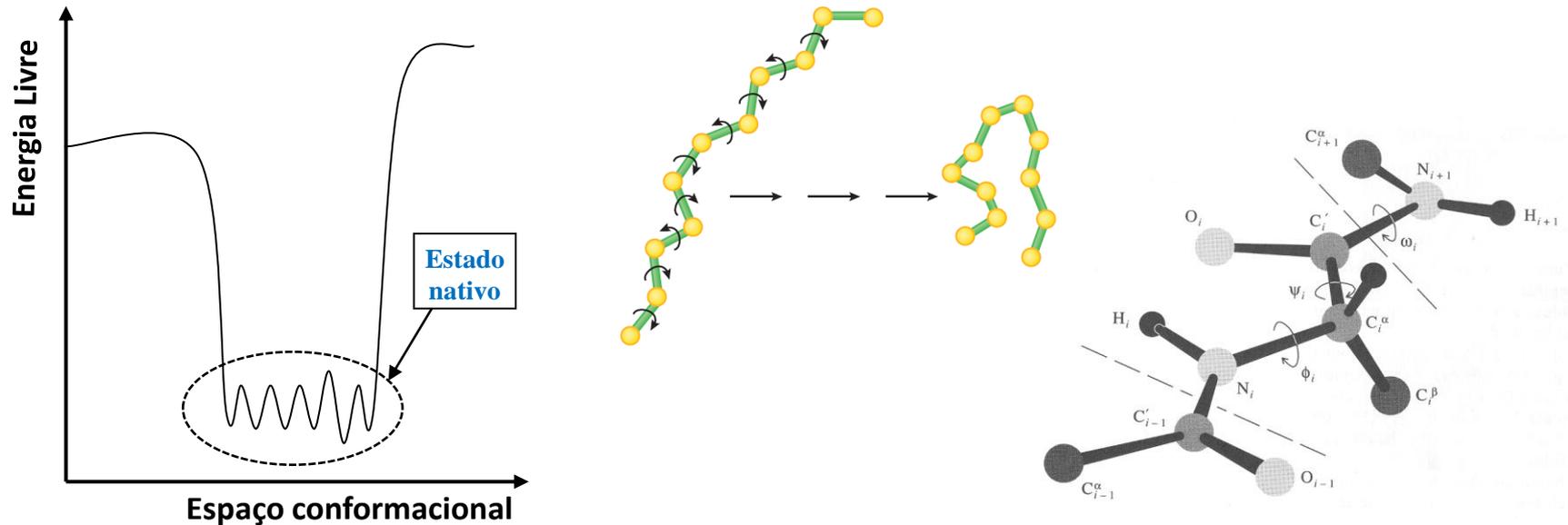


Proteínas: propriedades conformacionais

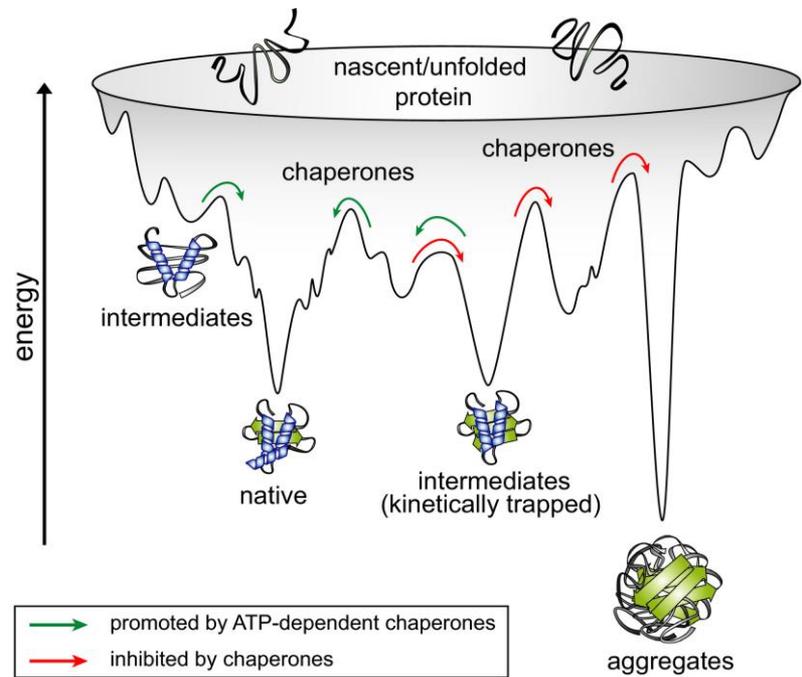
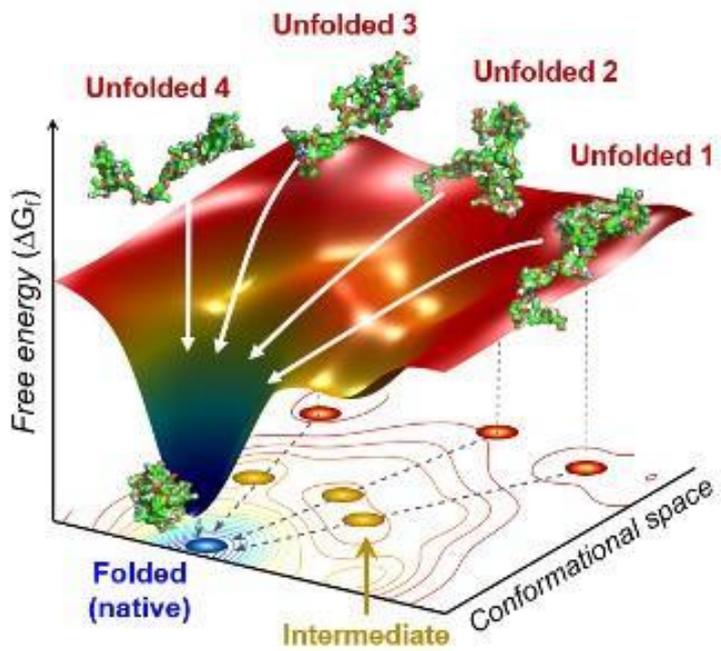


O elevado número de graus de liberdade da cadeia polipeptídica resulta num igualmente grande número de conformações possíveis.

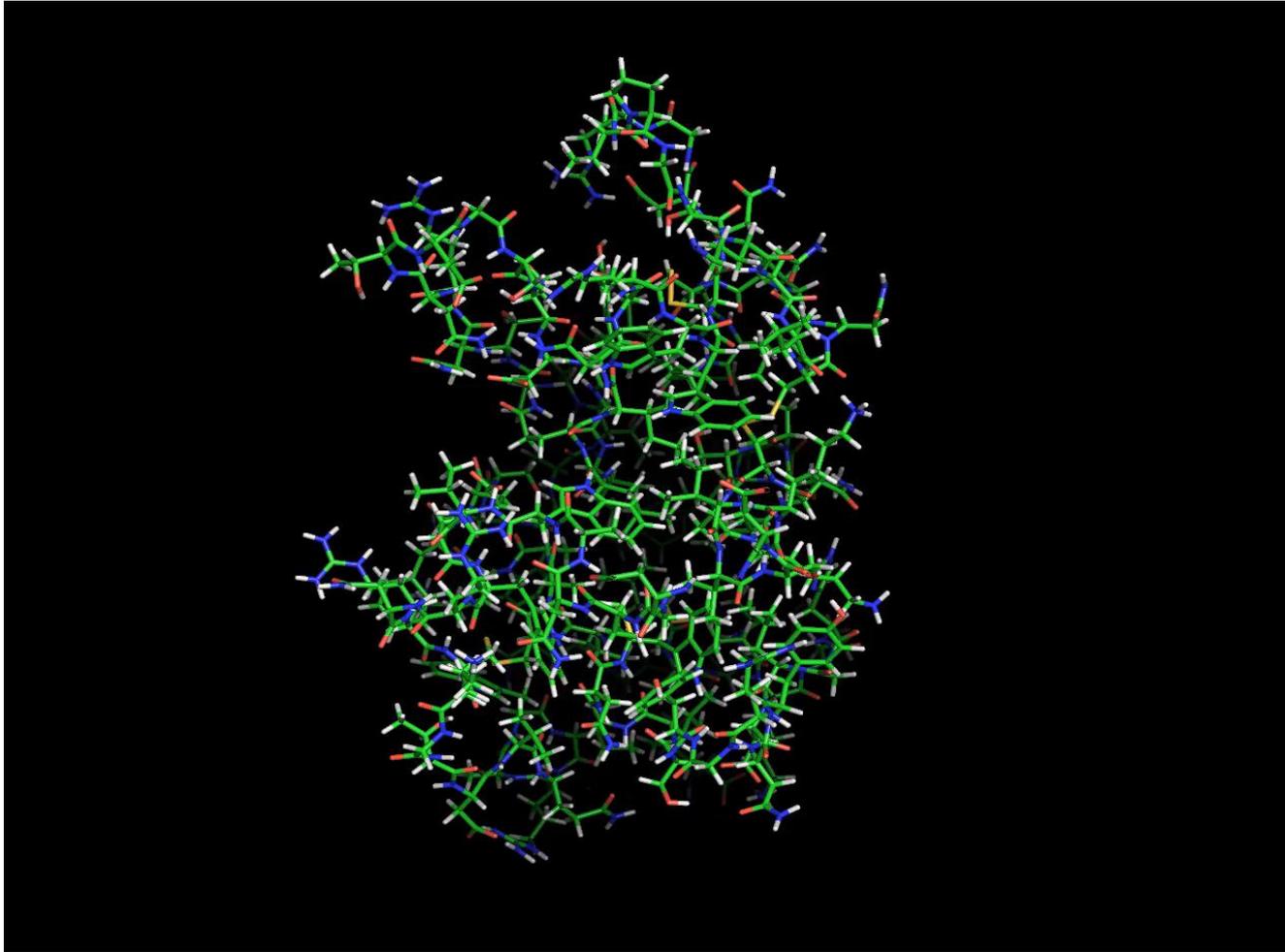
As proteínas biológicas tem a propriedade de apresentar um *estado nativo* de estrutura tridimensional bem definida, muito diferente do estado desdobrado de cadeia aleatória característico dos polímeros.

O estado nativo da proteína corresponde a uma família de conformações com energias próximas, num região de baixa energia (mínimo local, ou global(?)).

O “preço” entrópico de seleccionar o estado nativo de entre o largo conjunto de possíveis conformações “desdobradas” é pago pela entalpia das forças intermoleculares presentes na estrutura nativa.

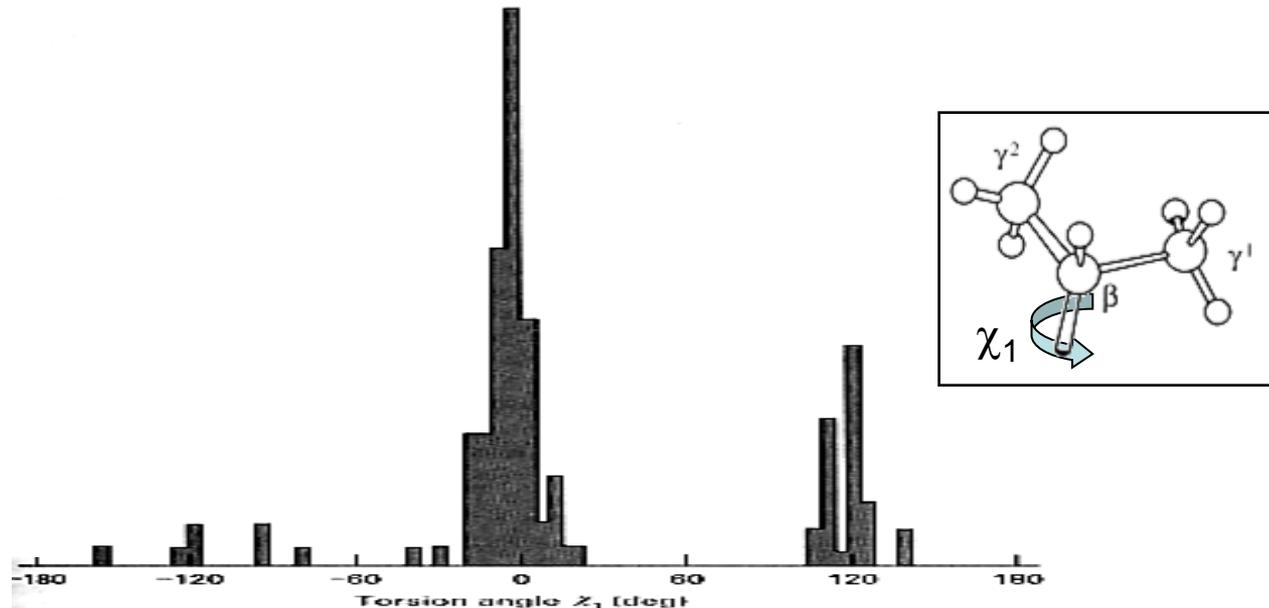


Lisozima: estado nativo



Proteínas: propriedades conformacionais

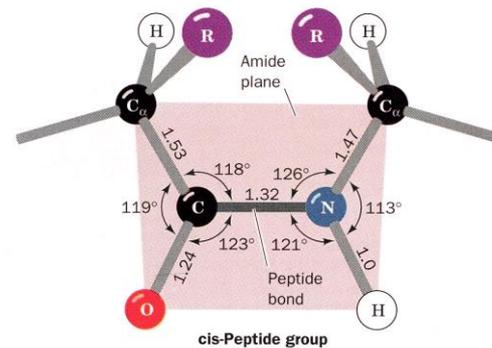
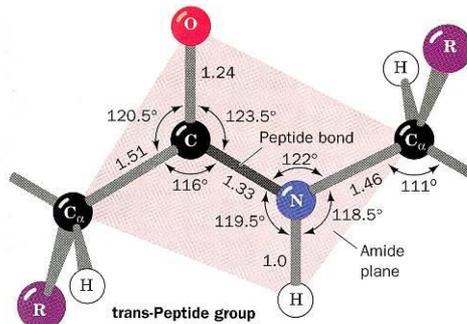
- As cadeias polipeptídicas raramente apresentam nós
- Os ângulos e comprimentos de ligação observados nas proteínas são geralmente muito idênticos aos observados nas estruturas de grupos funcionais isolados.
- As rotações livres de ligações das cadeias laterais ou da cadeia principal da proteína favorecem geralmente conformações semelhantes às observadas nos grupos isolados.
- Os ângulos ϕ e ψ observados para os resíduos da proteína caem quase sempre dentro dos limites característicos da unidade peptídica isolada
- As rotações em torno das ligações da cadeia lateral favorecem geometrias em que há máxima separação entre grupos volumosos. A figura abaixo ilustra o caso da valina:



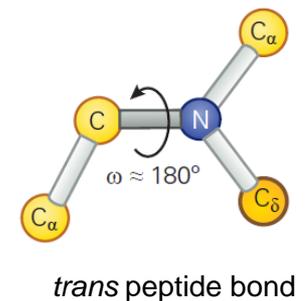
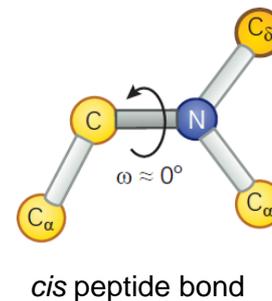
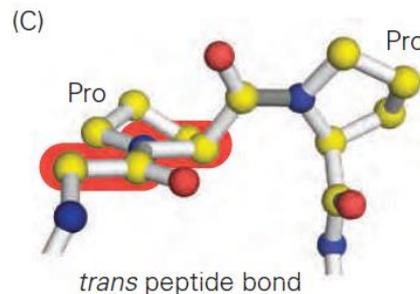
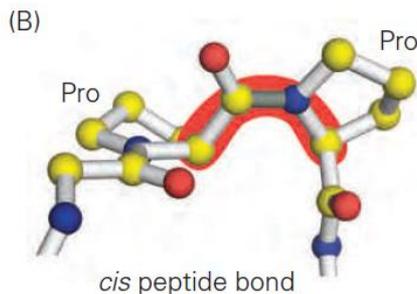
Distribuição de valores do ângulo de torção $\chi_1(C_\alpha-C_\beta)$ da valina

