



Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη αναδίπλωσης ενός πεπτιδίου προερχόμενο από την πρωτεΐνη Αβ»

Χατζηστυλιανού Παναγιώτα (ΑΕΜ 1395)

Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Μ. Γλυκός

Αλεξανδρούπολη, Σεπτέμβριος 2017

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νικόλαο Μ. Γλυκό, για τον καταλυτικό ρόλο που είχε στην πραγμάτωση και ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας. Όχι μόνο ήταν διαθέσιμος για οποιαδήποτε απορία είχα, αλλά ήταν και πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει να κατανοήσω περισσότερα πράγματα, οπλισμένος με υπομονή και ανοχή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του NMG γκρουπ, τόσο αυτά που έχουν αποφοιτήσει πλέον από τη σχολή, κυρίως τη Φυλλίνα Αδαμίδου, αλλά και αυτά που είναι ακόμα ενεργά, για τη βοήθεια που προσέφεραν απλόχερα όποτε χρειάστηκα.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους φίλους μου, που αποτελούν τη δεύτερη οικογένειά μου. Ευχαριστώ, λοιπόν όλους όσους ήταν μαζί μου στη διαδρομή αυτή από την αρχή, αυτούς που ήρθαν ή έφυγαν στην πορεία και αυτούς από τους οποίους έφυγα εγώ. Ευχαριστώ που σταθήκατε και στέκεστε πλάι μου και για όλες τις όμορφες στιγμές που με κάνουν να ξεπερνώ τις δυσκολίες. Κάνατε αυτά τα χρόνια λίγο πιο φωτεινά για εμένα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που για 22 χρόνια είναι στο πλευρό μου, με στηρίζουν σε κάθε μου απόφαση και πιστεύουν σε εμένα όσο κανένας άλλος. Είμαι ευγνώμων στους γονείς μου, Σπύρο και Σοφία, που προσπαθούν να πραγματοποιήσουν όλες μου τις επιθυμίες, αλλά και στον αδερφό μου, Βαγγέλη, που είναι πάντα εκεί σαν αδερφός και σαν φίλος. Έχουν συνεισφέρει στη μέχρι στιγμής πορεία μου και ένα μεγάλο μέρος της οφείλεται σε αυτούς.

Υπόσχομαι, λοιπόν, σε όλους αυτούς τους ανθρώπους να χρησιμοποιήσω όλα όσα μου προσέφεραν, να τους κάνω τις μέρες λίγο πιο φωτεινές, και ελπίζω μια μέρα να τους κάνω υπερήφανους.

Σας ευχαριστώ όλους.

Περιεχόμενα

	Σελίδα
Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.1. Πρωτεϊνική αναδίπλωση	8
1.2. Πρόβλημα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης	8
1.3. Μοντέλα αναδίπλωσης πρωτεϊνών	8
1.4. Πειραματικές προσεγγίσεις (για την επίλυση του προβλήματος αναδίπλωσης πρωτεϊνών)	13
1.5. Υπολογιστικές προσεγγίσεις (για την επίλυση του προβλήματος αναδίπλωσης πρωτεϊνών)	13
1.6. Χρήση πεπτιδίου στην αναδίπλωση πρωτεϊνών	15
1.7. Το πεπτίδιο Αβ	15
1.8. Στόχος παρούσας εργασίας	19
2. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής	20
2.1. Εισαγωγή στις προσομοιώσεις	21
2.1.1. Στατιστική Μηχανική	22
2.1.2. Μοριακή Μηχανική	23
2.1.3. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής	24
2.1.4. Δυναμικά Πεδία	27
2.1.5. AMBER	28

