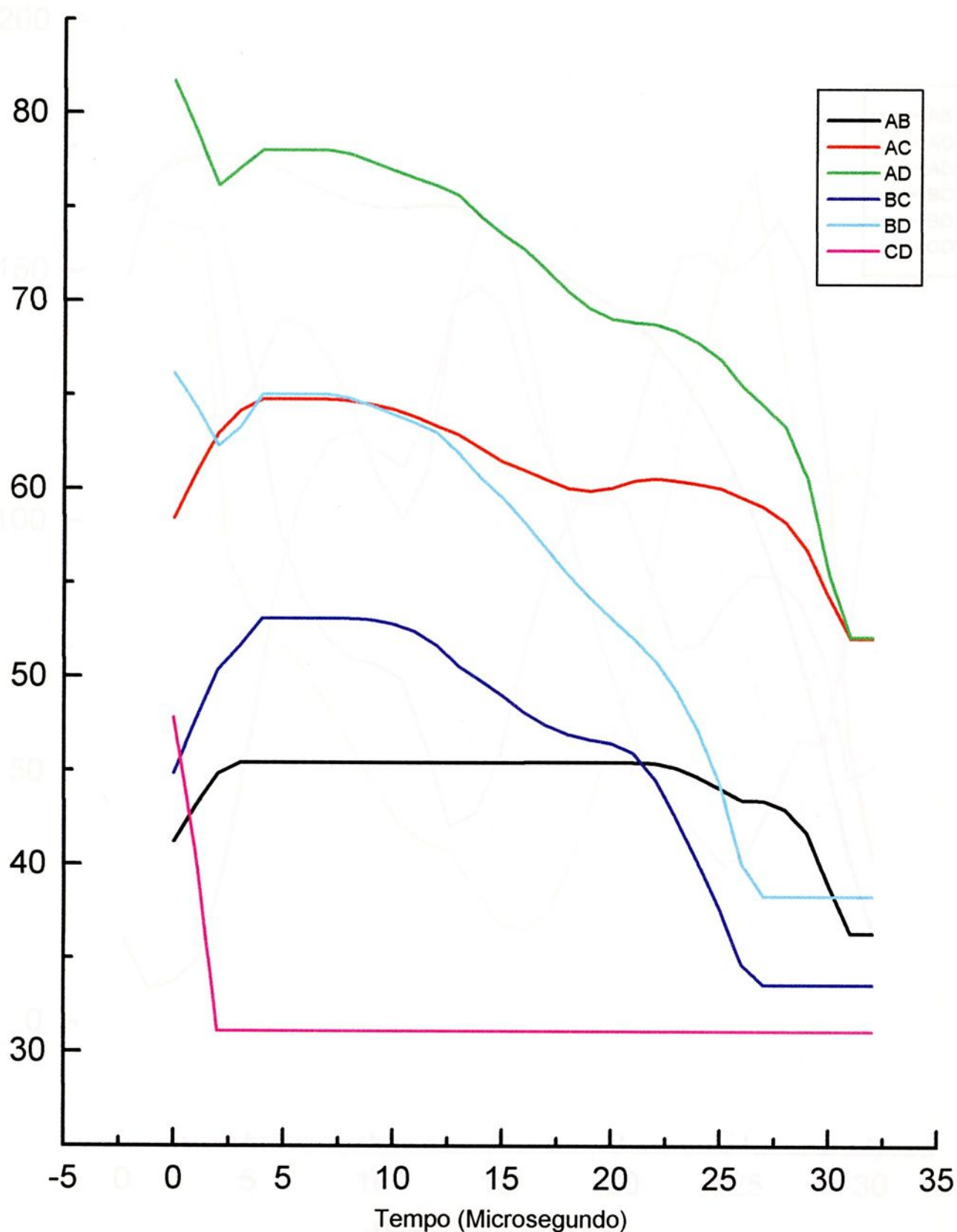


Figura 21 - Distâncias entre pares de microdomínios. Programa D.

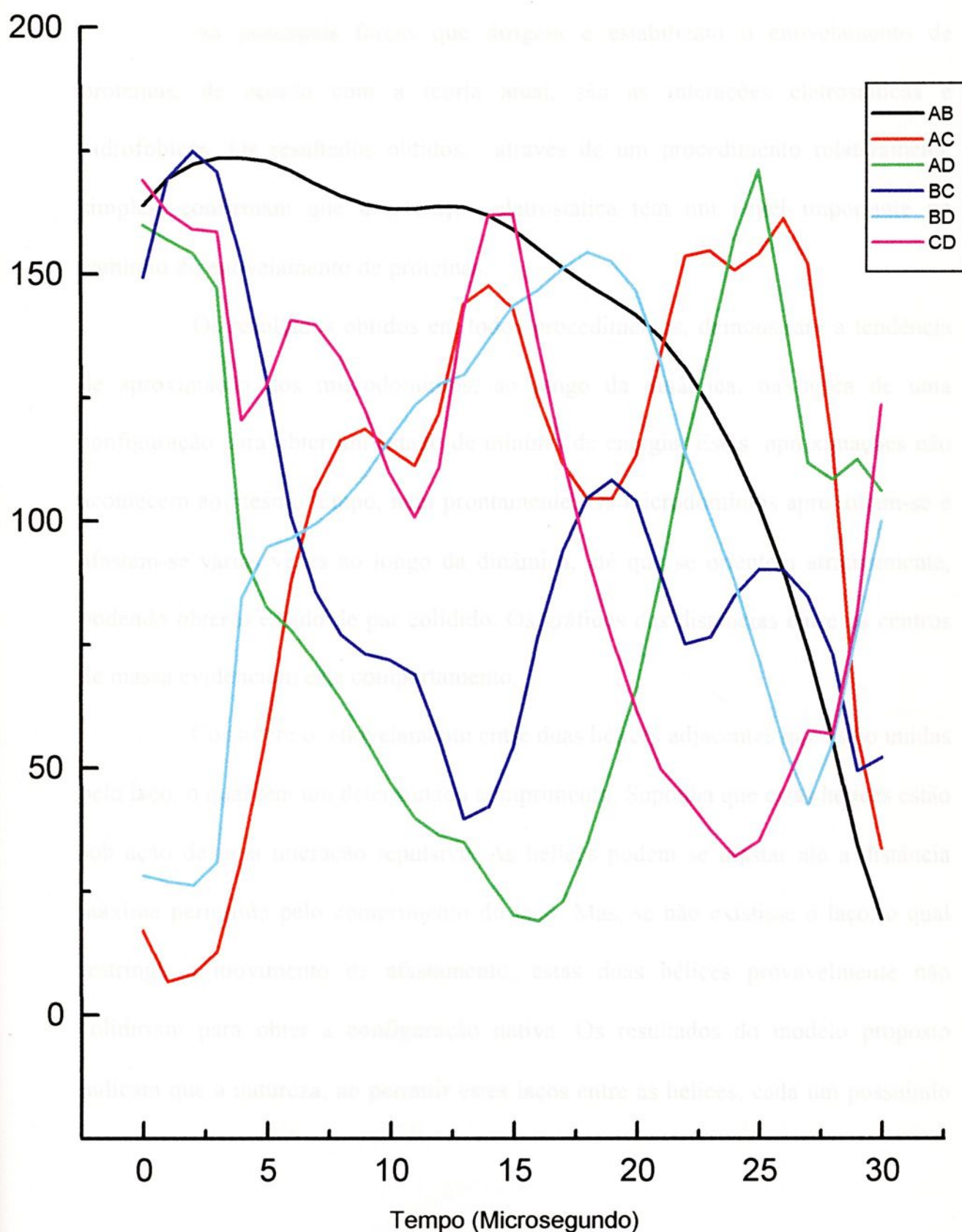


Figura 22 - Ângulos entre pares de vetores de dipolos elétricos. Programa D.