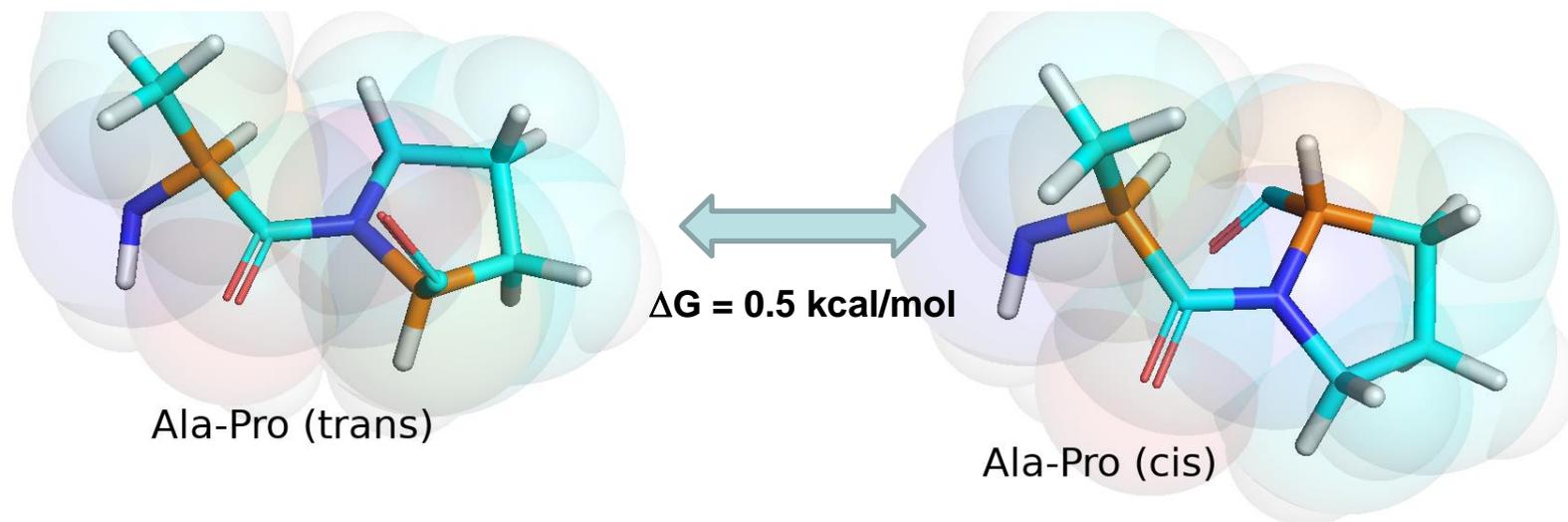
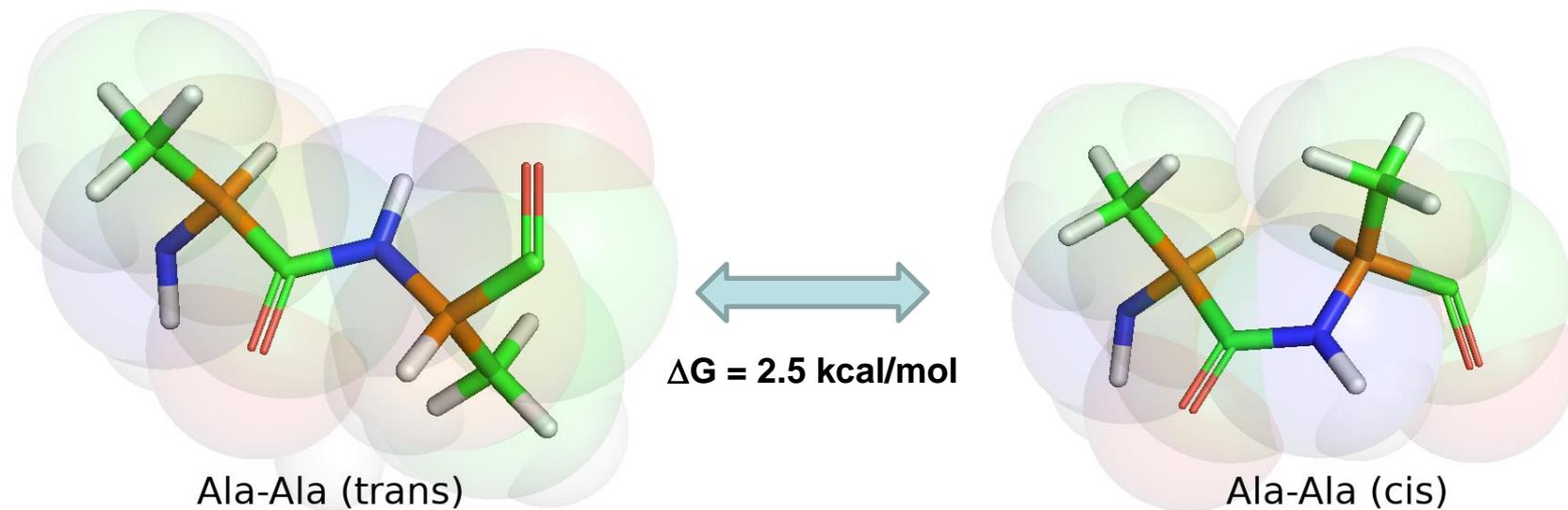
Propriedades conformacionais da ligação peptídica

Embora a complexidade estrutural e conformacional das proteínas seja imensa, existem constrangimentos geométricos que permitem simplificar a sua análise. A ligação peptídica é uma *invariante estrutural* das proteínas, podendo considerar-se aproximadamente planar nas suas formas *cis* e *trans*.



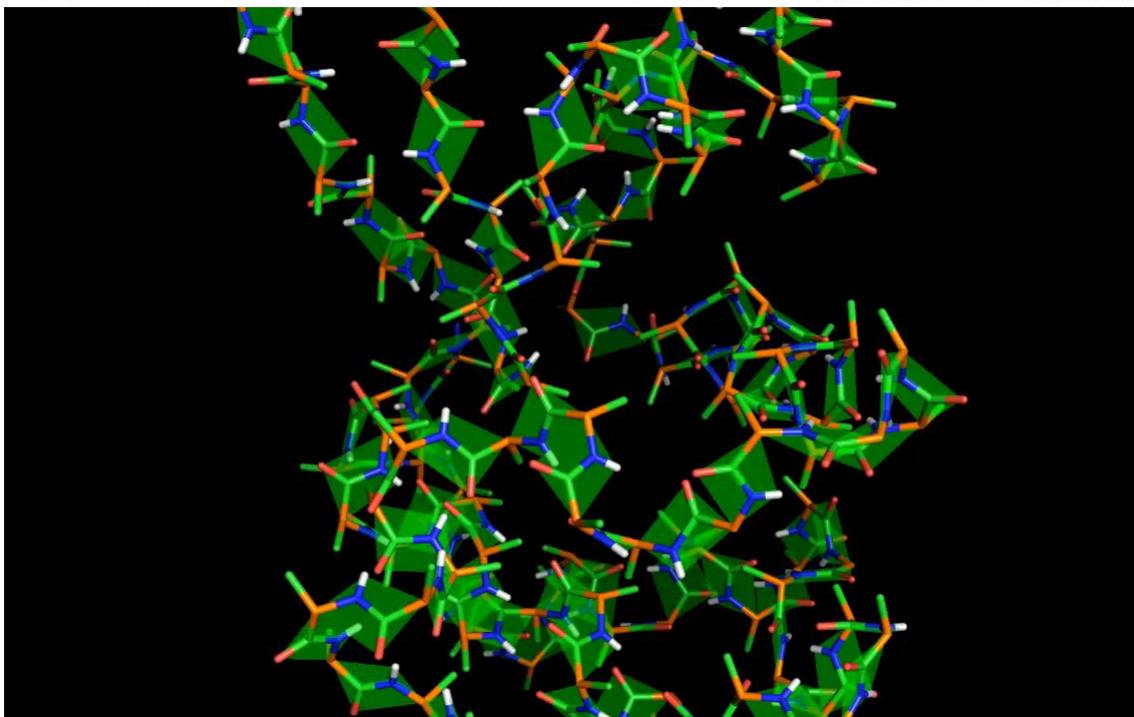
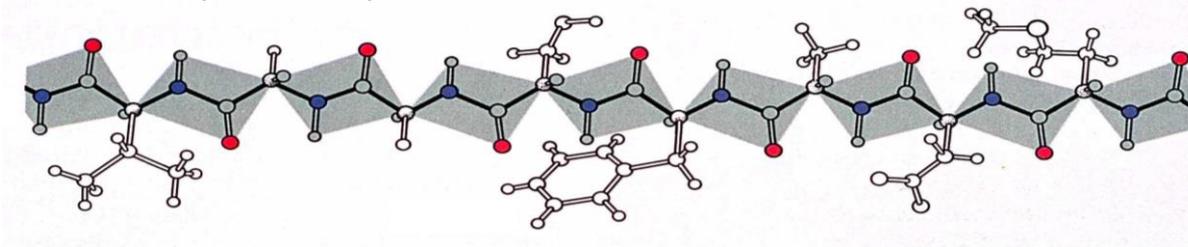
A forma *cis* é observada muito mais raramente (cerca de 0.05%) excepto quando *i+1* é uma prolina (cerca de 5-6%). Embora diferença de energia entre os dois estados seja pequena (~ 2 kcal/mol), a barreira energética é considerável (~ 20 kcal/mol).





Sequência de planos peptídicos

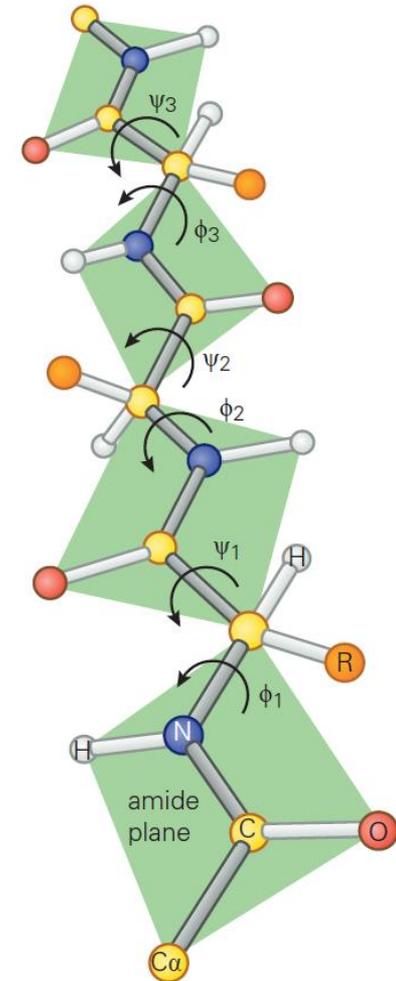
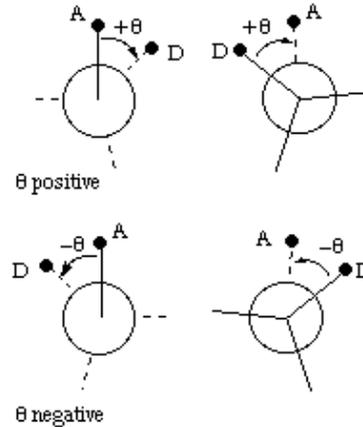
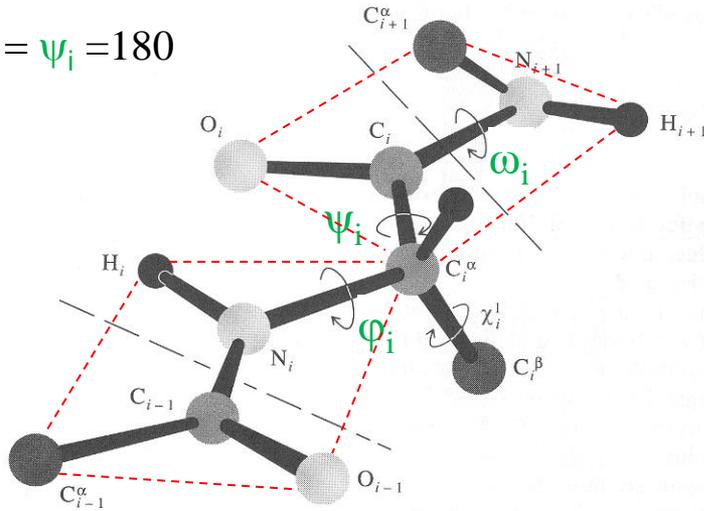
Apesar de se observarem pequenas desvios de comprimentos de ligação, ângulos e planaridade, a ligação peptídica pode considerar-se praticamente rígida, levando a uma representação da conformação da cadeia polipeptídica como uma sequência de planos:



Planos peptídicos na molécula de lysozyme (2vb1)

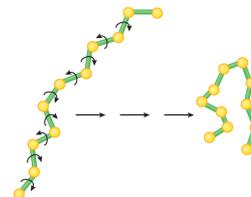
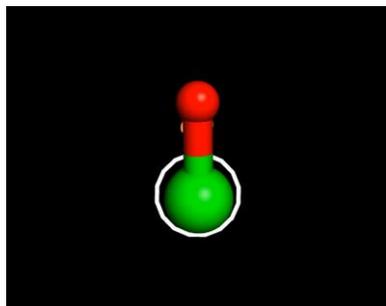
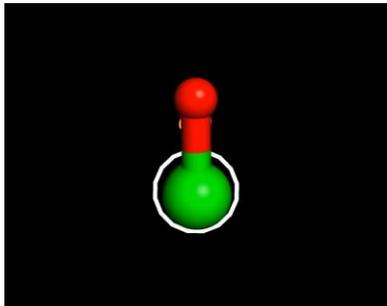
Propriedades conformacionais da ligação peptídica: ângulos de torção ϕ , ψ e ω (IUPAC-IUB)

$$\omega_i = \phi_i = \psi_i = 180$$



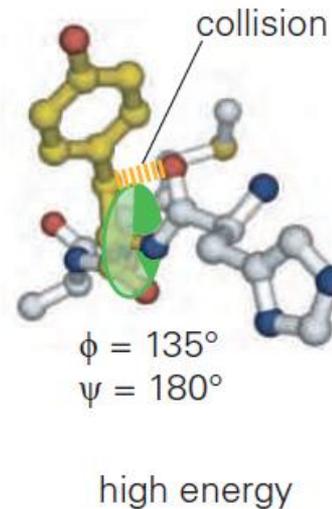
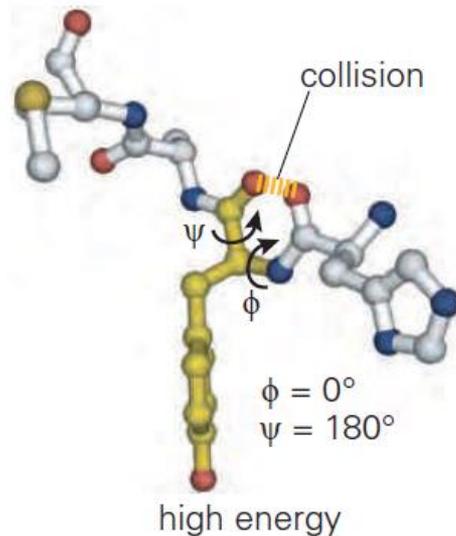
$$-180 < \omega_i, \phi_i, \psi_i < +180$$

- Ângulo de Torção ϕ_i - $C_{i-1}, N_i, C_i^\alpha, C_i$
- Ângulo de Torção ψ_i - $N_i, C_i^\alpha, C_i, N_{i+1}$
- Ângulo de Torção ω_i - $C_i^\alpha, C_i, N_{i+1}, C_{i+1}^\alpha$



Restrições locais de flexibilidade na conformação da cadeia polipeptídica

Embora os ângulos de torção ϕ e ψ possam *em teoria* assumir valores entre $+180$ e -180 , a presença de **impedimentos estereoquímicos** reduz largamente o número de conformações permitidas.