2.1.6. Διαλύτης	29
2.2. Προσομοιώσεις	31
2.2.1. Τεχνικά χαρακτηριστικά για προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής	31
2.2.2. Έναρξη προσομοιώσεων με NAMD	32
2.2.3. Προετοιμασία συστήματος και στάδια προσομοίωσης	36
3. Αποτελέσματα	40
3.1. Εισαγωγή	41
3.2. Πίνακας RMSD και ανάλυση	41
3.3. Ανάθεση δευτεροταγούς δομής	44
3.4. Αναλύσεις με βάση τη θερμοκρασία	47
3.5. Ανάλυση ομαδοποίησης (Cluster Analysis) και Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis)	50
3.6. NOEs	55
3.7. Χημικές μετατοπίσεις (Chemical Shifts)	61
4. Συζήτηση	70
5. Βιβλιογραφία	77

Περίληψη

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αποτελούν μια υπολογιστική μέθοδο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την επίλυση του προβλήματος αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία ερευνάται η ικανότητα της υπολογιστικής μεθόδου των προσομοιώσεων να αναπαράγει τα πειραματικά αποτελέσματα για το πεπτίδιο Αβ₁₇₋₃₄. Το πεπτίδιο Αβ ανήκει στις intrinsically disordered proteins (IDPs) και σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου Alzheimer. Συνήθως έχει μήκος 39-43 αμινοξέα και η αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε στην προσομοίωση της παρούσας εργασίας είναι η εξής: ${}_{17}LVFFAEDVGSNKGAIIGL_{34}$. Το πεπτίδιο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον ως προς τη διαμόρφωσή του, καθώς αποτελέσματα από NMR και προσομοίωσης μοριακής δυναμικής παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε για την εξέταση της δομής του Αβ₁₇₋₃₄ και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με πειραματικά δεδομένα. Τα αποτελέσματα από την προσομοίωση μοριακής δυναμικής αποκλίνουν από τα πειραματικά αποτελέσματα, καθώς το πεπτίδιο της προσομοίωσης φαίνεται να υιοθετεί διαμόρφωση που δεν περιλαμβάνει σταθερές (σε σχέση με το χρόνο) α-έλικες, αλλά στροφές για το μεγαλύτερο μέρος της προσομοίωσης καθώς και δύο β πτυχωτές επιφάνειες για μικρά χρονικά διαστήματα. Τέλος, τα NOEs και τα χημικές μετατοπίσεις που παράχθηκαν από την προσομοίωση δε φαίνεται να συμφωνούν με τα πειραματικά δεδομένα.