4.3 Discussão

As principais forças que dirigem e estabilizam o enovelamento de proteínas, de acordo com a teoria atual, são as interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Os resultados obtidos, através de um procedimento relativamente simples, confirmam que a interação eletrostática tem um papel importante no caminho do enovelamento de proteínas.

Os resultados obtidos em todos procedimentos, demonstram a tendência de aproximação dos microdomínios, ao longo da dinâmica, na busca de uma configuração para obter um estado de mínimo de energia. Estas aproximações não acontecem ao mesmo tempo, nem prontamente. Os microdomínios aproximam-se e afastam-se várias vezes ao longo da dinâmica, até que se orientem atrativamente, podendo obter o estado de par colidido. Os gráficos das distâncias entre os centros de massa evidenciam este comportamento.

Considere o enovelamento entre duas hélices adjacentes que estão unidas pelo laço, o qual tem um determinado comprimento. Suponha que estas hélices estão sob ação de uma interação repulsiva. As hélices podem se afastar até a distância máxima permitida pelo comprimento do laço. Mas, se não existisse o laço, o qual restringe o movimento de afastamento, estas duas hélices provavelmente não colidiriam para obter a configuração nativa. Os resultados do modelo proposto indicam que a natureza, ao permitir estes laços entre as hélices, cada um possuindo

um determinado comprimento, o fez de modo que a proteína, ao se enovelar, obtivesse uma configuração nativa estável e biologicamente ativa.

Uma questão a ser colocada é avaliar, para as configurações finais obtidas, se esta busca é para um mínimo global ou local. Exceto no procedimento C, cada colisão leva a um estado de par colidido. Este estado não é devido a interações estabilizantes entre os microdomínios, mas simplesmente, estes são forçados a continuarem colididos. Interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre outras, não são levadas em conta. Desse modo, é difícil estimar a estabilidade da configuração de par colidido, ou mesmo da configuração final obtida.

O procedimento C indica a importância da cooperatividade no enovelamento. Este procedimento sugere que é necessário que dois microdomínios colidam e continuem colididos, para que os demais tenham um comportamento de aproximação. Se dois microdomínios se aproximam, colidem, mas não permanecem colididos, podendo se afastar em passos posteriores, então os demais não assumem um comportamento de aproximação que resulte em colisão.

O modelo *jigsaw-puzzle* (Harrison, S. C. & Durbin, R., 1985), sugere que as proteínas globulares podem enovelar-se por um grande número de caminhos diferentes, ou seja, por caminhos paralelos, ao invés de uma única sequência determinada de eventos. De modo semelhante, o modelo difusão-colisão (Karplus & Weaver, 1979) também sugere múltiplos caminhos para o enovelamento. Nos quatro programas testados, partindo-se de diferentes configurações iniciais, pode-se obter diferentes sequências de pares colididos. Isto é o esperado. A interação coulombiana

atua com o inverso do quadrado da distância. Dois microdomínios próximos, sob uma interação atrativa, podem adquirir o estado de par colidido mais rapidamente que os demais. Mas, sob uma interação repulsiva, estes dois microdomínios tenderão a se afastar mais rapidamente.

Estudos de reenovelamento em proteínas globulares, indicam que o equilíbrio entre o estado intermediário forma colapsada e a estrutura nativa, é próximo de 1 segundo (Kuwagima, 1989). Os tempos obtidos do modelo proposto, para encontrar a configuração final a partir da forma colapsada, estão dentro da faixa de tempo destes resultados experimentais.

Pela tabela 4.7 e pela figura 14 da dinâmica do programa B, o par de microdomínios CD colide em $0.32\mu s$ e mantém-se colidido. As curvas dos gráficos para os pares AC e BC representam as variações dos ângulos dos vetores dipolos A e B, respectivamente, em relação ao vetor dipolo fixo C. Do mesmo modo que as curvas dos pares de microdomínios AD e BD, em relação ao vetor dipolo fixo D.

Comparando os ângulos entre pares de vetores dipolos elétricos, nas várias configurações finais obtidas, com a configuração nativa da hemeritina (Tabela 4.4), não se observa similaridades. Deve ser lembrado que o vínculo do laço entre hélices foi simplificado à distância entre centros de massa, a imposição do raio de corte R_2 e a não implementação de interações hidrofóbicas, são restrições que não permitem efetuar uma comparação adequada, entre as configurações finais obtidas e a configuração nativa.

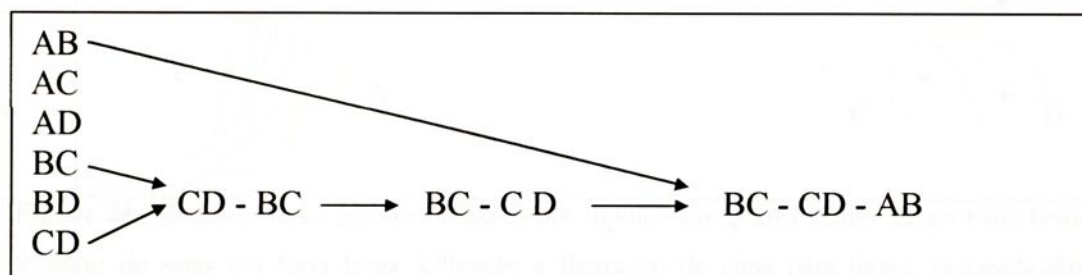


Figura 23 – Ilustração da sequência de pares de microdomínios, obtidos através da dinâmica do programa D.

As áreas acessíveis ao solvente perdidas entre pares de hélices, da proteína hemeritina, estão na tabela 4.11 (Yapa, K. K. & Weaver, D. L., 1992).

Tabela 4.11 - Área de contato perdida entre pares de hélices da proteína hemeritina.

Observa-se que o par AC possui área de contato perdida desprezível.

PAR DE HÉLICES	ÁREA DE CONTATO PERDIDA ($\text{\AA}^2$)
AB	325
BC	296
CD	250
AD	241
BD	97
AC	2

Dentre as várias configurações iniciais testadas, até o momento, observou-se que os pares de microdomínios resultantes da dinâmica, são aqueles que possuem maior área de contato nativo, ou seja, maior área de contato perdido em relação ao solvente, quando comparado com a estrutura nativa. Um provável indício deste comportamento pode ser explicado, observando nas hélices a orientação dos vetores dipolos elétricos (Figura 24).