G.N. Ramchandran, em 1963, analisou pela primeira vez o espaço das conformações permitidas usando um modelo de **esferas rígidas** com distâncias mínimas de aproximação entre os átomos definidas a partir de um conjunto de raios atômicos obtido por análise das estruturas cristalográficas.

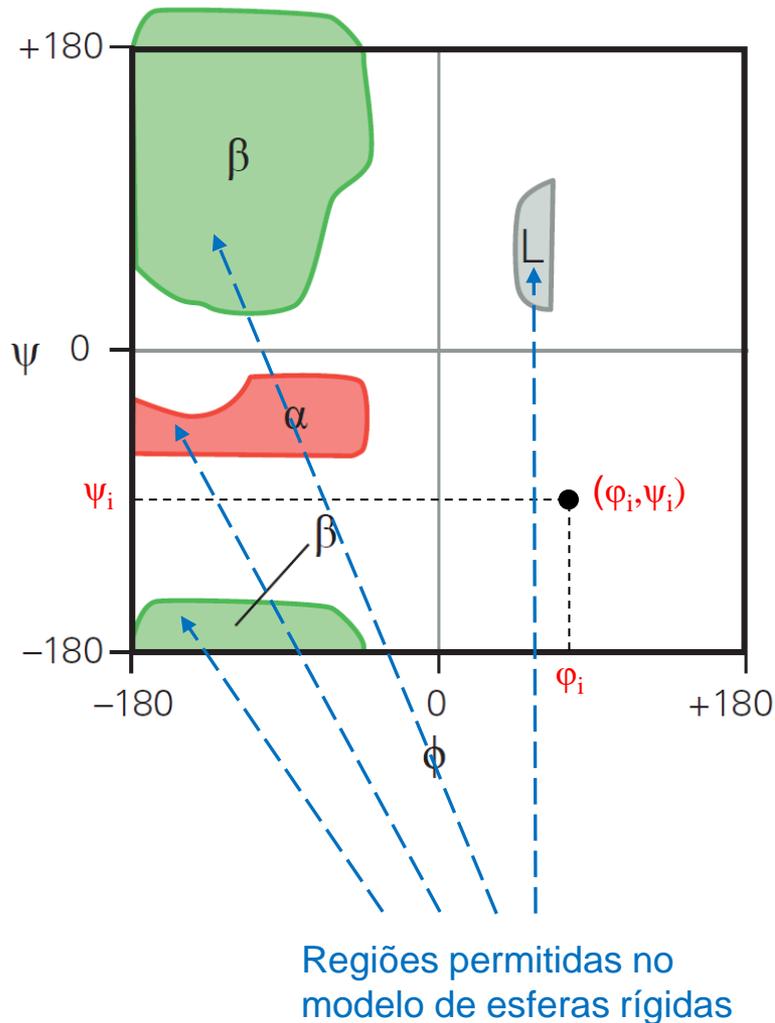
Distâncias de contacto interatómicas e modelo de esferas rígidas

A análise de contactos atómicos em estruturas cristalinas permitiu definir distâncias mínimas de aproximação entre os átomos da cadeia polipeptídica (Ramachandran, 1963). Para além do valor típico de aproximação, define-se um limite extremo cerca de 0.10Å inferior que corresponde a uma tolerância máxima do valor de aproximação.

Typo de contacto	Limite Normal	Limite Extremo	
H ... H	2,0	1,9	$r(\text{H})=2.0/2 = 1.0 \text{ Å}$
H ... O	2,4	2,2	$r(\text{O})+r(\text{H})=1.35+1.0 = 2.4 \text{ Å}$
H ... N	2,4	2,2	$r(\text{N})+r(\text{H})=1.35+1.0 = 2.4 \text{ Å}$
H ... C	2,4	2,2	$r(\text{C})+r(\text{H})=1.5+1.0 = 2.5 \text{ Å}$
O ... O	2,7	2,6	$r(\text{O})=2.7/2 = 1.35 \text{ Å}$
O ... N	2,7	2,6	$r(\text{O})+r(\text{N})=1.35+1.35 = 2.7 \text{ Å}$
O ... C	2,9	2,7	$r(\text{O})+r(\text{C})=1.35+1.5 = 2.9 \text{ Å}$
N ... N	2,7	2,6	$r(\text{N})=2.7/2 = 1.35 \text{ Å}$
N ... C	2,9	2,8	$r(\text{N})+r(\text{C})=1.35+1.5 = 2.9 \text{ Å}$
C ... C	3,0	2,9	$r(\text{C})=3.0/2 = 1.5 \text{ Å}$

Verifica-se que as distâncias de contacto podem ser descritas como somas de distâncias típicas para cada tipo de átomo (raio atómico), pelo que o espaço de conformações da cadeia polipeptídica pode, pelo menos em primeira análise, ser analisado através de um **modelo de esferas rígidas**.

Restrições locais de flexibilidade: o diagrama de Ramachandran



Ramachandran e colaboradores usaram um computador para explorar o espaço dos possíveis valores de ϕ e ψ , e representaram estes valores num diagrama 2-D, em que cada ponto corresponde um possível pares (ϕ, ψ) .

As regiões marcadas a cinza, verde e vermelho no **diagrama de Ramachandran** correspondem aos valores de ângulos ϕ e ψ em que não há sobreposição de átomos no modelo de esferas rígidas.

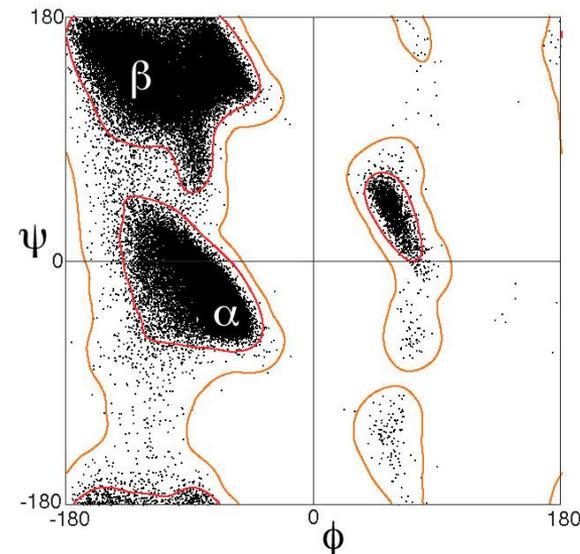
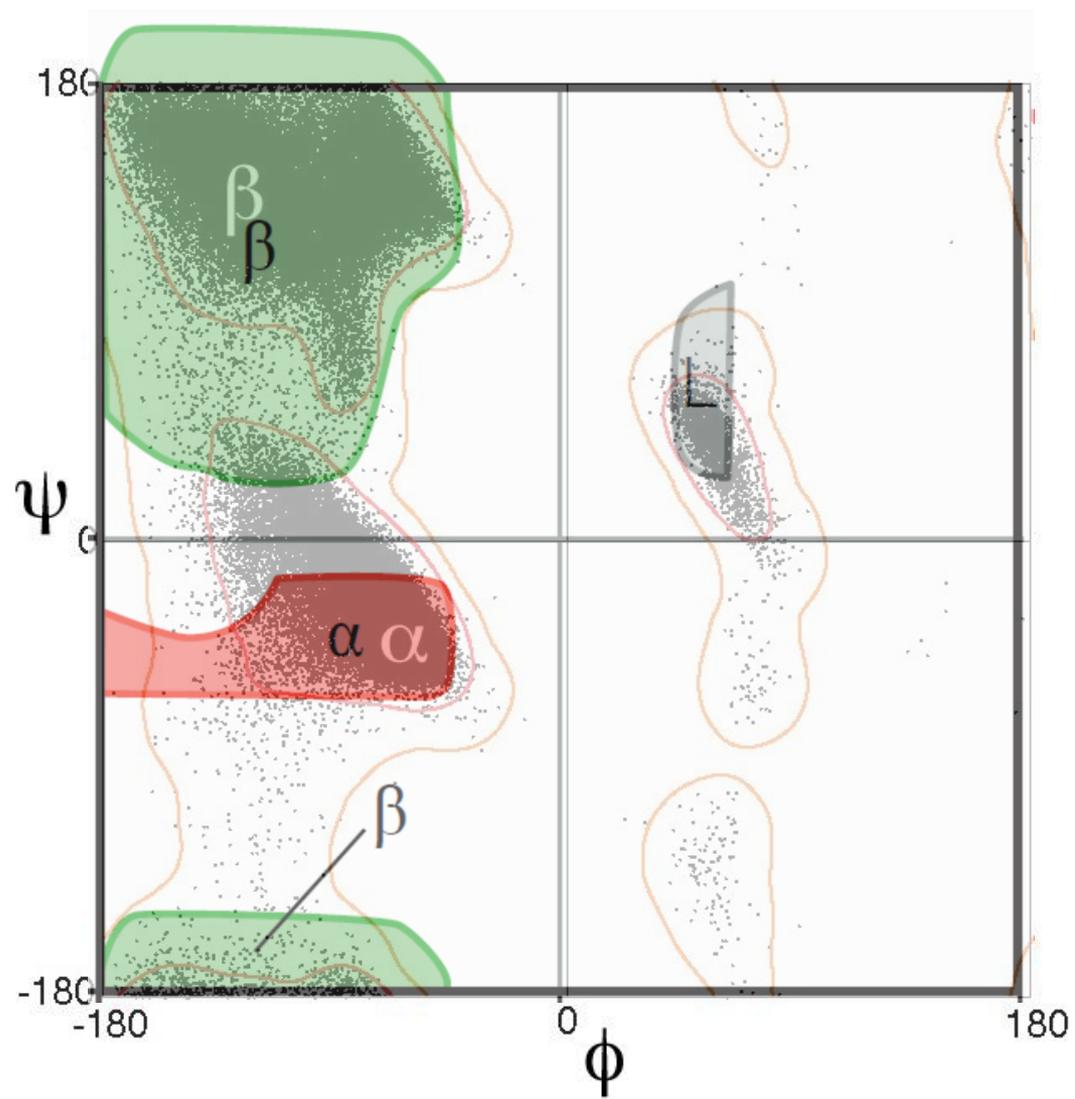
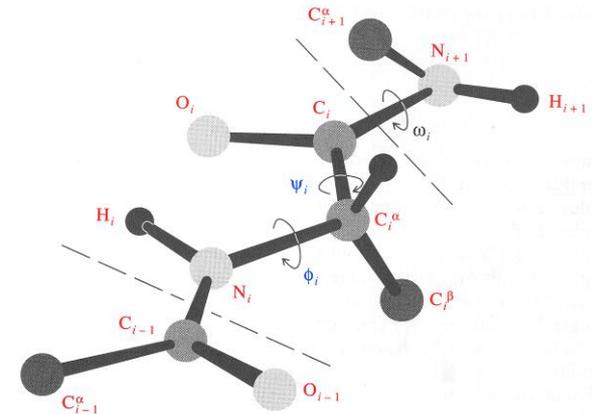
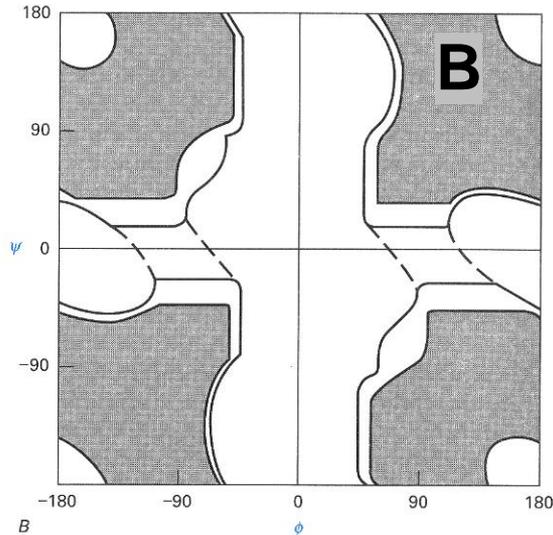
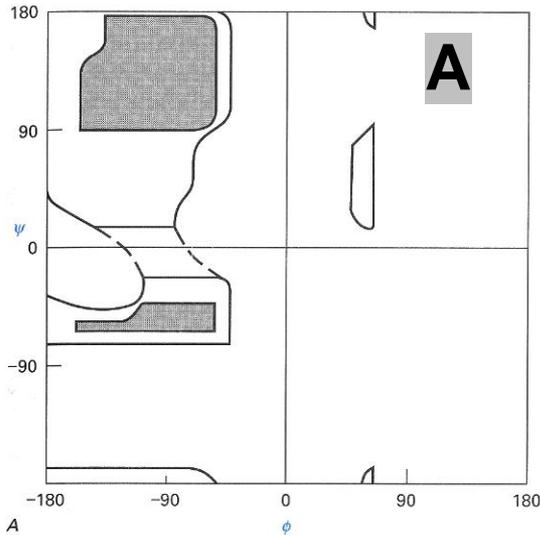


Diagrama de Ramachandran para 500 estruturas de proteínas



Restrições locais de flexibilidade: o diagrama de Ramachandram

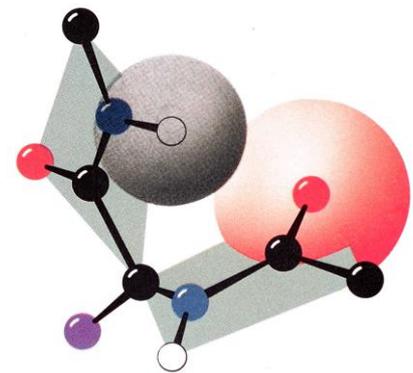


Restrições conformacionais impostas pelos contactos interatômicos:

(A) Alanina (B) Glicina

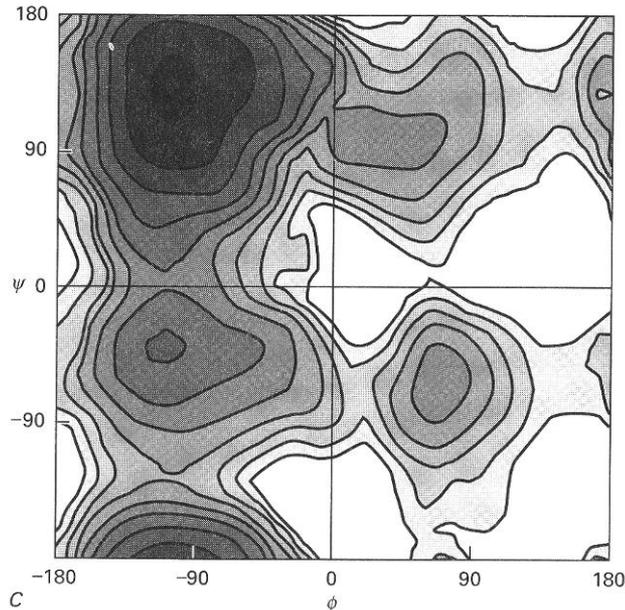
As regiões sombreadas denotam as zonas dentro dos limites mínimos permitidos, e as delimitadas pela linha a cheio as correspondentes aos limites extremos, definidos por Ramachandram em 1963. As zonas a tracejado são alcançáveis através de pequenas flexões dos ângulos de ligação do “backbone” da cadeia polipeptídica.