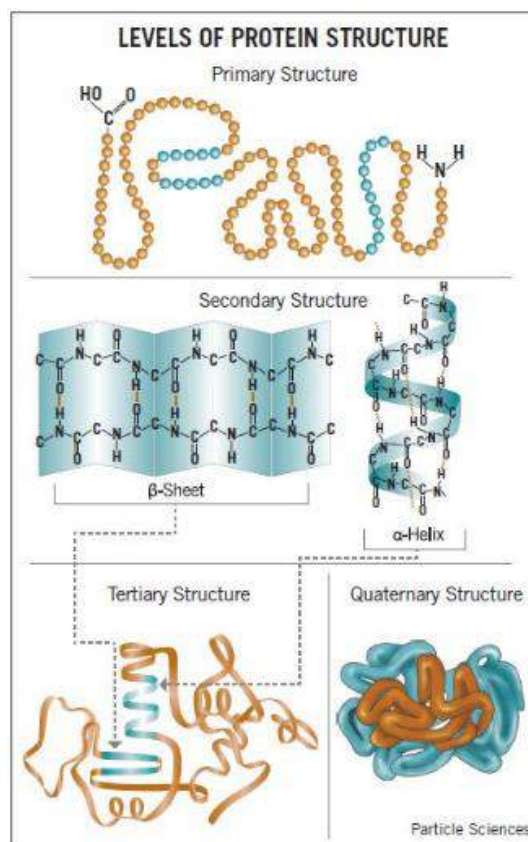
Abstract

Molecular dynamics simulations are a widely used computational method for resolving the protein folding problem. In the present thesis, it is examined the capability of this computational method to reproduce experimental data for the A β ₁₇₋₃₄ (Amyloid beta) peptide. Amyloid beta peptide belongs to intrinsically disordered proteins (IDPs) and is associated with the Alzheimer's disease. The usual length of A β is between 39-43 residues and the sequence that was used in the molecular dynamic simulation is the following: ₁₇ LVFFAEDVGSNKGAIIGL₃₄. The most interesting thing about this peptide is its structure, as experimental data from both NMR and simulations exhibit heterogeneity. The molecular dynamic simulation was conducted in order to examine the structure of A β ₁₇₋₃₄ and then, to compare the results with experimental data. The results from molecular dynamic simulation diverge from the experimental ones, as the peptide that was derived from the simulation seems to have no steady helices in its structure. It is observed that the peptide, for the major part of the simulation, seems to have turns. For three distinct points, the peptide seems to have two β -strands, too. Lastly, NOEs and chemical shifts that were derived from the simulation do not seem to match with the experimental data analysis.

1. Εισαγωγή

1.1. Πρωτεϊνική αναδίπλωση

Πρωτεϊνική αναδίπλωση είναι η διεργασία κατά την οποία μια πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται στη σωστή τριτοταγή δομή, έτσι ώστε να καταλήξει στη βιολογικά ενεργή, φυσική κατάσταση (native state). Οι πρωτεΐνες αποτελούν θεμελιώδη μόρια για τους οργανισμούς και ο ρόλος τους είναι είτε δομικός είτε λειτουργικός. Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από αμινοξέα τα οποία ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο μια γραμμική αλυσίδα. Η σωστή αλληλουχία των αμινοξέων αλλά και η σωστή τριτοταγής δομή απαιτούνται για να είναι μια πρωτεΐνη λειτουργική. Τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια μπορεί να αναδιπλώνονται αυθόρμητα στη φυσική τους δομή ή να χρειάζονται τη βοήθεια ενζύμων (πχ. καταλυτικά ένζυμα που δημιουργούν και ανταλλάσσουν δισουλφιδικούς δεσμούς, σαπερόνες κ.ά). Στην *in vitro* αναδίπλωση, όταν οι συνθήκες είναι οι κατάλληλες, η πρωτεΐνη καταλήγει από ένα τυχαίο σπείραμα στη λειτουργική της δομή (1).



Εικόνα 1: (αναπαράγεται άνευ αδείας) Αναπαριστάται η πρωτοταγής, η δευτεροταγής, η τριτοταγής και η τεταρτοταγής δομή που υιοθετεί μια πρωτεΐνη. <http://www.particlesciences.com/>

Μια πρωτεΐνη μπορεί να βρίσκεται στη φυσική της κατάσταση ή στην αποδιαταγμένη κατάσταση. Η ενεργειακή διαφορά των δύο καταστάσεων είναι μικρή και οι παράγοντες που συνεισφέρουν στη διαφορά αυτή είναι η ενθαλπία και η εντροπία. Η ενθαλπία προέρχεται από την ενέργεια των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων της αλυσίδας. Η εντροπία προέρχεται από το δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής, σύμφωνα με τον οποίο απαιτείται ενέργεια για τη δημιουργία τάξης (1). Η ολική διαφορά ενέργειας μεταξύ της φυσικής και της αποδιαταγμένης κατάστασης ονομάζεται διαφορά ελεύθερης ενέργειας (η διαφορά αντιστοιχεί σε αριθμούς που αντιπροσωπεύουν τις ενθαλπικές και εντροπικές διαφορές μεταξύ φυσικής και αποδιαταγμένης κατάστασης). Η αναδίπλωση είναι εφικτή όταν η ελεύθερη ενέργεια (ΔG) είναι αρνητική.

Η ανακάλυψη του τρόπου αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στη φυσική τους κατάσταση (ο τρόπος με τον οποίο η πρωτοταγής δομή καθορίζει την τριτοταγή δομή) είναι απαραίτητη για την κατανόηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης. Πάνω από 50 χρόνια, οι ερευνητές προσπαθούν να κατανοήσουν τον παραπάνω μηχανισμό, χωρίς να έχει έως τώρα αποδοθεί μια καθολικά αποδεκτή ερμηνεία. Έτσι, το γνωστό πλέον «πρόβλημα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών» παραμένει ένα άλυτο θέμα στον κλάδο της Μοριακής Βιολογίας.