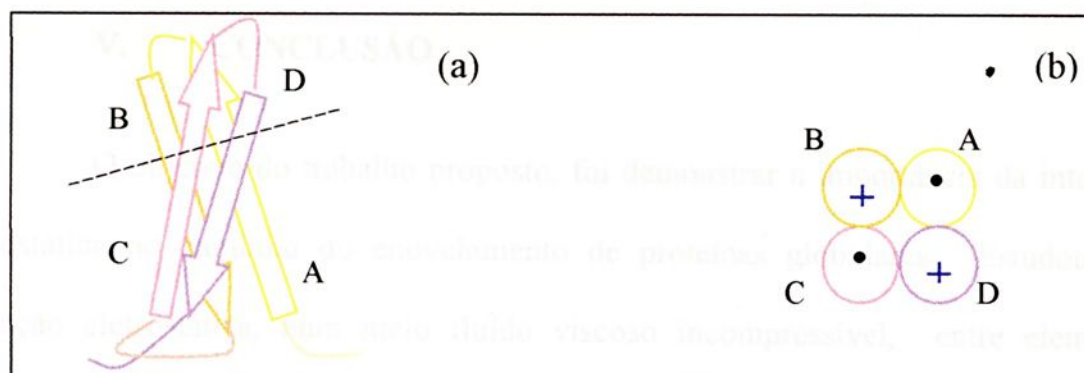


Figura 24 - Representação (a) da orientação dos dipolos das quatro hélices da proteína hemeritina no formato de setas em faixa larga. Olhando a figura (a) de cima para baixo, perpendicular ao corte tracejado, têm-se a representação (b) dos vetores dipolos elétricos entrando e saindo.

Os vetores dipolos elétricos dos pares AD, AB, BC, CD estão em sentidos opostos, ocorrendo portanto uma interação atrativa entre o par. Os vetores dipolos elétricos dos pares AC e BD estão no mesmo sentido, ocorrendo uma interação repulsiva entre o par. As maiores áreas de contato acessíveis ao solvente perdidas (Tabela 4.11), ocorrem entre os pares de hélices que estão sob uma interação atrativa, e as menores ocorrem entre os pares que estão sob uma interação repulsiva. Entretanto, as áreas de contato perdidas são usualmente relacionadas à hidrofobicidade e não a dipolos elétricos. A relação sugerida acima, deve ser investigada com mais rigor, após uma boa bateria de testes, para averiguar a validade deste comportamento entre pares de microdomínios colididos do modelo.

A distribuição de cargas nos microdomínios, fornecida pelos valores atribuídos aos sítios, são importantes para a determinação em cada microdomínio do vetor dipolo elétrico. Para a finalidade deste trabalho, escolheu-se o parâmetro de cargas do Gromos, o único testado.

V. CONCLUSÃO

O objetivo do trabalho proposto, foi demonstrar a importância da interação eletrostática no caminho do enovelamento de proteínas globulares. Estudou-se a interação eletrostática, num meio fluido viscoso incompressível, entre elementos estruturais secundários já formados e antes de se completar a formação da estrutura terciária. Para esta finalidade foi criado um mecanismo que faz uso de simplificações usuais em modelagens de dinâmicas de enovelamento. Simulações computacionais do sistema molécula-rígida/meio-contínuo forneceram configurações, as quais podem ser comparadas com a inicial e as subseqüentes nos vários passos de colisão, evidenciando a tendência para a aproximação dos microdomínios.

Baseado nos bons resultados obtidos com estes procedimentos em concordância com dados experimentais, concluimos que o modelo proposto para abordar o valor da interação eletrostática é uma contribuição significativa para o estudo do enovelamento de proteínas.

Um interessante trabalho, seria a comparação da dinâmica molecular num meio contínuo, com os resultados obtidos da dinâmica de um modelo discreto de solvente, resguardadas as limitações computacionais. Outro trabalho futuro interessante, seria tratar as hélices como elipsóides e considerar os laços entre os elipsóides. Estes laços, representados por cordões flexíveis, não seriam uma restrição de distância entre os centros de massa, como no trabalho proposto. Um cordão ligaria o final de um elipsóide, ao início do próximo elipsóide adjacente. Um modelo mais próximo da representação dos laços entre hélices.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANFISEN, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, v. 181, p. 223-230, 1973.
- ATKINS, P. W. *Physical Chemistry*. Oxford University Press. 1031 p., 1994.
- CHOTHIA, C. & FINKELSTEIN, A. V. The classification and origins of protein folding patterns. *Annu. Ver. Biochem.*, v. 59, p. 1007-39, 1990.
- CHRUNYK, B. A. & MATTHEWS, C. R. Role of diffusion in the folding of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* v. 29, p. 2149-2154, 1990.
- CREIGHTON, T. E. Experimental studies of protein folding and unfolding. *Prog. Biophys. Molec.*, v. 33, p. 231-297, 1978.
- DYSON, H. J., MERUKTA, G., WALTHO, J. P., LERNER, R. A. & WRIGHT, P. E. Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. models for initiation of protein folding I. Myohemerythrin. *J. Mol. Biol.* v. 226, p. 795-817, 1992a.
- DYSON, H. J., SAYRE, J. R., MERUTKA, G., SHIN, H., LERNER, R. A. & WRIGHT, P. E. Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. models for initiation of protein folding I. Plastocyanin. *J. Mol. Biol.* v. 226, p. 819-835, 1992b.



- EATON W. A., THOMPSON, P. A., CHAN, C. K., HAGEN, S. J. & HOFRICHTER, J. Fast events in protein folding. *Structure*, v. 4, p. 1133-1139, 1996.
- HAAS, E., KATCHALSKI-KATZIR, E. & STERNBERG, I. Z. Brownian motion of the ends of oligopeptide chains in solution as estimated by energy transfer between the chain ends. *Biopolymers* v. 17, p. 11-31, 1978.
- HARRISON, S. C. & DURBIN, R. Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 82, p.4028-4030, 1985.
- HURLE, M. H., MICHELOTTI, G. A., CRISANTI, M. M. & MATTHEWS, C. R. Characterization of a slow folding reaction for the alpha subunit of tryptophan synthase. *Proteins Struct. Funct. Genet.* v. 2, p. 54-63, 1987.
- ISRAELACHVILLI, J. N. Intermolecular and surface forces. *Academic Press*. p.27-120, 1985.
- KARPLUS, M. & WEAVER, D.L. Protein folding dynamics. *Nature*, v. 260, p. 404-406, 1976.
- KARPLUS, M. & WEAVER, D.L. Diffusion-Collision Model for protein folding. *Biopolymers*. v. 18, p.1421-1437, 1979.
- KUWAGIMA, K. The molten globule state as a clue for understanding then folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins: Struc. Funct. Genet.* v.6, p.87-103, 1989



- KUWAJIMA, K., HIRAOKA, Y., IKEGUSHI, M. & SUGAI, S. comparison of the transient folding intermediates of lysozyme and alpha-lactalbumin. *Biochemistry* v. 24, p. 874-881, 1985.
- KUWAJIMA, K., YAMAYA, H., MIWA, S., SUGAI, S. & NAGAMURA, T. Rapid formation of secondary structure framework in protein folding studied by stopped-flow circular dichroism. *FEBS Lett.* v. 221, p. 115-118, 1987.
- LABHARDT, A. M. Kinetic circular dichroism shows that the S-peptide alpha-helix of ribonuclease S unfolds fast and refolds slowly. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* v. 81, p. 7674-7678, 1984.
- LANDAU, L. & LIFCHITZ, E. *Mécanique des Fluides. Éditions MIR.* v. VI, p. 1-103, 1971.
- LEVINTHAL, C. *J.Chim. Phys.* v. 65, p.44-45, 1968.
- LEVIT, M., GERSTEIN, M., HUANG, E., SUBBIAH, S. & TSAI, J. Protein folding: The Endgame. *Annu. Rev. Biochem.* v. 66, p. 549-579, 1997.
- MCCOY, L. F., ROWE, E. S. & WONG, K. P. Multiparameter kinetic study on the unfolding and refolding of bovine carbinic anhydrase B. *Bochemistry* v.19, p. 4738-4743, 1980.
- OHGUSHI, M. & WADA, A. *FEBS. Lett.* v.164, p.21-24, 1983.
- SHWARZ, G. Helix formation with only a single nucleation site. *J. Molec. Biol.* v. 11, p. 64-77e., 1965.