Exemplo de conformação “proibida”

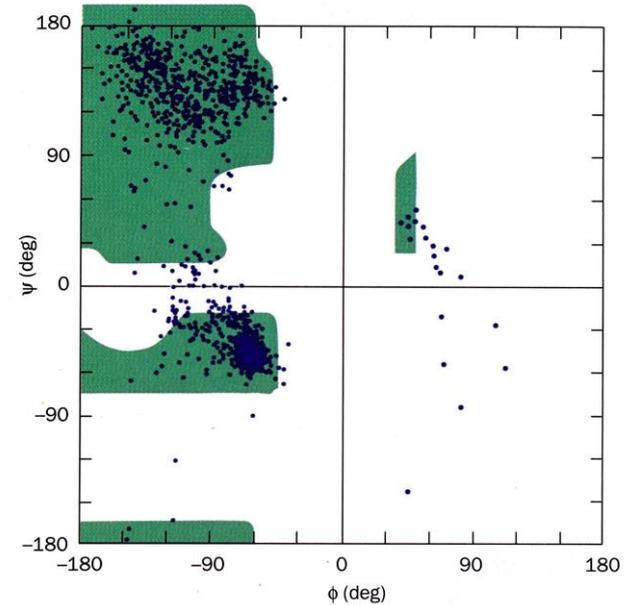


$\phi_i = -60$ $\psi_i = +30$

Propriedades conformacionais: restrições locais de flexibilidade



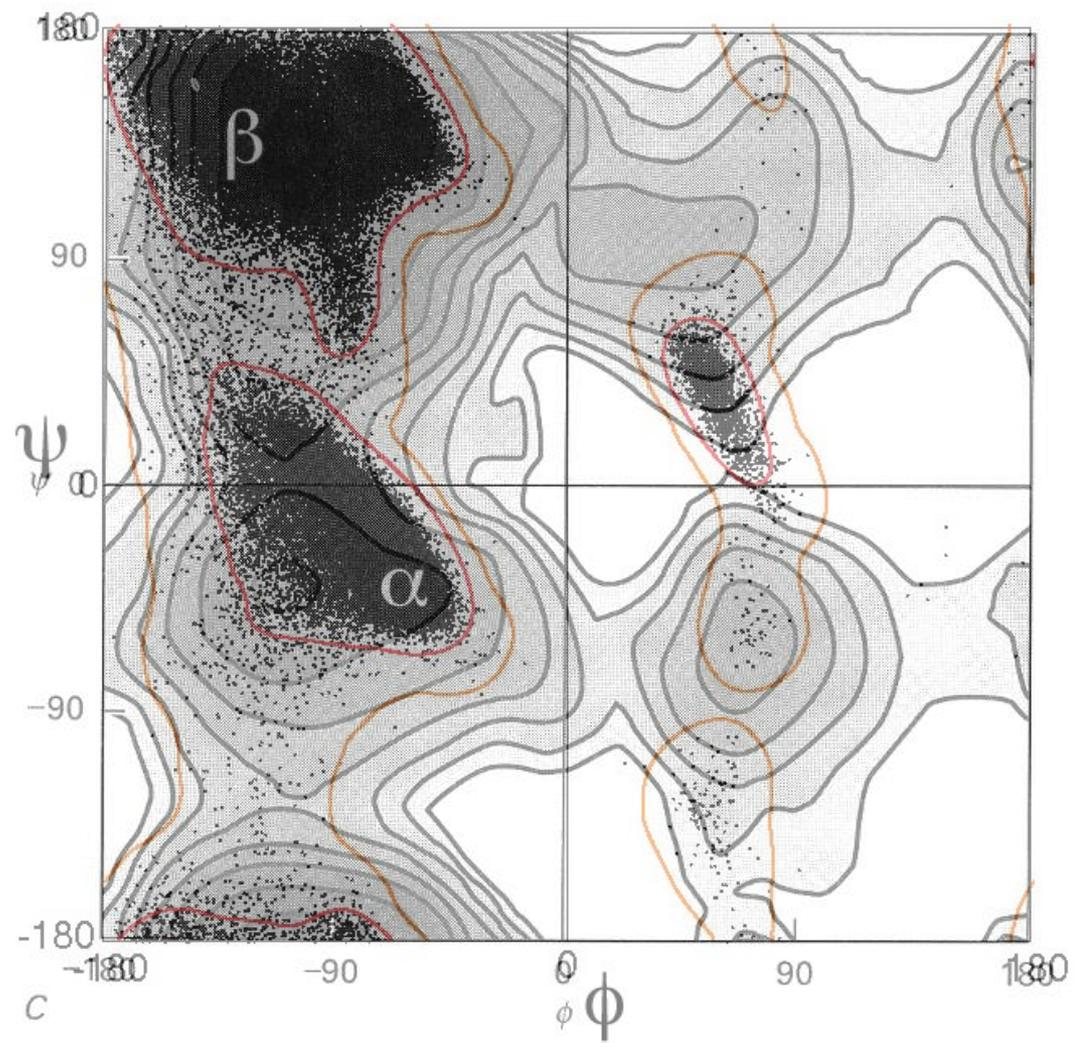
(A)

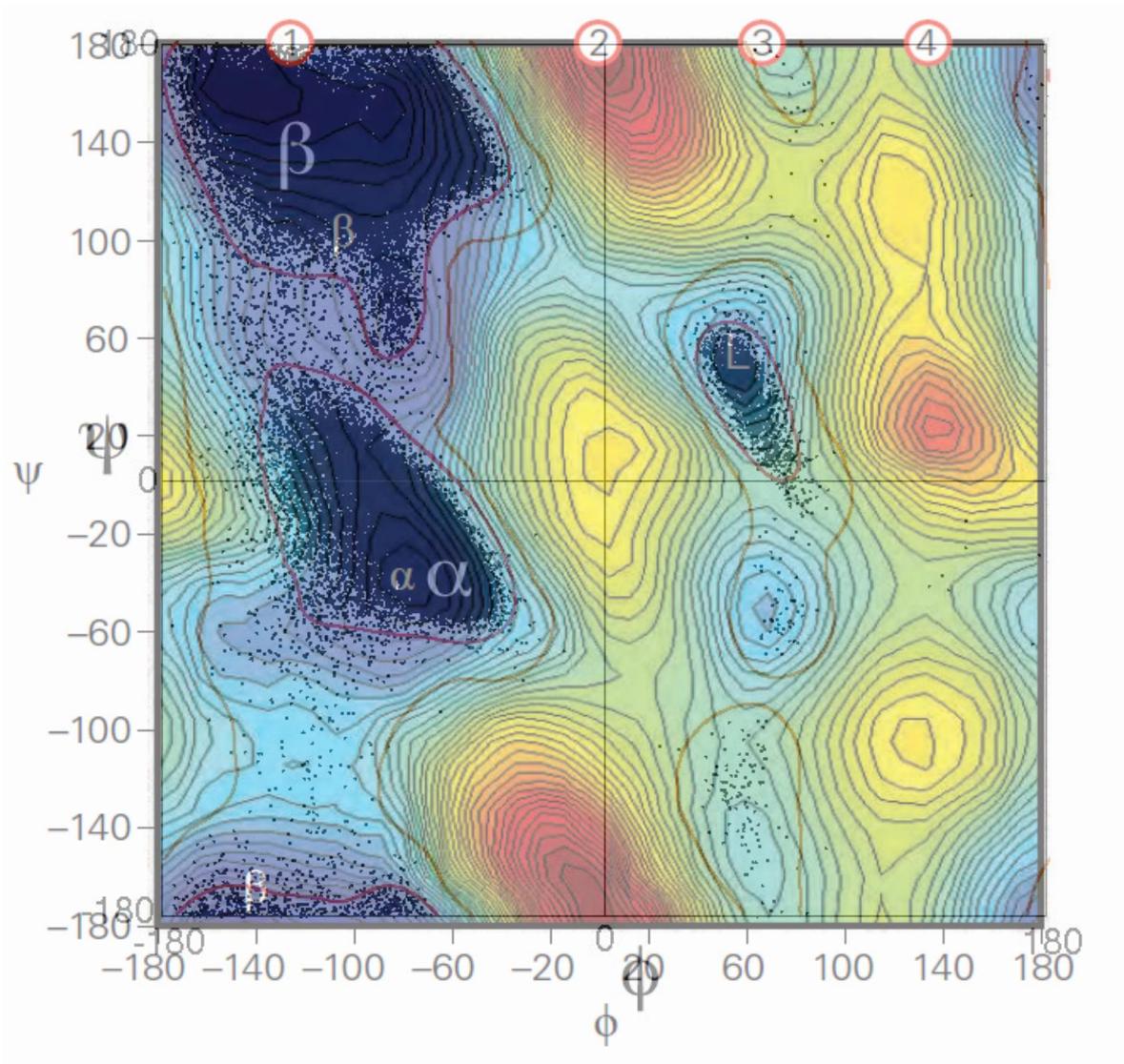


(B)

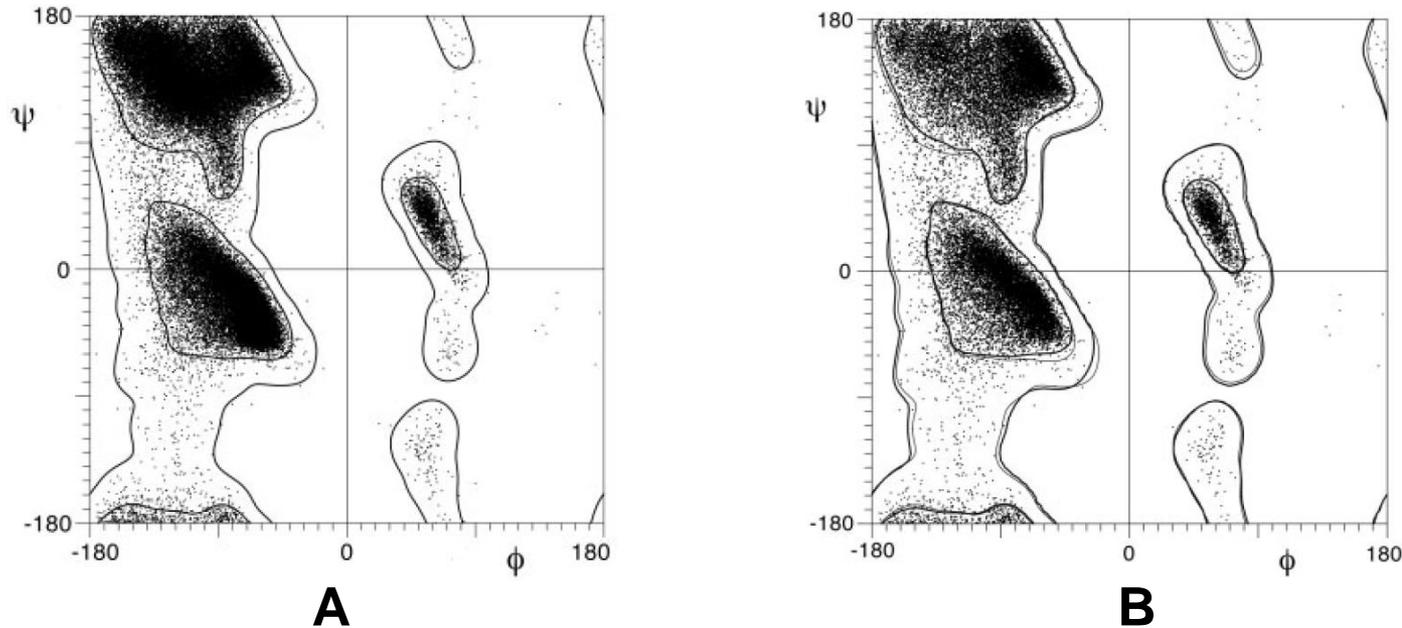
(A) N-acetil-Ala-Ala-amida - simulação por dinâmica molecular para cálculo das energias conformacionais em função dos ângulos de torção. As zonas a escuro são mais estáveis, note-se que os reajustamentos dos ângulos e comprimento de ligações resultam numa zona acessível consideravelmente mais ampla do que aquela que é permitida no modelo de esferas rígidas.

(B) Distribuição dos ângulos torsionais para os resíduos (exceptuando Pro e Gly) de 12 proteínas cuja estrutura de alta resolução foi determinada por cristalografia de raios X. As zonas verdes representam os limites máximos permitidos para os contactos de van der Waals. Embora a maioria dos resíduos caia dentro destas zonas, existe ainda assim um número significativo de resíduos fora destas, em particular na zona (0,-90).





Propriedades conformacionais: restrições locais de flexibilidade



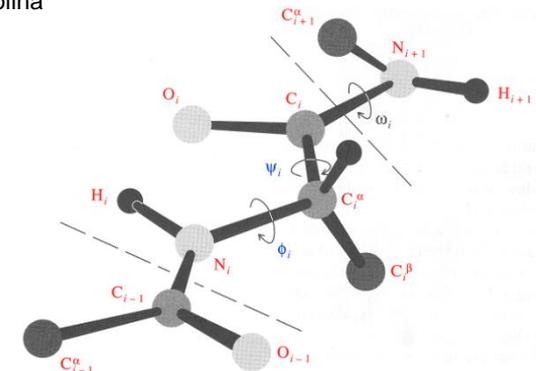
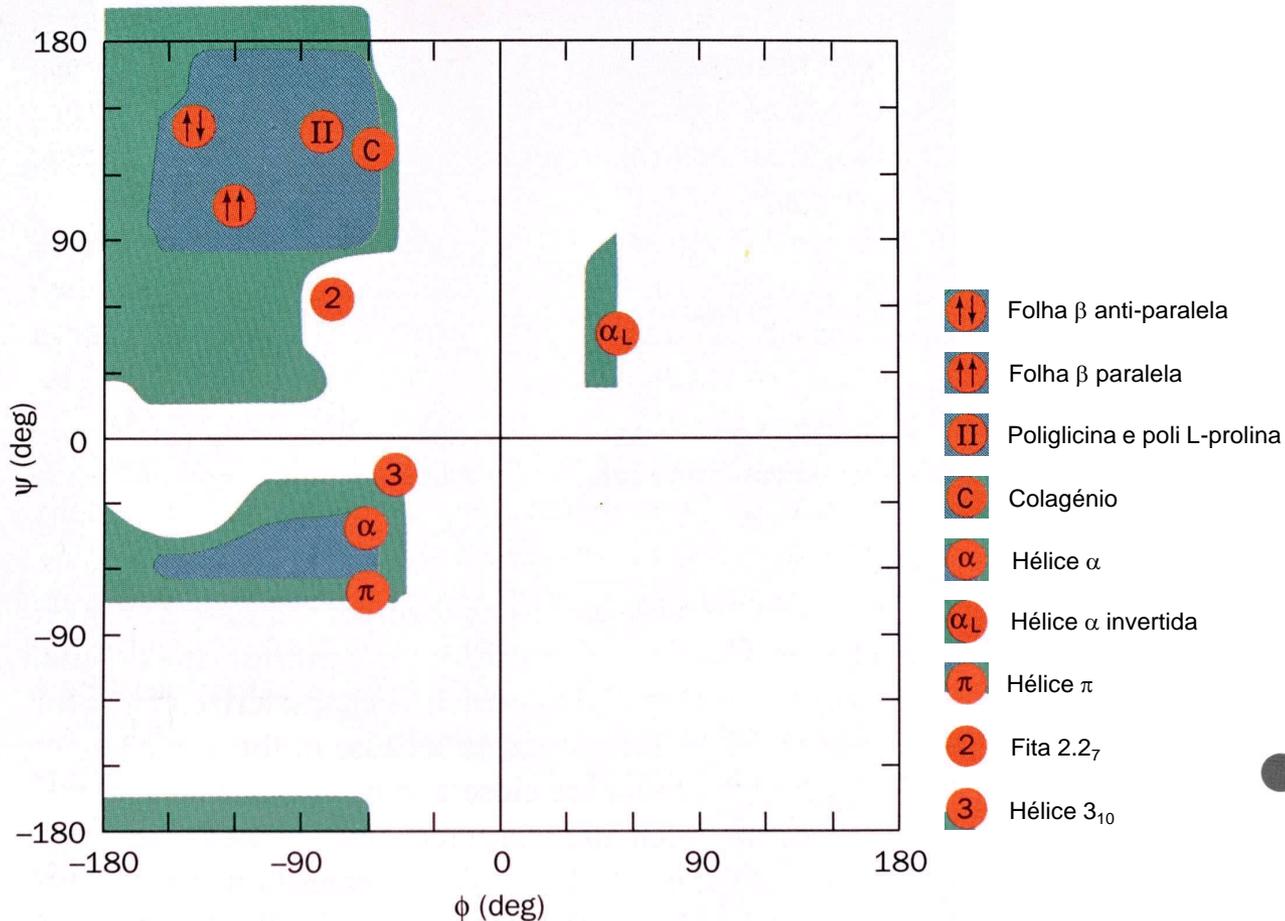
- **A** - conjunto de 500 proteínas, resíduos Gly e Pro não incluídos
- **B** - conjunto de 500 proteínas, apenas resíduos *sem estrutura secundária regular*