1.2. Πρόβλημα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης

Το πρόβλημα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης αναφέρεται στο πώς η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης οδηγεί στη δημιουργία της τρισδιάστατης δομής της.

Ο Christian Anfinsen, το 1973, με πειράματα που βασίζονταν στην αποδιάταξη και επαναδιάταξη της ριβονουκλεάσης, έδειξε ότι η πρωτοταγής δομή είναι αυτή που καθορίζει την τριτοταγή και ότι η φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης θα πρέπει να αντιστοιχεί στην στερεοδιάταξη της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας (2).

Ο Cyrus Levinthal προσπάθησε να ερμηνεύσει τους παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την ταχύτητα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και συμπέρανε ότι δεν είναι δυνατό να σχηματίζεται η σταθερότερη θερμοδυναμικά στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης μέσα από τυχαίες μετατοπίσεις (παράδοξο του Levinthal). Πρότεινε την ύπαρξη καθορισμένων μονοπατιών κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης μιας πρωτεΐνης, η οποία θα πρέπει να ευνοείται τόσο θερμοδυναμικά όσο και κινητικά (3).

Μετά τα παραπάνω πειράματα, διεξήχθησαν περαιτέρω πειραματικές μελέτες από πολλούς ερευνητές με στόχο την εύρεση ενδιάμεσων καταστάσεων κατά την αναδίπλωση. Προτάθηκε μια πληθώρα μοντέλων, τα οποία προσπαθούν να ερμηνεύσουν το μηχανισμό αναδίπλωσης με διαφορετικούς τρόπους.

1.3. Μοντέλα αναδίπλωσης πρωτεϊνών

Έχουν προταθεί πολλά μοντέλα αναδίπλωσης πρωτεϊνών, καθώς κανένα από αυτά δε μπορεί να ερμηνεύσει επαρκώς την αναδίπλωση όλων των πρωτεϊνών:

- Μοντέλο «hydrophobic collapse»

Το μοντέλο προτάθηκε αρχικά από τον Dill, το 1985, και περιγράφει την αναδίπλωση σφαιρικών πρωτεϊνών όπου υποστηρίζει ότι οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό εύπλαστης σφαίρας (μερικώς αναδιπλωμένη κατάσταση). Η παγίδευση των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων στο εσωτερικό πιστεύεται ότι σταθεροποιεί τις ενδιάμεσες διαμορφώσεις. Το μοντέλο αυτό θεωρείται πως αποτελεί ένα πρώιμο στάδιο στο μονοπάτι αναδίπλωσης και εμφανίζεται πριν τη δημιουργία των φυσικών επαφών που σχηματίζονται στην τριτοταγή δομή (πλήρως αναδιπλωμένη) (4) (5).

- Μοντέλο «diffusion-collision»

Το μοντέλο αυτό θεωρεί ότι οι πρωτεΐνες αποτελούνται από πολλές στοιχειώδεις μικρές επικράτειες, οι οποίες εξαιτίας του ότι είναι πολύ μικρές, μπορούν να λάβουν όλες τις πιθανές διαμορφώσεις σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (σε σύγκριση με το χρόνο αναδίπλωσης ολόκληρης της πρωτεΐνης). Οι μικροεπικράτειες κινούνται διάχυτα και συγκρούονται μεταξύ τους σχηματίζοντας πολλές φορές μεγαλύτερες δομές (αυτό συμβαίνει όταν και οι δύο μικροεπικράτειες έχουν αποκτήσει ένα μέρος της δευτεροταγής τους δομής) (6).