- TSONG, T. Y. Viscosity-dependent conformational relaxation of ribonuclease A in the thermal unfolding zone. *Biochemistry* v. 21, p. 1493-1498, 1982.
- VAN GUNSTEREN, W. F. & BERENDSEN, H. J. C. *Gromos manual*. 1983.
- VOET, D. & VOET, J. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. 1361 p., 1995.
- YAPA, K. K. & WEAVER, D. L. Folding kinetics of designer proteins. *Biophys. J.* v. 63, p. 296-299, 1992.

APÊNDICES

A.1 Número de Reynolds

A equação que descreve o movimento estacionário de um fluido viscoso incompressível é a equação de Navier-Stokes:

$$(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \frac{\eta}{\rho} \nabla^2 \vec{v} \quad (1)$$

Dentre os parâmetros que caracterizam o fluido, só aparecem na equação de Navier-Stokes, ν a viscosidade cinemática, η a viscosidade dinâmica e ρ a densidade do fluido, relacionados por $\nu = \frac{\eta}{\rho}$, e as funções que devem ser determinadas para resolver-se as equações, a velocidade do fluido $\vec{v}$ e a relação entre a pressão p e a constante ρ : $\frac{p}{\rho}$.

O escoamento também depende da forma, dimensão e velocidade do corpo. Para uma esfera sólida, as dimensões geométricas serão determinadas por uma só dimensão linear:

$\vec{u}$ = velocidade do corpo,

ℓ = dimensão linear (raio).

Assim, cada tipo de movimento é determinado por três parâmetros:



$$[v] = \text{cm}^2/\text{s}$$

$$[\ell] = \text{cm}$$

$$[u] = \text{cm}/\text{s}$$

Tomando-se todas as combinações formadas pelas três grandezas acima, a única combinação linear sem dimensões que se pode obter é:

$$\frac{u \ell}{\nu} = \frac{\rho u \ell}{\eta} = \Re \quad (2)$$

Esta combinação é chamada número de Reynolds.

Desenvolvendo-se o termo $(\vec{v} \nabla) \vec{v}$ da equação (1) obtém-se um fator não linear que dificulta a resolução da equação hidrodinâmica:

$$\text{grad}(\vec{v} \circ \vec{v}) = \vec{v} \times \text{rot} \vec{v} + \vec{v} \times \text{rot} \vec{v} + (\vec{v} \circ \nabla) \vec{v} + (\vec{v} \circ \nabla) \vec{v} \Rightarrow \quad (3)$$

$$\Rightarrow \text{grad}(v^2) = 2 \vec{v} \times \text{rot} \vec{v} + 2 (\vec{v} \nabla) \vec{v} \Rightarrow \quad (4)$$

$$\Rightarrow (\vec{v} \nabla) \vec{v} = \frac{1}{2} \text{grad}(v^2) - \vec{v} \times \text{rot} \vec{v} \quad (5)$$

As ordens de grandeza do primeiro e último termo da equação (1) são:

$$(\vec{v} \nabla) \vec{v} \sim \frac{u^2}{\ell} \quad (6)$$

$$\frac{\eta}{\rho} \nabla^2 \vec{v} \sim \frac{\eta u}{\rho \ell^2} \quad (7)$$

Tomando-se a razão da primeira quantidade pela segunda, obtém-se precisamente o número de Reynolds,

$$\frac{u^2 / \ell}{\eta u / \rho \ell^2} = \frac{u \ell \rho}{\eta} = \frac{u \ell}{\nu} = \Re \quad (8)$$

Assim, para um número de Reynolds ($\Re$) bem pequeno pode-se abstrair o termo $(\vec{v} \nabla) \vec{v}$ da equação de Navier-Stokes:

$$\eta \nabla^2 \vec{v} = \nabla p \quad (9)$$

A.2 Força resistiva

Uma esfera em movimento retilíneo uniforme com velocidade $\vec{u}$ em um fluido viscoso (Figura A.2.1) é equivalente ao movimento estacionário do fluido viscoso em torno de uma esfera imóvel (Figura A.2.2), a qual no infinito tem uma velocidade dada, $\vec{v} = \vec{u}$.

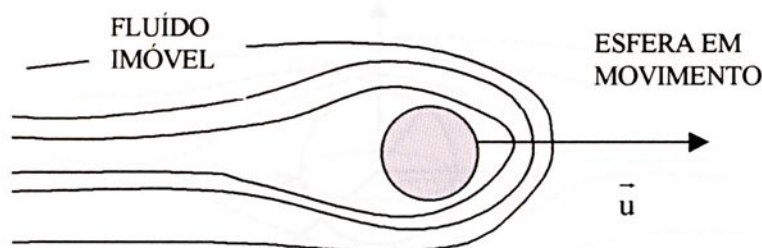


Figura A.2.1 Esfera em movimento retilíneo uniforme, com uma velocidade dada, $\vec{u} = \vec{u}(t)$, num fluido viscoso incompressível.

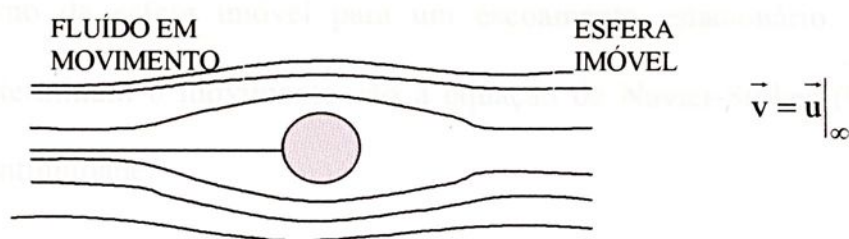


Figura A.2.2 – Movimento estacionário de um fluido viscoso incompressível, que tem no infinito uma velocidade dada, $\vec{v} = \vec{u}$, em torno de uma esfera imóvel.

A distribuição das velocidades do fluido para uma esfera movendo-se neste fluido, é equivalente ao escoamento estacionário do fluido em torno da esfera imóvel suprimindo a velocidade $\vec{u}$. O fluido estará imóvel no infinito e a esfera deslocando-se com velocidade $-\vec{u}$.

Equacionando-se para um movimento estacionário em torno de uma esfera imóvel, resolve-se o problema de uma esfera em movimento retilíneo uniforme num fluido viscoso incompressível. Toma-se como origem do sistema de coordenadas o centro de massa da esfera (Figura A.2.3).

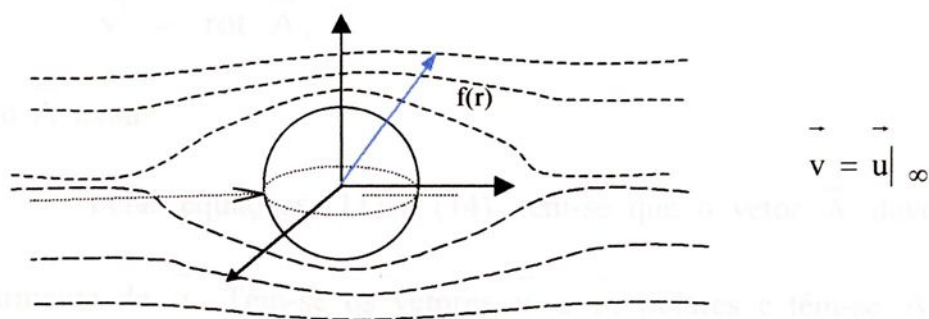


Figura A.2.3 – Representação do sistema de coordenadas no centro de massa de uma esfera imóvel, para um fluido em movimento estacionário.