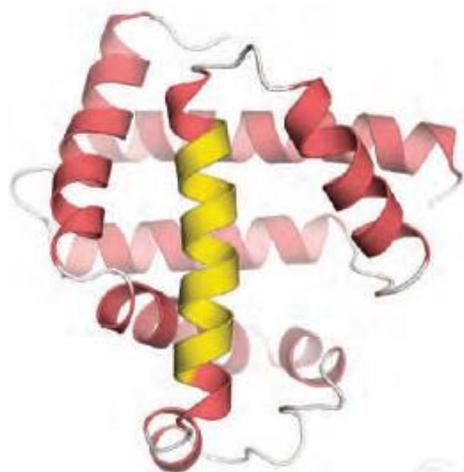
A comparação do diagrama **A** com o diagrama **B** evidencia a predisposição *intrínseca* dos resíduos para assumirem ângulos ϕ e ψ dentro das regiões correspondentes às estruturas α e β . Este facto é, em si mesmo, uma das razões para a predominância destes tipos estrutura secundária.

Observa-se, em **B**, uma maior ocorrência das conformação de poliprolina e hélice 3_{10} (esquerda e direita), pois estas conformações colocam os carbonilos de resíduos sucessivos formando ângulos de $\sim 90^\circ$ entre si - uma geometria típica das mudanças de direcção na cadeia polipeptídica.

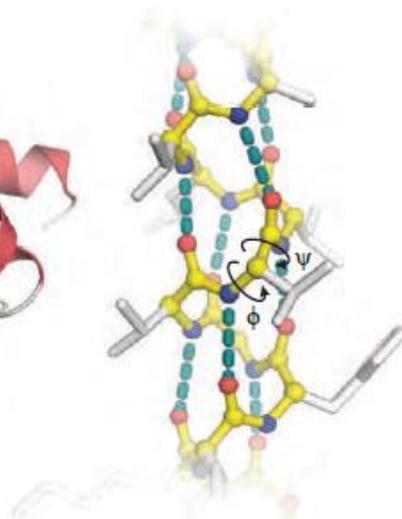
Propriedades conformacionais: padrões repetitivos da estrutura

O efeito estabilizador da cooperação de múltiplas interações fracas torna favorável a ocorrência de estruturas regulares nas cadeias polipeptídicas. Estas estruturas caracterizam-se por valores dos ângulos ϕ e ψ aproximadamente constantes, e por padrões regulares de ligações de hidrogénio, que são uma força importante na sua estabilização.

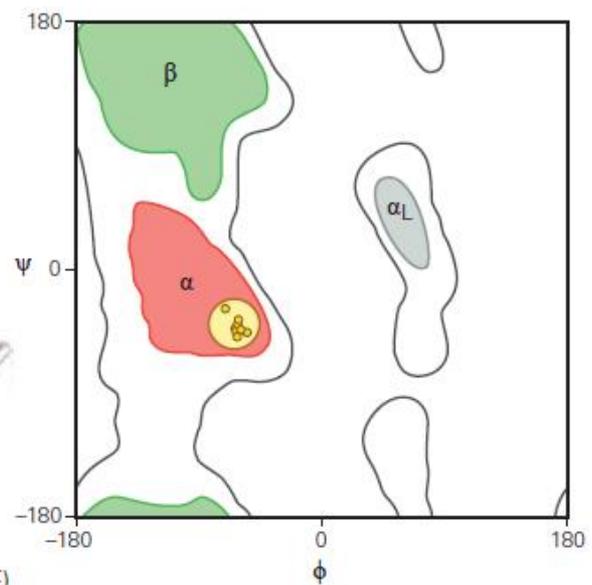




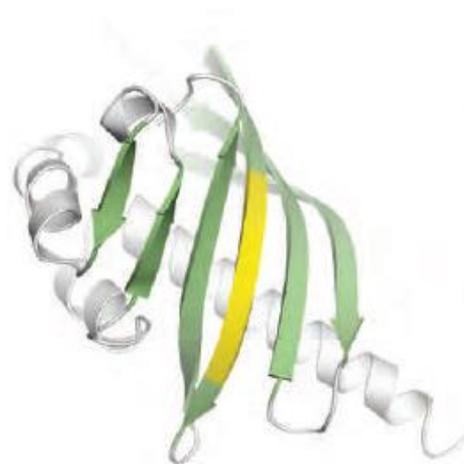
(D)



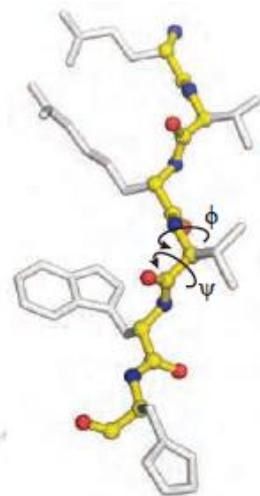
(E)



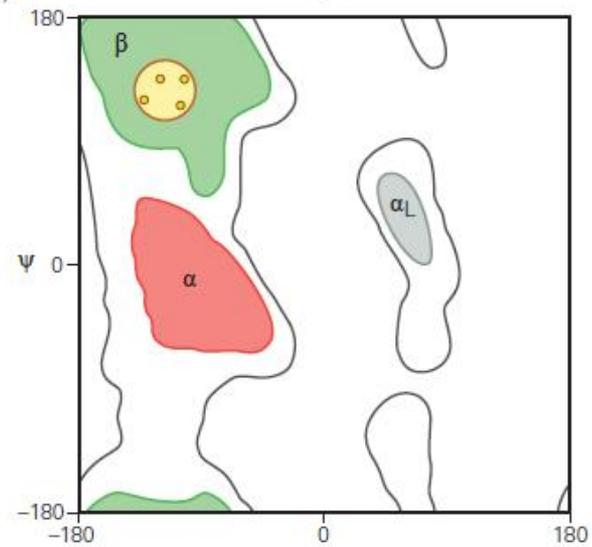
(F)



(D)



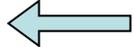
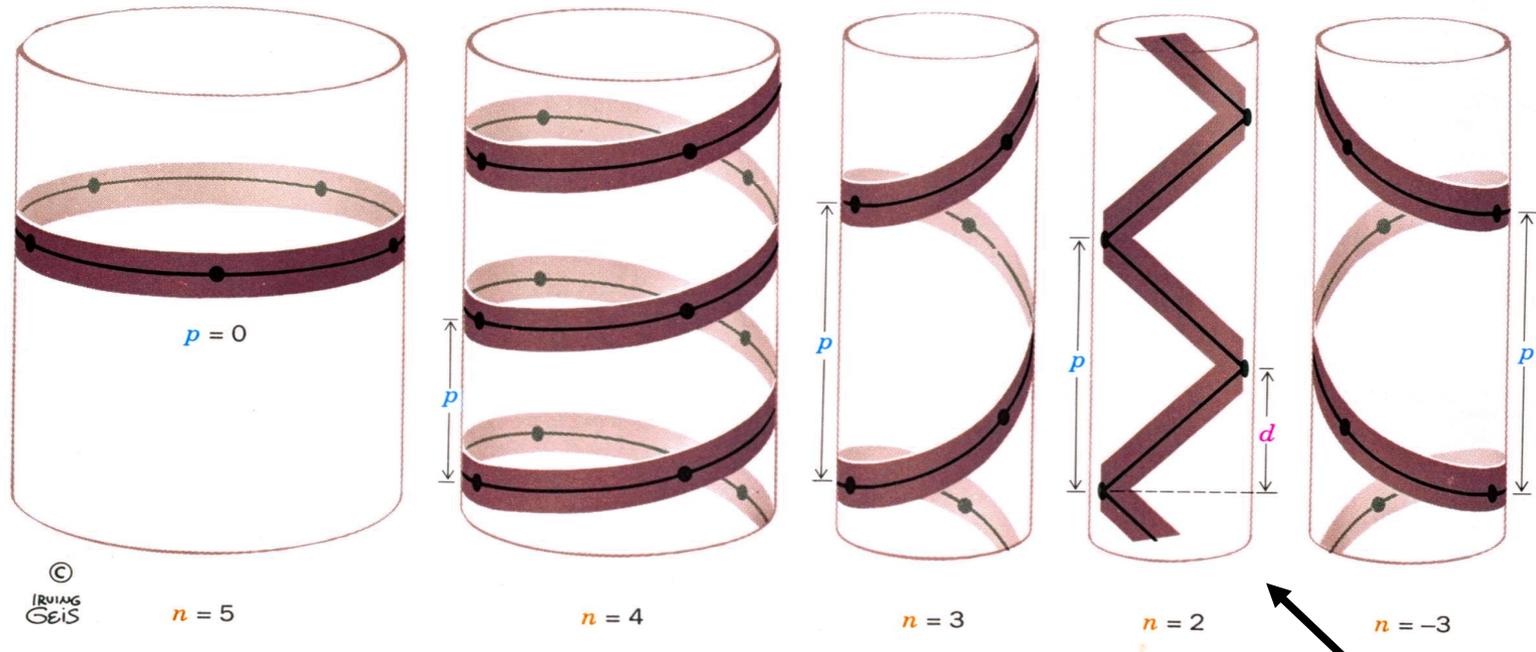
(E)



(F)

Propriedades conformacionais: parâmetros de estruturas helicoidais

As estruturas helicoidais são omnipresentes nas proteínas, particularmente a α -hélice. Caracterizam-se por uma torsão constante em torno dos sucessivos carbonos α , com ângulos ϕ e ψ constantes. Uma hélice pode ser também descrita pelo seu passo p , o número de resíduos por volta n , e a translacção vertical d



Uma hélice direita (*right-handed*) rota no sentido dos dedos de uma mão direita quando avança na direcção do polegar

Uma hélice com $n=2$ é degenerada, sendo de facto uma fita sem quiralidade.

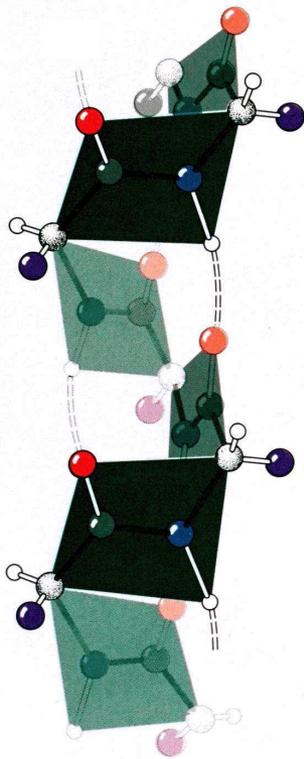
Propriedades conformacionais: estruturas regulares

	ϕ	ψ	ω	Resíduos por volta	Translação por resíduo
Hélice α direita	-57	-47	180	3.60	1.50
Hélice α esquerda	+57	+47	180	3.60	1.50
Folha β antiparalela	-139	+125	-178	2.00	3.40
Folha β paralela	-119	+113	180	2.00	3.20
Hélice 3_{10}	-49	-26	180	3.00	2.00
Hélice π	-57	-70	180	4.40	1.15
Poliprolina I	-83	-158	0	3.33	1.90
Poliprolina II	-78	+149	180	3.00	3.12
Polyglicina II	-80	+150	180	3.00	3.10

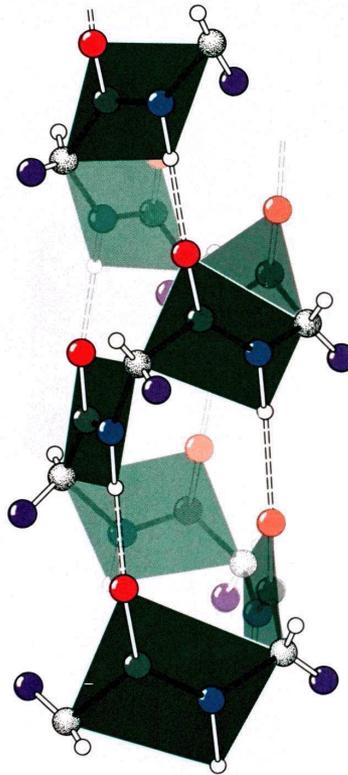
Parâmetros característicos de algumas das estruturas regulares observadas em proteínas.