Faz-se primeiro a determinação da distribuição das velocidades em torno da esfera imóvel para um escoamento estacionário. As equações que determinam o movimento são a equação de Navier-Stokes (9) e a equação de continuidade:

$$\operatorname{div} \bar{v} = 0 \quad (10)$$

Como no infinito deve-se ter $\bar{v} = \bar{u}$, pode-se escrever:

$$\bar{v} = \bar{v}' + \bar{u} \quad (11)$$

onde $\bar{v}'$ deve se anular no infinito.

Sabe-se que o rotacional de um vetor polar é um vetor axial e o rotacional de um vetor axial é um vetor polar e $\bar{v}$ é um vetor polar. Da equação de continuidade (10) e da equação (11), têm-se:

$$\bar{v} = \bar{v}' + \bar{u} \Rightarrow \operatorname{div} \bar{v} = \operatorname{div} \bar{v}' + \operatorname{div} \bar{u} \quad (12)$$

$$\operatorname{div} \bar{v} = \operatorname{div} \bar{v}' = 0 \quad (13)$$

$$\bar{v}' = \operatorname{rot} \bar{A}, \quad (14)$$

sendo $\bar{A}$ axial.

Pelas equações (11) e (14), têm-se que o vetor $\bar{A}$ deve depender linearmente de $\bar{u}$. Têm-se os vetores $\bar{u}$ e $\bar{r}$, polares e têm-se $\bar{A}$, axial. A velocidade $\bar{v}$ depende do raio vetor variável $\bar{r}$ e do parâmetro $\bar{u}$. Desta forma,

também deve depender $\bar{A}$. O único vetor axial nestas condições é o vetor $(\bar{r} \times \bar{u})$ e pode-se escrever $\bar{A}$ da forma:

$$\bar{A} = f'(r) \hat{r} \times \bar{u} \quad (15)$$

$f'(r)$ é uma função escalar de r e $\hat{r}$ está na direção do raio vetor.

Escreve-se $f'(r)$ da forma:

$$f'(r) \hat{r} = \nabla f(r) \quad (16)$$

$$\bar{A} = \nabla f(r) \times \bar{u} \quad (17)$$

$$\bar{v} = \text{rot } \bar{A} \Rightarrow \quad (18)$$

$$\bar{v} = \text{rot}(\nabla f \times \bar{u}) \quad (19)$$

Sendo $\bar{u}$ constante, têm-se:

$$\nabla f(r) \times \bar{u} = \text{rot}(f\bar{u}) \quad (20)$$

$$\bar{v} = \text{rot} \text{ rot}(f\bar{u}) + \bar{u} \quad (21)$$

Aplicando-se a operação rotacional à equação (9) têm-se:

$$\Rightarrow \nabla^2 \text{rot } \bar{v} = \bar{0} \quad (22)$$

Aplicando-se o rotacional e ∇^2 à equação (21), têm-se:

$$\Rightarrow \nabla^4 \text{rot}(f\bar{u}) = 0 \quad (23)$$

Sendo o vetor $\bar{u}$ constante, têm-se:

$$\nabla f \times \bar{u} = \nabla \times (f\bar{u}) \quad (24)$$

$$\nabla^4(\nabla f \times \vec{u}) = 0 \Rightarrow \quad (25)$$

$$\Rightarrow \nabla^4(f) = \text{constante} \quad (26)$$

A equação (21) fornece a distribuição de velocidades, para uma função $f(r)$ da forma (23), para um escoamento estacionário em torno de uma esfera imóvel, o qual tem no infinito uma velocidade dada, $\vec{v} = \vec{u}$.

Para uma função f na forma (26) em função do raio vetor, quer-se que essa função f seja tal que a velocidade do fluido se anule no infinito, e a esfera se desloque com velocidade $-\vec{u}$ (Figura A.2.4).

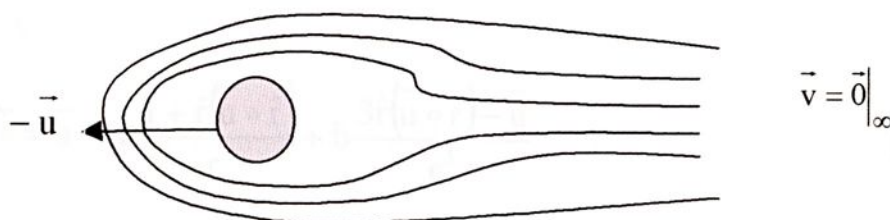


Figura A.2.4 A esfera move-se com velocidade $-\vec{u}$ num meio fluido, que tem no infinito uma velocidade igual a zero.

Se $\vec{v}$ deve se anular no infinito então também se anulam as suas derivadas.

$$\Rightarrow \nabla^4(f) = 0 \quad (26)$$

Como a equação (26) contém as derivadas de quarta ordem da função f , têm-se que a velocidade $\vec{v}$ é expressa pelas derivadas de segunda ordem da função f :

$$\therefore \nabla^2 f = \frac{2a}{r} + d \quad (27)$$

Como $\vec{v}$ deve se anular no infinito, faz-se a constante de integração d ser zero, e obtém-se:

$$\therefore f = ar + \frac{b}{r} \quad (28)$$

A constante aditiva na equação acima pode ser desprezada, pois $\vec{v}$ é determinada pelas derivadas de f.

Desenvolvendo a equação (21), têm-se :

$$\Rightarrow \vec{v} = (\vec{u} \circ \nabla) \nabla f - \vec{u} \nabla^2 f + \vec{u} \quad (29)$$

Substituindo-se as equações da função f (28) na equação (29), têm-se:

$$\vec{v} = \vec{u} - a \frac{\vec{u} + \hat{r}(\vec{u} \circ \hat{r})}{r} + b \frac{3\hat{r}(\vec{u} \circ \hat{r}) - \vec{u}}{r^3} \quad (30)$$

Encontra-se as constantes a e b, utilizando-se as condições de contorno, dados por:

1) para $r = R$, deve-se ter, $\vec{v} = \vec{0}$

2) para $\vec{u} = \vec{0}$ e $\hat{r}(\vec{u} \circ \hat{r}) = \vec{0}$ separadamente, têm-se :

$$\therefore b = \frac{R^3}{4} \quad \therefore a = \frac{3}{4}R \quad (31)$$

$$\Rightarrow f = \frac{3}{4}Rr + \frac{R^3}{4r} \quad (32)$$

$$\vec{v} = \vec{u} - \frac{3}{4}Rr \frac{\vec{u} + \hat{r}(\vec{u} \circ \hat{r})}{r} + \frac{R^3}{4} \frac{3\hat{r}(\vec{u} \circ \hat{r}) - \vec{u}}{r^3} \quad (33)$$

A velocidade do fluido, dado por (33), transformado em coordenadas esféricas, toma a forma:

$$v_r = u \cos \theta \left[1 - \frac{3R}{2r} + \frac{R^3}{2r^3} \right] \quad (34)$$

$$v_\theta = -u \sin \theta \left[1 - \frac{3R}{4r} - \frac{R^3}{4r^3} \right] \quad (35)$$

O fluido escoia sobre a esfera causando uma certa pressão. Quer-se determinar a pressão do fluido sobre a esfera:

$$\Rightarrow \nabla p = \eta \nabla^2 (\text{rot rot } (\vec{f}\vec{u}) + \vec{u}) \Rightarrow \quad (36)$$

$$\Rightarrow p = \eta \vec{u} \cdot \text{grad}(\nabla^2 f) + p_0 \quad (37)$$

sendo p_0 a pressão do fluido no infinito.

$$\Rightarrow p = \eta \vec{u} \cdot \text{grad} \left[\nabla^2 \left(\frac{3}{4} Rr + \frac{R^3}{4r} \right) \right] + p_0 \quad (38)$$

$$\Rightarrow \nabla^2 f = \frac{3R}{2} \frac{1}{r} \quad (39)$$

$$\Rightarrow \nabla(\nabla^2 f) = \frac{-3R}{2r^2} \hat{r} \quad (40)$$

$$\Rightarrow p = p_0 - \frac{3\eta R}{2} \frac{\vec{u} \cdot \hat{r}}{r^2} \quad (41)$$

A equação (41) fornece a pressão do fluido sobre a esfera, sendo p_0 a pressão do fluido no infinito.

A seguir quer-se calcular a força resultante ($\vec{F}$) da pressão do fluido que escoar sobre a superfície da esfera, ou seja, calcular a força de resistência que atua na esfera que se desloca através do fluido.

O tensor de restrição de um fluido viscoso incompressível tem a forma (Landau & Lifchitz, 1971):

$$\sigma_{ik} = -p\delta_{ik} + \eta \left(\frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} \right) \quad (42)$$

$$\Pi_{ik} = p\delta_{ik} + \rho v_i v_k - \sigma'_{ik} = -\sigma_{ik} + \rho v_i v_k \quad (43)$$

$$\sigma_{ik} = -p\delta_{ik} + \sigma'_{ik} \quad (44)$$

onde,

σ_{ik} é o tensor de restrição. Este tensor determina a parte do fluxo de impulsão que não é devido somente ao transporte direto de impulsão da massa do fluido em movimento.

σ'_{ik} é o tensor viscoso de restrição.

Em coordenadas esféricas, o tensor de restrição (Landau & Lifchitz, 1971) será dado por:

$$\sigma_{rr} = -p + 2\eta \frac{\partial v_r}{\partial r} \quad (45)$$

$$\sigma_{\varphi\varphi} = -p + 2\eta \left(\frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial v_\varphi}{\partial \varphi} + \frac{v_r}{r} + \frac{v_\theta \cot \theta}{r} \right) \quad (46)$$

$$\sigma_{00} = -p + 2\eta \left(\frac{1}{r} \frac{\partial v_\theta}{\partial \theta} + \frac{v_r}{r} \right) \quad (47)$$

$$\sigma_{r\theta} = \eta \left(\frac{1}{r} \frac{\partial v_r}{\partial \theta} + \frac{\partial v_\theta}{\partial r} - \frac{v_\theta}{r} \right) \quad (48)$$

$$\sigma_{0\varphi} = \eta \left(\frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial v_\theta}{\partial \varphi} + \frac{1}{r} \frac{\partial v_\varphi}{\partial \theta} - \frac{v_\varphi \cot \theta}{r} \right) \quad (49)$$

$$\sigma_{\varphi r} = \eta \left(\frac{\partial v_\varphi}{\partial r} + \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial v_r}{\partial \varphi} - \frac{v_\varphi}{r} \right) \quad (50)$$

Utiliza-se as coordenadas esféricas do eixo polar por meio da velocidade $\vec{u}$ do corpo. Para obter uma simetria espacial, faz-se todas as grandezas dependerem de r e do ângulo polar θ . A força $\vec{F}$ está na mesma direção da velocidade $\vec{u}$.

A força que age sobre a unidade de área da superfície é:

$$p_i = -\sigma_{ik} n_k = p n_i - \sigma_{ik} n_k \quad (51)$$

sendo n o vetor unitário da normal à superfície.

Determina-se as componentes, na direção da normal e da tangente à superfície, da força aplicada ao elemento de área da superfície da esfera, e projeta-se na direção da velocidade u .

$$F = \int \left(-p \cos \theta + \sigma'_{rr} \cos \theta - \sigma'_{r\theta} \sin \theta \right) df \quad (52)$$

A integração será efetuada sobre toda superfície da esfera.

A equação da velocidade do fluido, obtida na equação (33), foi expressa em coordenadas esféricas, por meio das equações (34) e (35). Utilizando-se estas equações, calcula-se as derivadas da velocidade v_r em relação as coordenadas esféricas r e θ , para obter σ'_{rr} , $\sigma'_{r\theta}$.

$$\Rightarrow F = 6\pi\eta Ru \quad (53)$$

A equação (53) fornece a força de resistência atuante sobre uma esfera, de raio R , que se desloca com velocidade constante $\bar{u}$, num fluido viscoso incompressível.

A.3 Torque resistivo

Suponha uma esfera de raio R em um fluido viscoso incompressível, rotacionando com velocidade angular constante. O cálculo do momento total das forças de atrito, atuantes sobre a esfera, pode ser obtido fazendo com que o fluido ocupe o espaço compreendido entre duas cascas de esferas concêntricas rotacionantes, de velocidades angulares constantes, Ω_1 e Ω_2 e raios $R_2 > R_1$ (Figura A.3.1). Os eixos de rotação são coincidentes.

Devido a linearidade das equações, pode-se considerar a superposição dos movimentos, resolvendo-se o movimento em duas etapas, estando uma das esferas em repouso em torno da outra em cada etapa.

Assume-se primeiro que a esfera externa esteja imóvel, ($\Omega_2=0$), permitindo a rotação da esfera interna (Figura A.3.1). Os números de Reynolds

$$\frac{\Omega_1 R_1^2}{\nu} \text{ e } \frac{\Omega_2 R_2^2}{\nu} \text{ são pequenos em relação à unidade.}$$

A equação do movimento estacionário de um fluido viscoso incompressível para um número de Reynolds pequeno, pode ser dado pela equação (9):

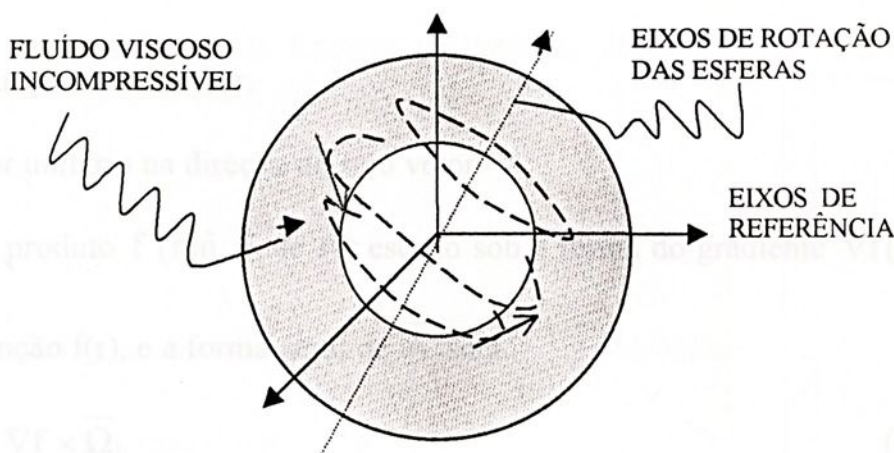


Figura A.3.1 – Representação do fluido ocupando o volume compreendido entre duas esferas concêntricas rotacionantes de raios $R_2 > R_1$, com mesmo eixo de rotação, com velocidades angulares constantes $\bar{\Omega}_1$ e $\bar{\Omega}_2$.