Propriedades conformacionais: estruturas helicoidais

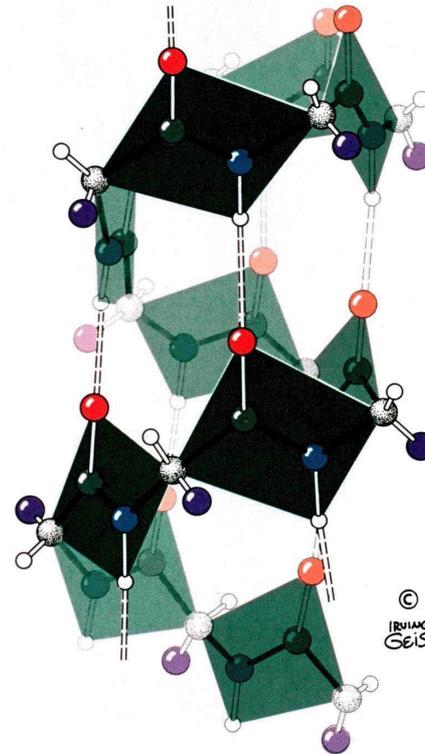
M_N { M - número de resíduos por volta
 N - número de átomos no anel fechado pela ligação de hidrogénio



Hélice 3_{10}

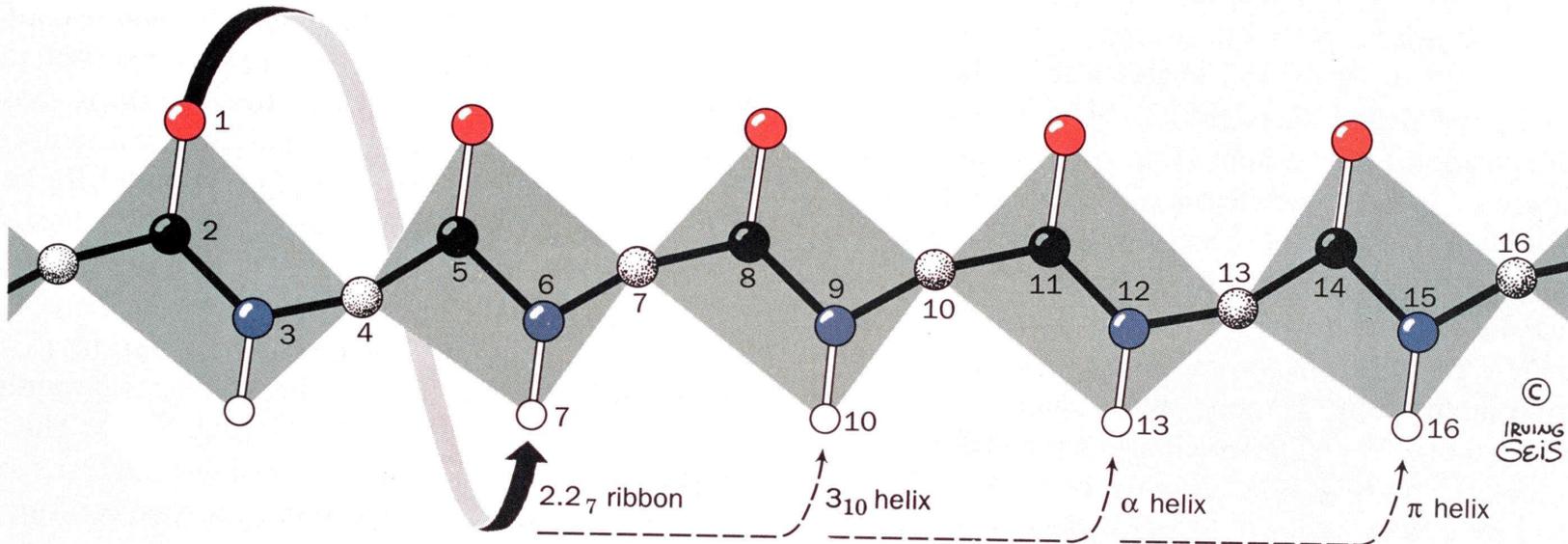


Hélice $3.6_{13}(\alpha)$

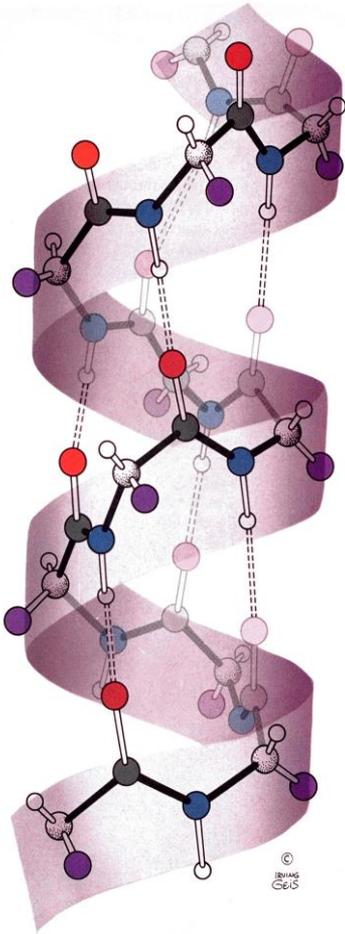


Hélice $4.4_{16}(\pi)$

Estruturas helicoidais



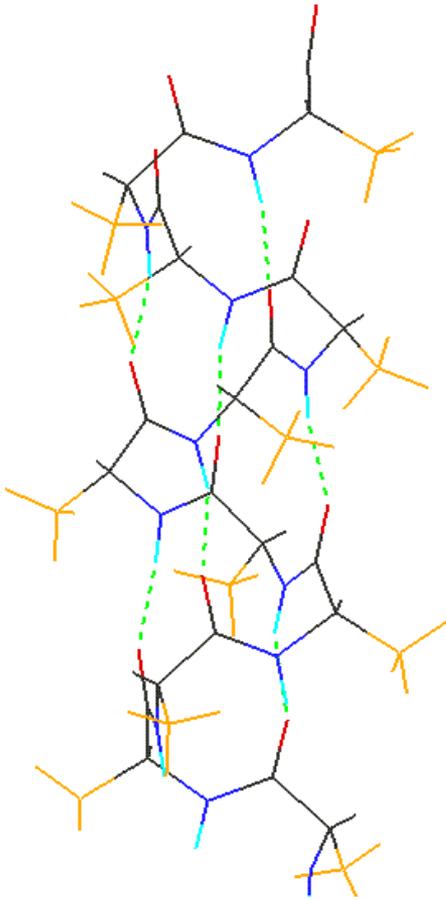
A hélice α



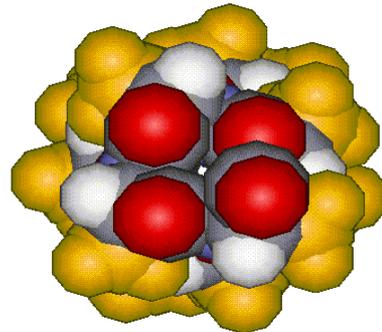
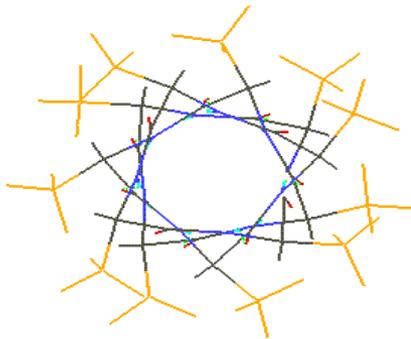
- Proposta em 1951 por L. Pauling and R. Corey para explicar os dados de difracção de raios X de fibras de proteína.
- A hélice α possui um número *não-inteiro* de resíduos por volta (3.6)
- O grupo carbonilo do resíduo na posição i forma uma ligação de hidrogénio com o grupo amina do resíduo na posição $i+4$
- As ligações de hidrogénio possuem uma geometria próxima da ideal.
- O raio da hélice é suficientemente pequeno para permitir a ocorrência de contactos de van der Waals no interior
- As cadeias laterais de cada volta da hélice estão desfasadas em relação às das voltas contíguas, evitando contactos desfavoráveis

A hélice alfa é a estrutura helicoidal mais frequente observada nas proteínas globulares, correspondendo a cerca de 30% dos resíduos nas proteínas de estrutura conhecida. O comprimento médio de uma hélice é aproximadamente 12 resíduos, mas já foram observadas hélices com cerca de 50 resíduos.

A hélice α

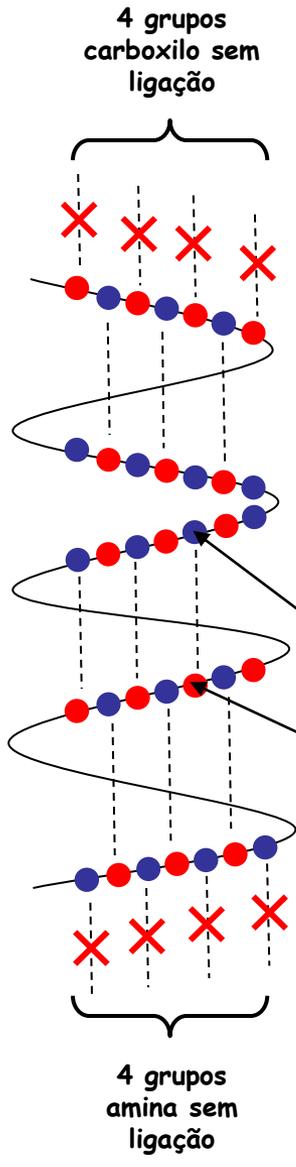


- A geometria ideal da hélice α produz ângulos de torção $\phi = -57.8$, $\psi = -47.0$, passo = 5.4 \AA e elevação por resíduo = 1.5 \AA
- Os valores observados para ϕ e ψ em proteínas "reais" são respectivamente -64 ± 7 e -41 ± 7 (valores médios para um grande conjunto de estruturas). Os desvios observados permitem ajustamentos no comprimento e linearidade da hélice
- A conformação de hélice α "esquerda" ocorre quase sempre apenas para resíduos isolados (geralmente Gly), porque as cadeias laterais colidem com o corpo da hélice.
- Os resíduos apresentam diferentes preferências para a ocorrência numa hélice α - a Ala mostra a preferência mais marcada.



O interior das hélices α é densamente empacotado, daí resultando extensos contactos de van der Waals que contribuem para a estabilização da estrutura

"Capping" de hélices



Dado que cada resíduo i da hélice α forma uma ligação de hidrogénio com um resíduo $i+4$, existem quatro grupos amina no extremo N da hélice e quatro no extremo C com ligações por satisfazer. Verifica-se que estas ligações são normalmente satisfeitas por grupos polares ocorrendo nos extremos da hélice, e observam-se preferências específicas para as regiões que flanqueiam os terminais da hélice. Normalmente usa-se a seguinte nomenclatura:

$N'''-N''-N'-N_{cap}-N1-N2-N3-\dots-C3-C2-C1-C_{cap}-C'-C''-C'''$

sendo N_{cap} e C_{cap} o primeiro e último resíduos da hélice.



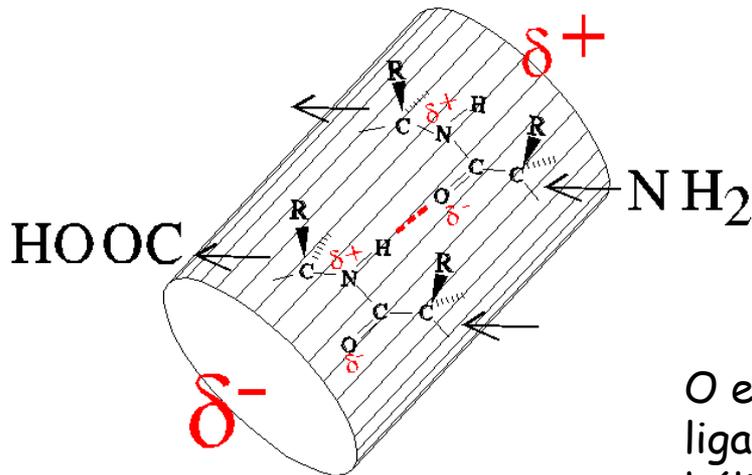
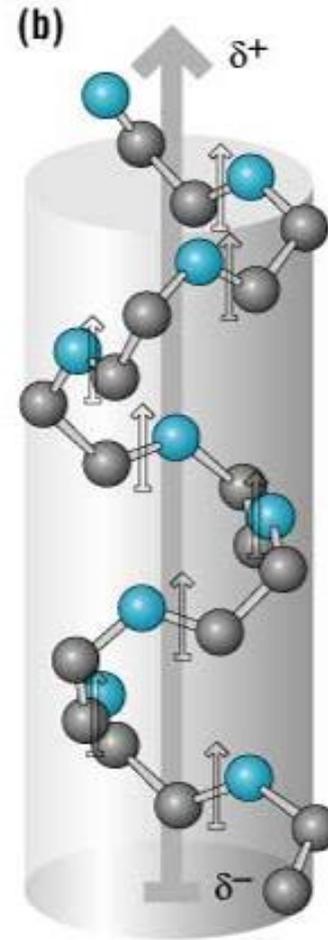
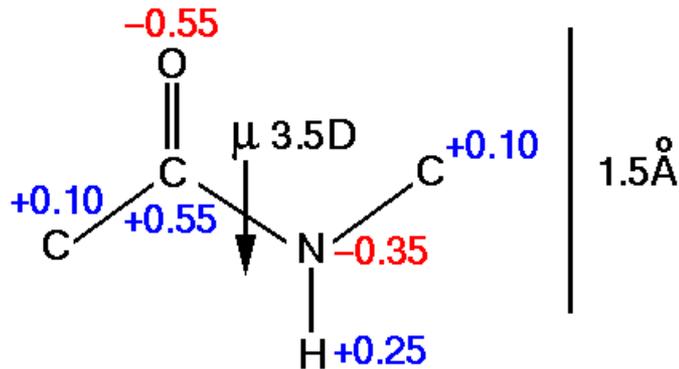
"Capping" de hélices

Numa análise das regiões de terminais de hélices de 12 proteínas observaram-se as seguintes preferências posicionais:

AA	N _{cap}	N1	N2	N3	C3	C2	C1	C _{cap}	C'
Pro		■							
Gly	■							■	
Ser	■								
Thr									■
Asn	■								
Gln							■		
Asp	■		■	■					
Glu		■	■	■					
Lys					■	■	■		
Arg						■			

É clara a tendência para a ocorrência de resíduos carregados negativamente no N-terminal e de resíduos carregados positivamente no C-terminal. Porquê ?

Macrodiplolo das hélices alfa



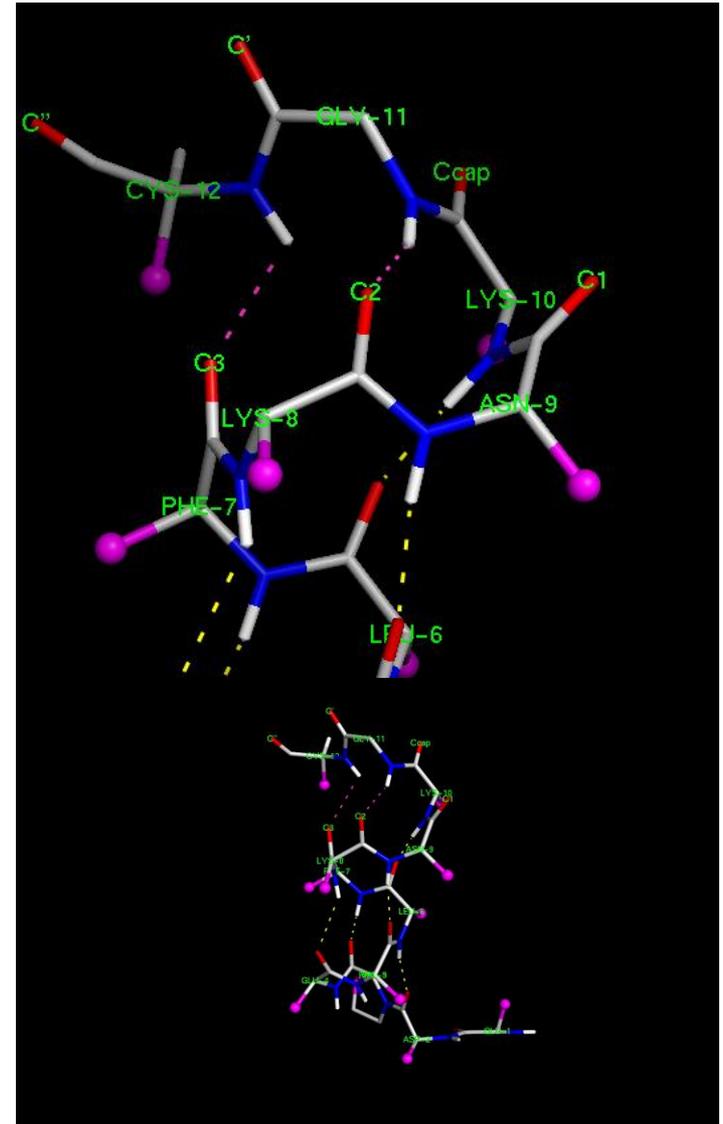
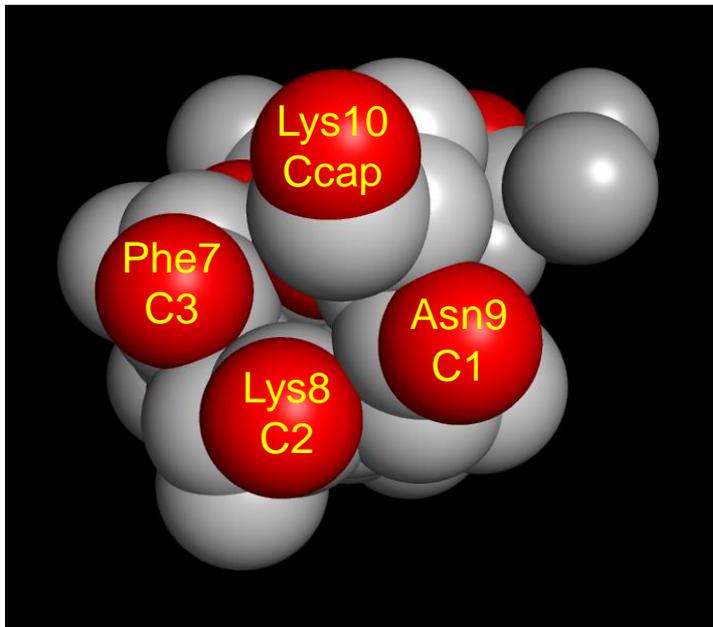
O efeito combinado dos momentos dipolares das ligações peptídicas gera um dipolo global para a alfa-hélice que corresponde ter $+0.5e$ no N-terminal e $-0.5e$ no C-terminal

Capping do C-terminal: motivo de Schellman

•C-terminal

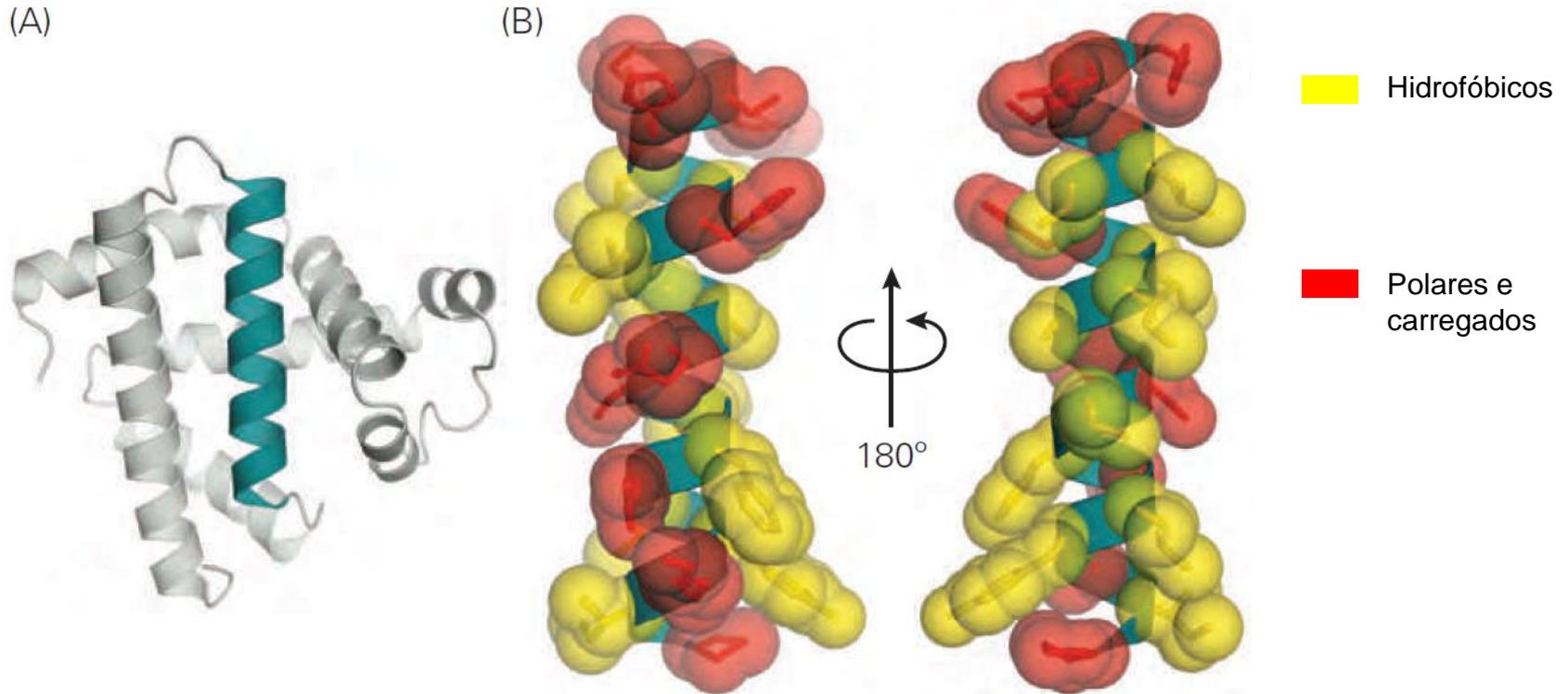
Um terço de todas as hélices alfa apresentam um motivo de capping do C-terminal contendo Gly.

No chamado **motivo de Schellman**, o grupo amida de C'' forma uma ligação com C3 e o grupo C' com C2. No motivo **alpha-L** o grupo C' forma a ponte de hidrogênio com o carbonilo de C3. Em qualquer uma das situações o resíduo C' é forçado a adotar uma conformação em hélice alfa invertida, o que justifica a frequência com que Gly ocorre nesta posição.

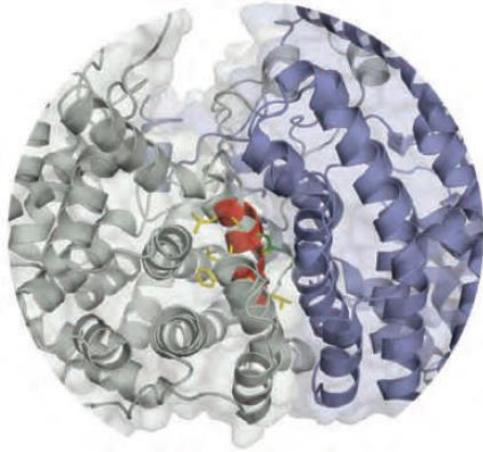


Motivo de Schellman no citocromo c551

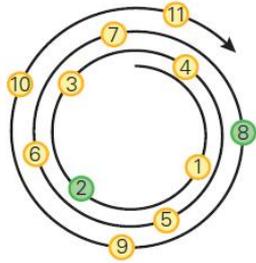
Hélices anfipáticas



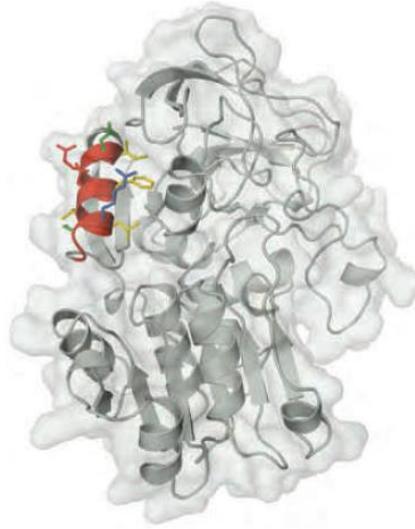
As α -hélices formam-se muito frequentemente ao longo da superfície das proteínas globulares, tendo uma face exposta ao solvente e uma face oculta. A face exposta apresenta-se geralmente mais rica em resíduos de aminoácido **polares**, enquanto que a face oculta é mais rica em resíduos não polares.



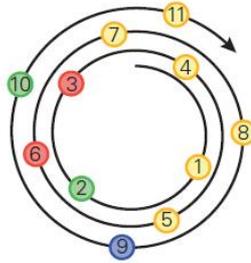
- L S F A A A M N G L A -



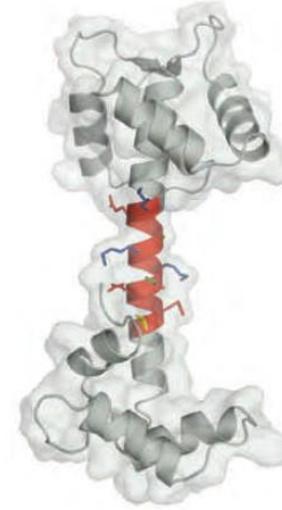
Hélice apolar



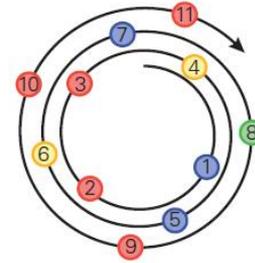
- I N E G F D L L R S G -



Hélice anfipática

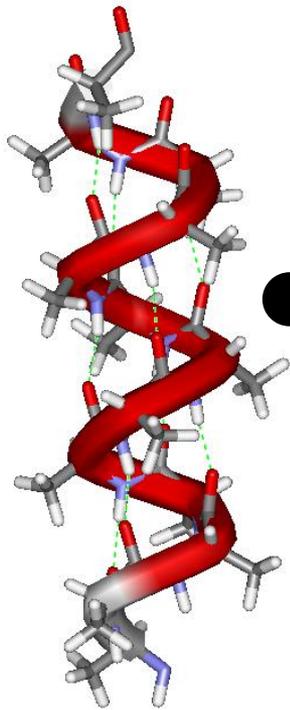


- K E D A K G K S E E E -

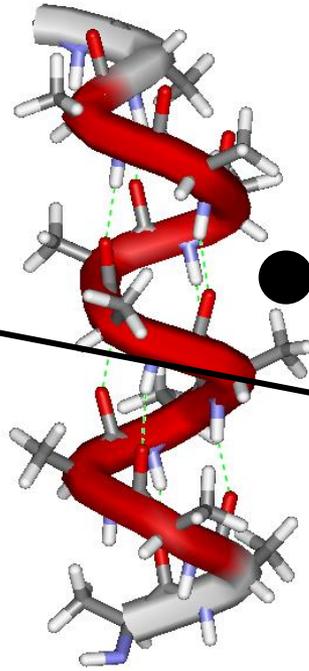


Hélice polar

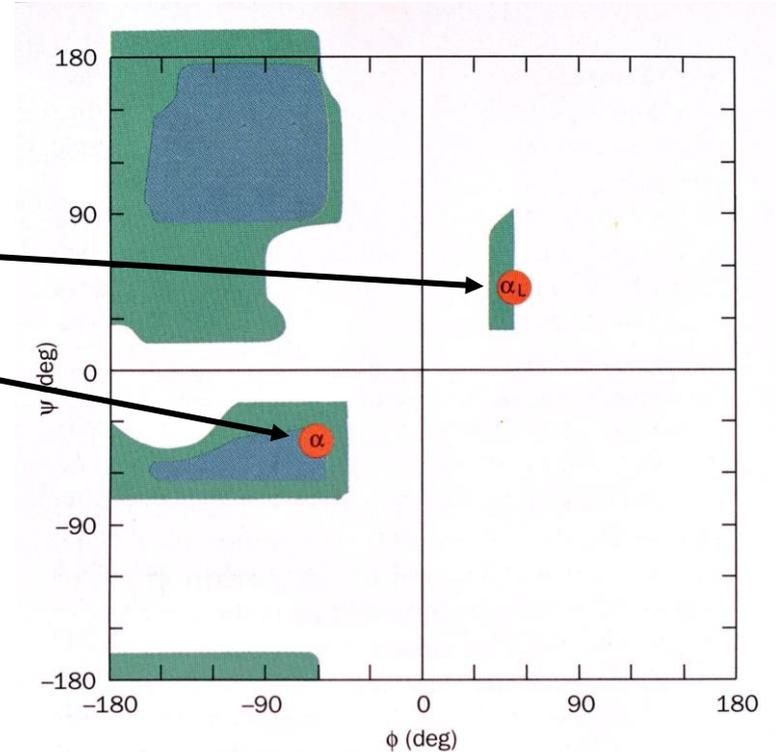
Hélice α direita versus esquerda



Hélice α "direita"

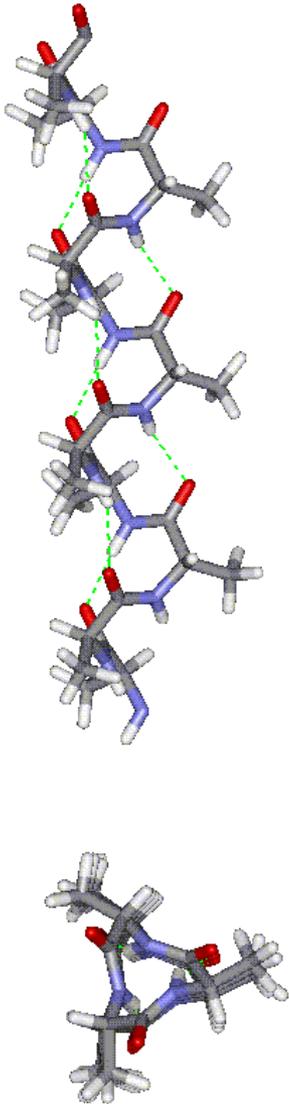


Hélice α "esquerda"



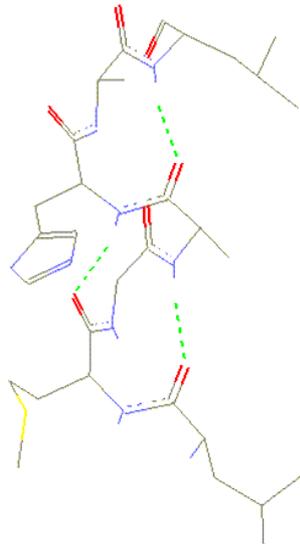
A conformação em hélice α invertida ou "esquerda" não ocorre em mais que dois ou três resíduos sucessivos porque as cadeias laterais estão demasiado próximas do corpo da hélice, deixando pouco espaço para os resíduos mais volumosos. Além disso, a zona correspondente do diagrama de Ramachandran é ligeiramente menos estável que a da hélice "direita".