A velocidade do fluido em cada ponto está na direção da tangente à circunferência, cujo centro está sobre o eixo de rotação e no plano perpendicular a este eixo. Devido à simetria axial em relação ao eixo de rotação, a pressão tem o gradiente na mesma direção. Assim, a equação de movimento fica:

$$\Rightarrow \nabla^2 \vec{v} = 0 \quad (54)$$

Sabe-se que velocidade $\vec{v}$ é um vetor polar, e $\vec{\Omega}_1$ é um vetor axial.

Desse modo, $\vec{v}$ pode ser escrito como o rotacional de um vetor axial:

$$\vec{v} = \text{rot } \vec{A}, \quad (55)$$

O vetor que se pode escrever para se obter corpos simétricos como uma esfera, é o vetor $\vec{r} \times \vec{\Omega}_1$. Assim, $\vec{A}$ deve ter a forma:

$$\vec{A} = f'(r)\hat{n} \times \vec{\Omega}_1 \quad (56)$$

onde,

$f(r)$ é uma função escalar de r ,

$\hat{n}$ é um vetor unitário na direção do raio vetor.

O produto $f'(r)\hat{n}$ pode ser escrito sob a forma do gradiente $\nabla f(r)$ de uma outra função $f(r)$, e a forma geral de $\vec{A}$ será:

$$\vec{A} = \nabla f \times \vec{\Omega}_1 \quad (57)$$

Têm-se para a velocidade do fluido:

$$\vec{v} = \nabla f \times \vec{\Omega}_1 \quad (58)$$

$$\Rightarrow \vec{v} = \text{rot}(\vec{\Omega}_1 f(r)) \quad (59)$$

Aplicando-se ∇^2 na equação (58) acima, têm-se:

$$\nabla^2 \vec{v} = \nabla^2 (\nabla f \times \vec{\Omega}_1) \Rightarrow$$

permutando-se os operadores obtém-se pela equação (54):

$$\Rightarrow \nabla(\nabla^2 f \times \vec{\Omega}_1) = 0 \quad (60)$$

Como o vetor $\text{grad} \nabla^2 f$ está na direção do raio vetor, e o produto

$\vec{r} \times \vec{\Omega}_1$ deve ser nulo para um $\vec{\Omega}_1$ dado e um $\vec{r}$ arbitrário, pode-se escrever:

$$\text{grad}(\nabla^2 f) = 0 \Rightarrow \quad (62)$$

$$\Rightarrow \nabla^2 f = \text{constante} \quad (63)$$

Assim, f deve ter a forma:

$$f = a r^2 + \frac{b}{r} \quad (64)$$

Substituindo-se a função f acima, na equação (58), encontra-se para a velocidade:

$$\Rightarrow \vec{v} = \left(\frac{b}{r^3} - 2a \right) \vec{\Omega}_1 \times \vec{r} \quad (65)$$

Determina-se as constantes a e b a partir das condições :

$$1 - \vec{v} = \vec{0} \text{ para } r = R_2 \quad e$$

$$2 - \vec{v} = \vec{u} \text{ para } r = R_1$$

$$b = \frac{R_1^3 R_2^3}{R_2^3 - R_1^3} \quad (66)$$

$$a = \frac{R_1^3}{2(R_2^3 - R_1^3)} \quad (67)$$

$$\Rightarrow \vec{v} = \frac{R_1^3 R_2^3}{(R_2^3 - R_1^3)} \left(\frac{1}{r^3} - \frac{1}{R_2^3} \right) \vec{\Omega}_1 \times \vec{r} \quad (68)$$

Assume-se agora que a esfera interna está em repouso $\vec{\Omega}_1 = \vec{0}$, só rotacionando a esfera externa, com velocidade angular constante.

A pressão no fluido permanece constante e a equação (9) toma a forma da equação (54):

$$\Rightarrow p = p_0 \Rightarrow \nabla^2 \vec{v} = 0 \quad (69)$$

Seguindo-se os passos de (54) a (63), obtém-se:

$$\nabla^2 f = \text{constante} \quad (70)$$

Deste modo, a função f deve ter a forma:

$$f = ar^2 + \frac{b}{r} \quad (71)$$

$$\vec{v} = \left(\frac{b}{r^3} - 2a \right) \vec{\Omega}_2 \times \vec{r} \quad (72)$$

$$\vec{v} = \frac{R_1^3 R_2^3}{(R_2^3 - R_1^3)} \left(\frac{1}{R_1^3} - \frac{1}{r^3} \right) \vec{\Omega}_2 \times \vec{r} \quad (73)$$

Considerando-se a composição dos movimentos de rotação, e superpondo-se os movimentos, obtém-se:

$$\vec{v} = \frac{R_1^3 R_2^3}{R_1^3 - R_2^3} \left\{ \left(\frac{1}{r^3} - \frac{1}{R_2^3} \right) \vec{\Omega}_1 \times \vec{r} + \left(\frac{1}{R_1^3} - \frac{1}{r^3} \right) \vec{\Omega}_2 \times \vec{r} \right\} \quad (74)$$

Supondo-se que a esfera externa não exista, tem-se a solução para o problema. Uma esfera de raio R rotacionando com uma velocidade angular constante $\vec{\Omega}$ em um fluido viscoso incompressível, pode-se fazer:

$$R_2 \rightarrow \infty \quad \text{e} \quad \vec{\Omega}_2 = \vec{0}$$

$$\Rightarrow \vec{v} = \frac{R^3}{r^3} \vec{\Omega} \times \vec{r} \quad (75)$$

A equação para a velocidade obtida em (75), é a distribuição de velocidades do fluido para uma esfera rotacionando com velocidade angular constante $\vec{\Omega}$.

Quer-se calcular agora o momento das forças de atrito ($M_{at.}$) operante sobre a superfície da esfera rotacionante, dado por:

$$M_{at.} = \int \sigma'_{r\varphi} R \sin \theta \, df \quad (76)$$

$$\Rightarrow \sigma'_{r\varphi} = -3\eta\Omega \sin \theta \quad (77)$$

Substituindo-se o valor de $\sigma'_{r\varphi}$ obtido em (77) na equação do momento das forças de atrito (76), obtém-se:

$$\Rightarrow M_{at.} = -8\pi\eta R^3 \Omega \quad (78)$$

Este é o momento total das forças de atrito (78), que operam sobre a superfície de uma esfera de raio R , com velocidade angular constante $\vec{\Omega}$, num fluido viscoso incompressível.

B.1 Microdomínio do modelo difusão-colisão (Karplus & Weaver, 1979)

Este modelo considera como elementos básicos para o enovelamento, pequenas porções incipientes da estrutura secundária, denominados microdomínios, tais como hélices- α , estruturas- β e aglomerados hidrofóbicos.

Estes microdomínios variam rapidamente entre a faixa aleatória e os elementos estruturais secundários completos, ou parcialmente formados. Os microdomínios devem ser pequenos o suficiente, em relação à cadeia polipeptídica, para possibilitar que todas as possíveis alternativas conformacionais sejam encontradas rapidamente. Devido à necessidade de serem pequenos, são instáveis isoladamente.

Considerando que cada um destes microdomínios, ainda que acessível por eventos randômicos, não são estáveis, foi discutido como a possibilidade de porções da cadeia flutuarem, dentro e fora, de seu estado nativo (SHWARZ, 1965). Estas porções poderiam ser centros de nucleação, coalescendo através de interações não covalentes, que conduziriam à estrutura nativa da proteína.