A hélice 3_{10}



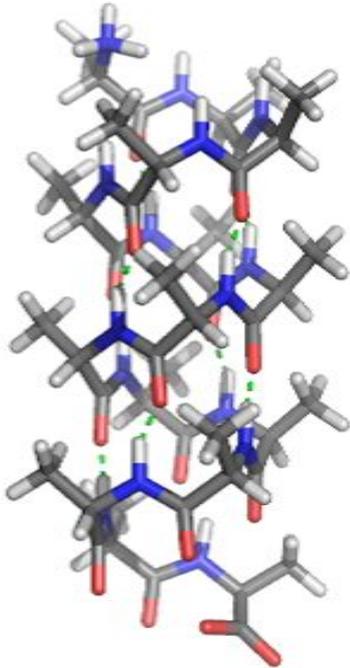
A hélice 3_{10} ocorre raramente em proteínas globulares, e quase sempre em segmentos curtos, o que pode ser compreendido tendo em conta que:

- As ligações de hidrogénio tem uma geometria pouco favorável (grupos carbonilo desviados cerca de 30° em relação à colinearidade dos dipolos)
- As cadeias laterais em voltas sucessivas da hélice ocorrem em posições idênticas, dando origem a contactos desfavoráveis para resíduos mais volumosos
- A hélice 3_{10} apresentam ângulos característicos ϕ e ψ numa zona apenas *marginalmente* estável do diagrama de Ramachandran



Uma das hélices 3_{10} mais longas em proteínas de estrutura conhecida:
7 resíduos na citocromo c peroxidase

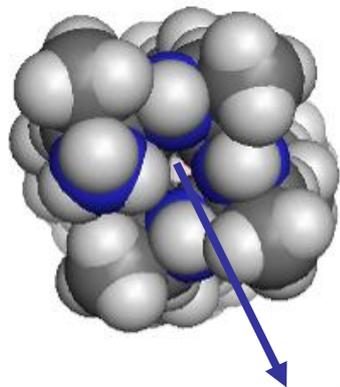
A hélice π



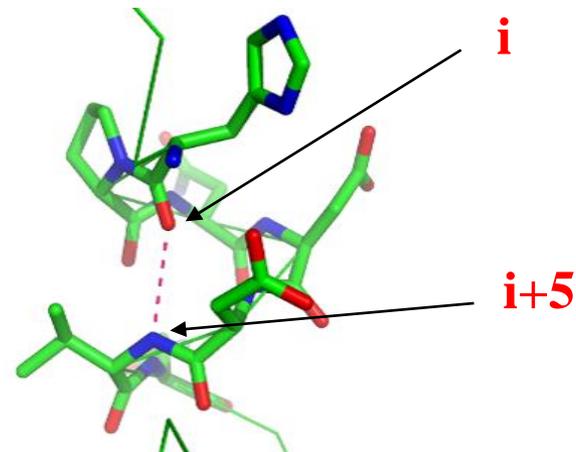
A hélice π é uma conformação muito raramente observada em proteínas, isto porque

- o eixo da hélice π é oco, não tendo espaço para acomodar moléculas de água, diminuindo a estabilização pelas forças dispersivas
- Os ângulos de torção característico da hélice π ($\phi = -57$ e $\psi = -70$) correspondem a uma zona do diagrama de Ramachandran *marginalmente estável*

Num estudo recente (2000) foram identificadas 8 hélices π nunca com comprimento superior a 1.5 voltas. Em todos os casos existe correlação entre a presença deste tipo de estrutura e a função da proteína



Espaço vazio



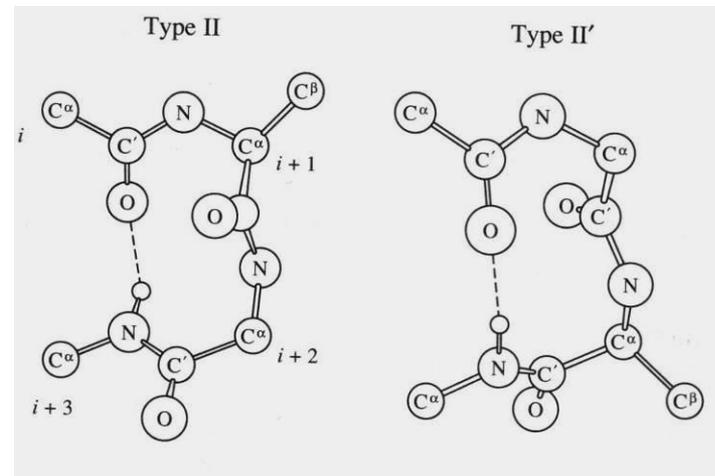
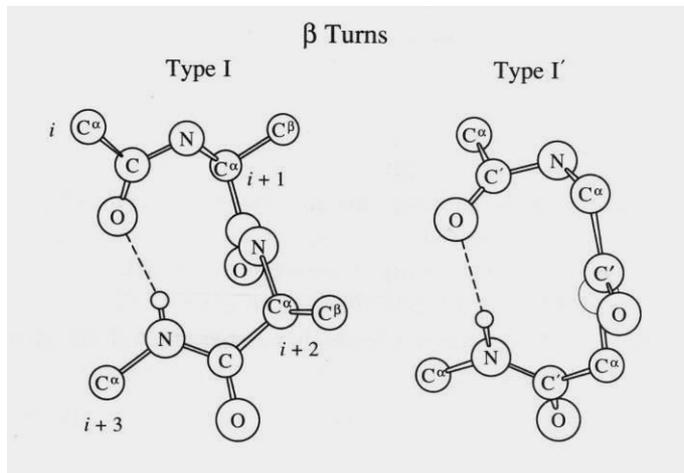
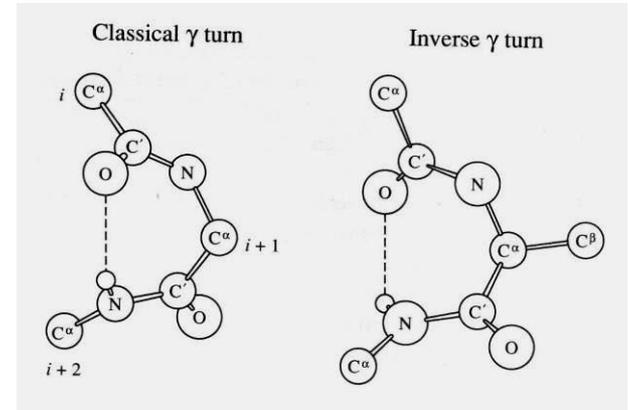
Hélice π na fumarase C

Propriedades conformacionais: "turns"

As voltas, ou "reverse turns", são a terceira estrutura mais observada em proteínas, depois da hélice α e da cadeia β . Os turns são classificados de acordo com padrão de ligações de hidrogénio:

- ($i \rightarrow i+2$): γ turn
- ($i \rightarrow i+3$): β turn
- ($i \rightarrow i+4$): α turn
- ($i \rightarrow i+5$): π turn

Os "turns" de tipo β são de longe os mais frequentes.



Classificação de turns

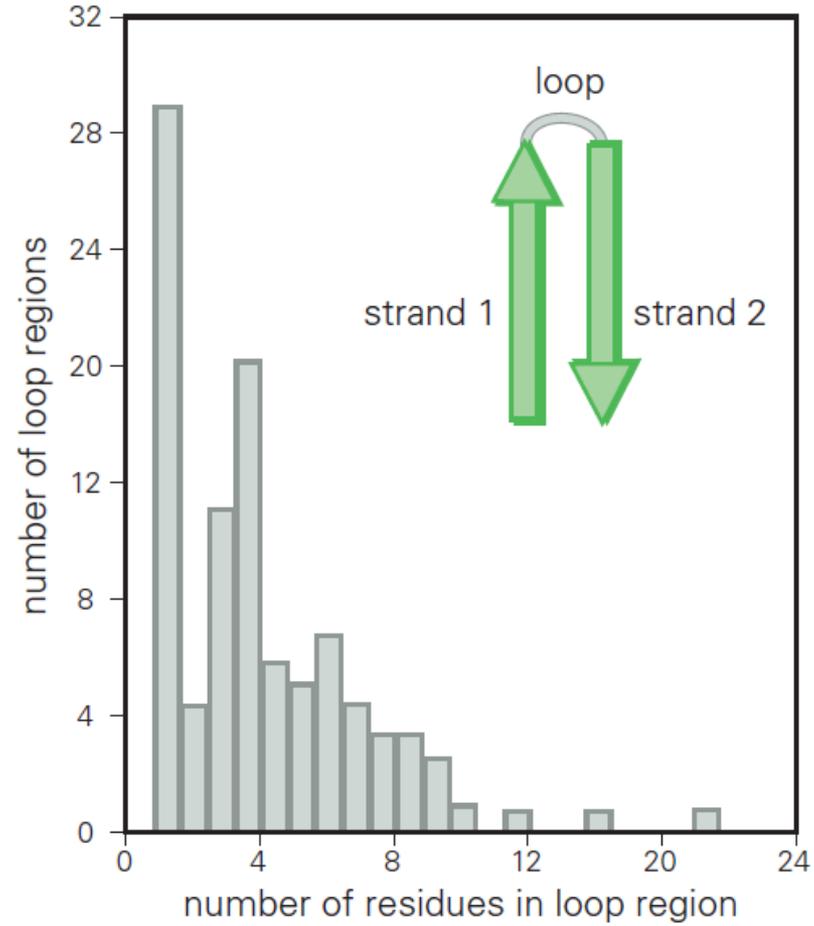
Dihedral Angles of Central Residues (deg) ^a				
Bend type	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
γ				
classical	70 to 85	-60 to -70		
inverse	-70 to -85	60 to 70		
β				
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	30	60	30
IV	Any bend with two or more angles differing by $> 40^\circ$ from those given here			
V	-80	80	80	-80
V'	80	-80	-80	80
VIa ^b	-60	120	-90	0
VIb ^b	-120	120	-60	0
VII	Kink in chain created by $\psi_2 \approx 180^\circ$, $ \phi_3 < 60^\circ$; or $ \psi_2 < 60^\circ$, $\phi_3 \approx 180^\circ$			
VIII	-60	-30	-120	120

^a The central residue of a γ turn is numbered $i + 2$; the two central residues of a β turn are $i + 2$ and $i + 3$.

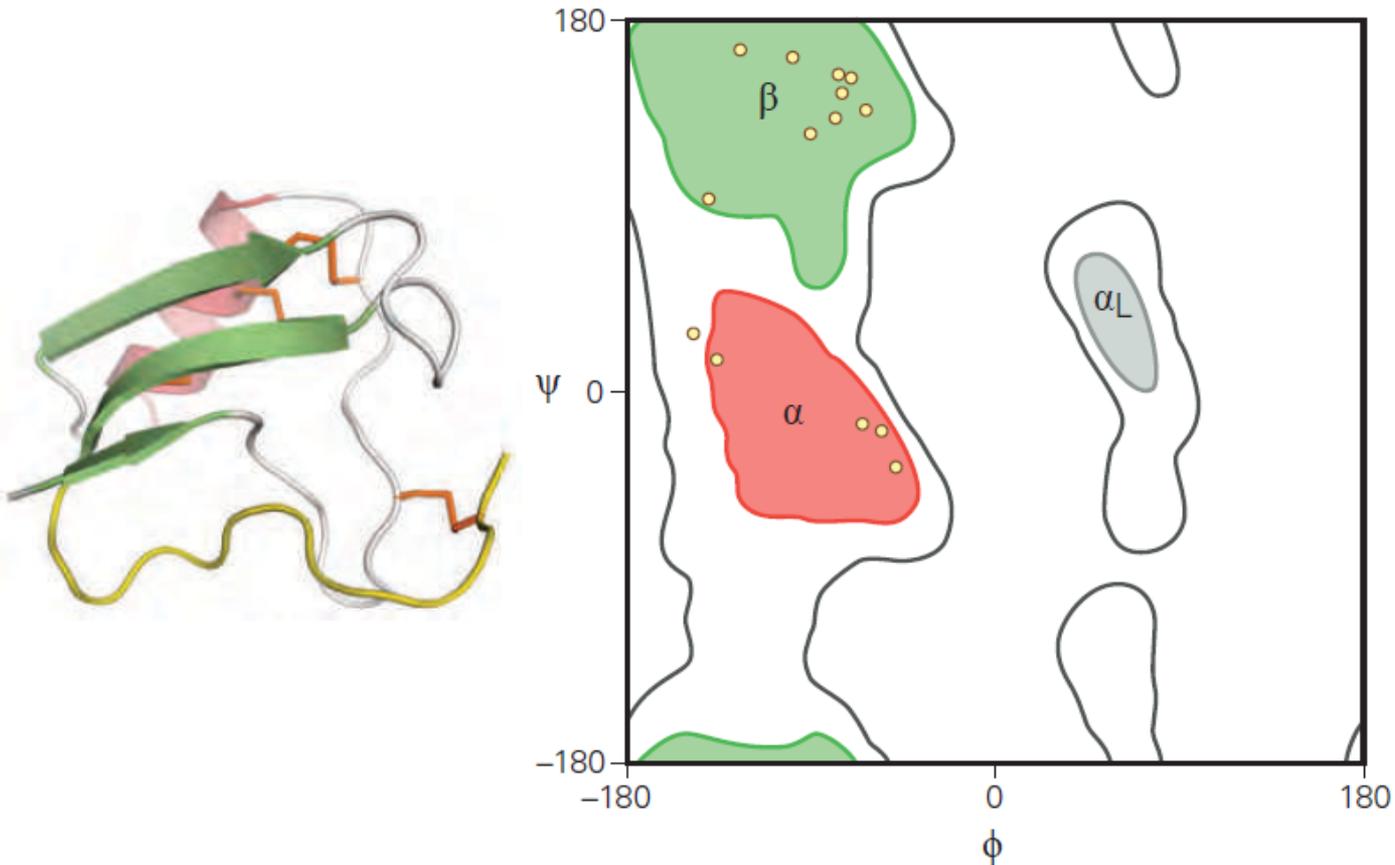
^b The peptide bond between residues $i + 1$ and $i + 2$ is *cis*, and residue $i + 2$ is Pro.

Data from P. Y. Chou and G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* 115:135–175 (1977); C. M. Wilmot and J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* 203:221–232 (1988); J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* 34:167–339 (1981).

β -Loops



Loops e turns: distribuição de ϕ e ψ



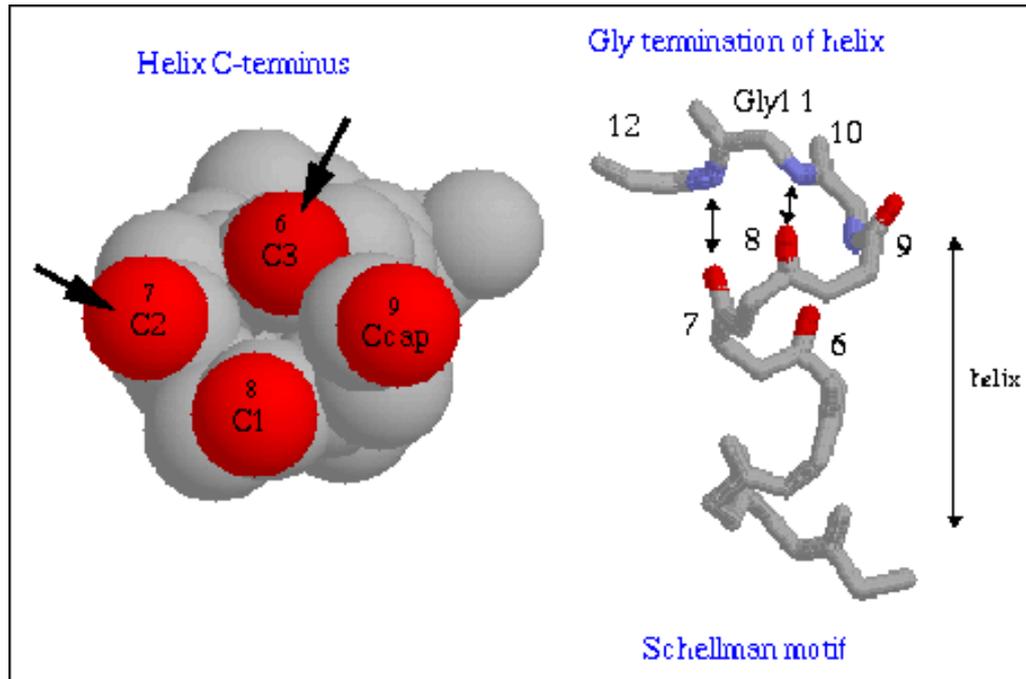
Embora os valores de ϕ e ψ de *loops* e *turns* caiam geralmente dentro das zonas permitidas do diagrama de Ramchandran, observa-se uma muito maior dispersão dos valores observados quando comparados com as regiões de estrutura secundária regular.

Capping do C-terminal: motivo de Schellman

•C-terminal

Cerca de um terço de todas as hélices alfa apresentam um motivo de capping do C-terminal contendo Gly.

No chamado **motivo de Schellman**, o grupo amida de C' forma uma ligação com C3 e o grupo C' com C2. No motivo **alpha-L** o grupo C' forma a ponte de hidrogénio com o carbonilo de C3. Em qualquer uma das situações o resíduo C' é forçado a adoptar uma conformação em hélice alfa invertida, o que justifica a frequência com que Gly ocorre nesta posição.



Exemplo do motivo de Schellman. Os quatro carbonilos livres Ccap, C1, C2 e C3 são representados a vermelho, os azotos amídicos de C' e C'' a azul e as ligação de hidrogénio do motivo por setas.