Cada microdomínio será aproximado geometricamente à uma esfera, calculando-se o volume de van der Waals de cada átomo, desprezando-se os *overlaps*, e tomando-se o raio que se obteria para uma esfera de mesmo volume.



B.2 Tensor de inércia

O tensor de inércia do microdomínio J, $\{ I_J \}$ é dado por:

$$\{ I_J \} = \begin{Bmatrix} \sum_{i=1}^n m_i (y_i^2 + z_i^2) & - \sum_{i=1}^n m_i x_i y_i & - \sum_{i=1}^n m_i x_i z_i \\ - \sum_{i=1}^n m_i y_i x_i & \sum_{i=1}^n m_i (x_i^2 + z_i^2) & - \sum_{i=1}^n m_i y_i z_i \\ - \sum_{i=1}^n m_i z_i x_i & - \sum_{i=1}^n m_i z_i y_i & \sum_{i=1}^n m_i (y_i^2 + x_i^2) \end{Bmatrix}$$

onde,

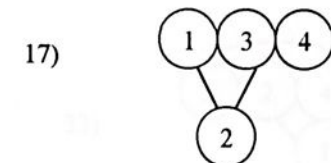
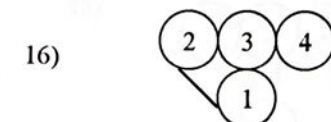
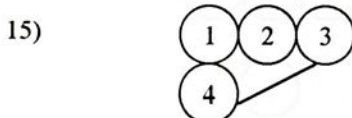
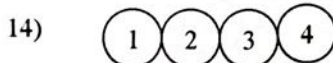
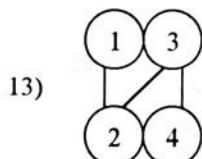
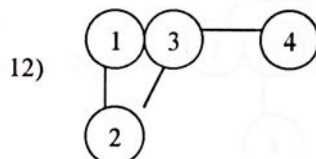
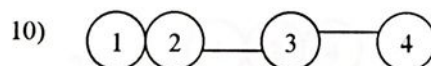
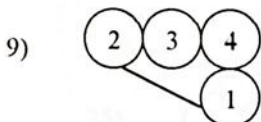
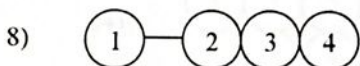
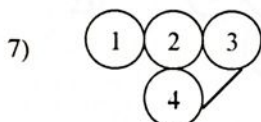
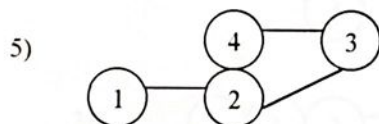
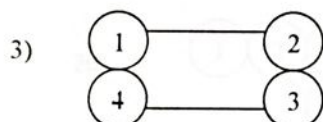
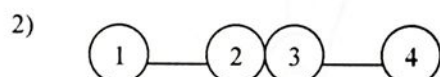
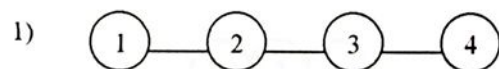
n = número total de átomos do microdomínio J,

m_i = massa do átomo i do microdomínio J,

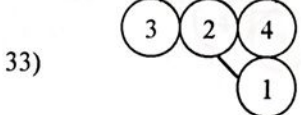
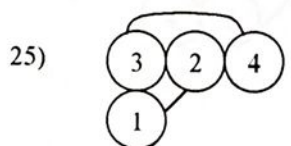
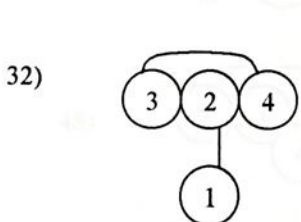
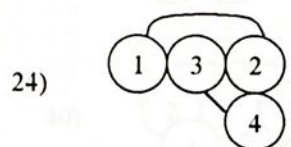
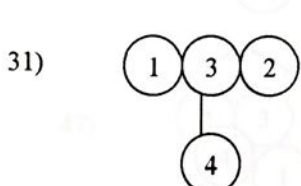
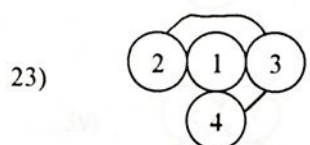
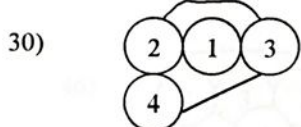
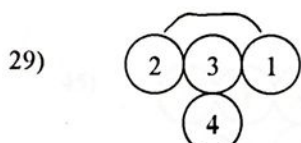
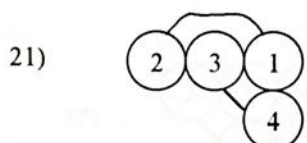
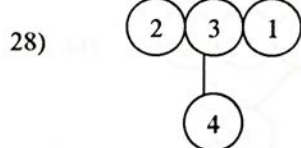
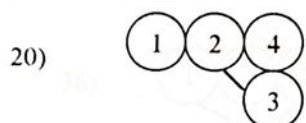
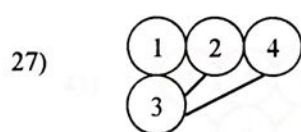
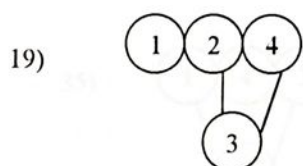
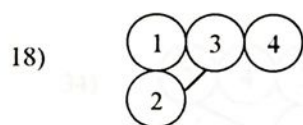
x_i, y_i, z_i = coordenadas cartesianas do átomo i do microdomínio J.

B.3 Espaço Amostral

Ilustrações de todos possíveis contatos entre quatro microdomínios, idealizados como esferas. Cada esfera pode ter nenhum ou no máximo três contatos.

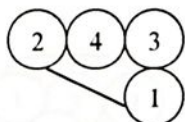


Espaço Amostral (Continuação).

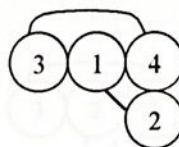


Espaço amostral (Continuação).

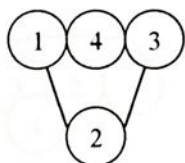
34)



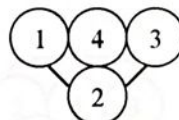
42)



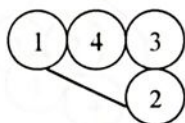
35)



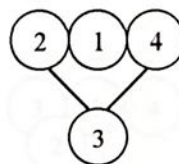
43)



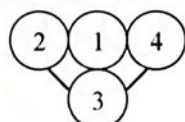
36)



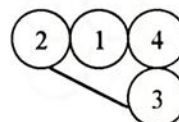
44)



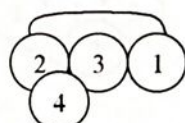
37)



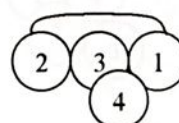
45)



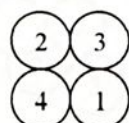
38)



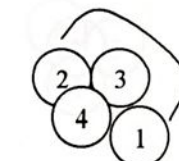
46)



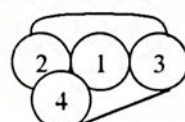
39)



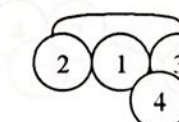
47)



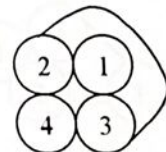
40)



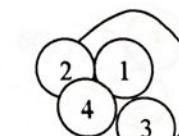
48)



41)



49)



Espaço Amostral (Continuação).