- Μοντέλο «nucleation-condensation mechanism»

Το μοντέλο αυτό υποστηρίζει ότι το καθοριστικό βήμα είναι η δημιουργία ενός πυρήνα που ακολουθείται από ταχεία διάδοση της δομής. Ο πυρήνας παρουσιάζει σταθερότητα και δρα σαν βάση για το σχηματισμό περαιτέρω δομών γύρω του. Σε αυτό το μοντέλο παρατηρείται συνύπαρξη δευτεροταγών και τριτοταγών δομών. Η φυσικοχημική βάση αυτού του μοντέλου-μηχανισμού στηρίζεται στο ότι θα πρέπει να υπάρχει ένας κρίσιμος αριθμός αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται στο μεταβατικό στάδιο με σκοπό την αναδίπλωση (7) (8).

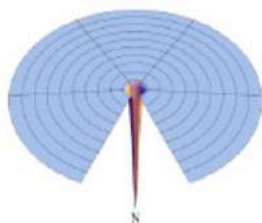
- Μοντέλο «jigsaw puzzle»

Το μοντέλο προτάθηκε από τους Harrison και Durbin το 1985 και υποστηρίζει ότι δεν είναι απαραίτητο να υπάρχει ένα κοινό μονοπάτι αναδίπλωσης για όλες τις πρωτεΐνες, αλλά κάθε πρωτεΐνη ακολουθεί μια μοναδική διαδρομή προς τη φυσική της κατάσταση. Οι πρωτεΐνες μπορούν να επιτύχουν τη φυσική τους διαμόρφωση μέσω πολλαπλών οδών (5). Αυτό το μοντέλο έθεσε τις βάσεις για τη δημιουργία του παρακάτω.

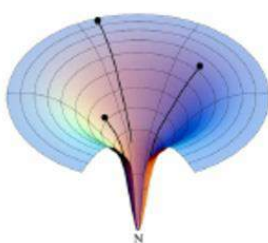
- Μοντέλο ενεργειακών τοπίων (energy landscapes) και χωνιών αναδίπλωσης (folding funnels) (9)

Κατά αυτό το μοντέλο, η αναδίπλωση πρωτεϊνών μοιάζει με τη ροή νερού από την κορυφή ενός βουνού με ανώμαλες πλαγιές. Υποστηρίζει την ύπαρξη πολλαπλών μονοπατιών αναδίπλωσης και χρησιμοποιεί μεθόδους

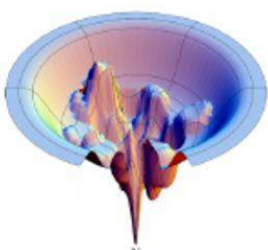
στατιστικής μηχανικής. Η αναπαράσταση των ενεργειακών τοπίων γίνεται με δισδιάστατα ή τρισδιάστατα διαγράμματα. Το ενεργειακό τοπίο απεικονίζεται συνήθως ως ένα χωνί, όπου το βάθος του αντικατοπτρίζει τη σταθερότητα της φυσικής διαμόρφωσης έναντι τις αποδιαταγμένης ενώ το πλάτος αντικατοπτρίζει την εντροπία που διαμορφώνεται στο σύστημα που μελετάται (η εντροπία μειώνεται όσο η πρωτεΐνη πλησιάζει τη φυσική της διαμόρφωση).



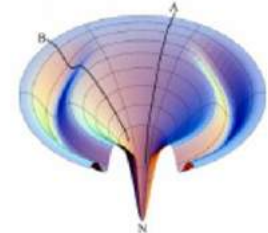
«Smooth funnel»: αποτελεί το ιδανικό τοπίο αναδίπλωσης. Αποτελείται από λεία επιφάνεια η οποία μειώνει τον αριθμό των πιθανών διαμορφώσεων. Αυτό το τοπίο συχνά οδηγεί σε γρήγορη αναδίπλωση.



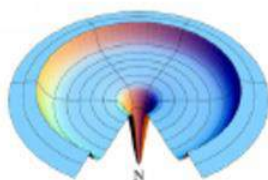
«Rugged funnel»: αποτελεί τοπίο με πολλούς λόφους, παγίδες και ενεργειακούς φραγμούς. Τέτοιο τοπίο οδηγεί συχνά σε αργή αναδίπλωση καθώς η αναδίπλωση μπορεί να ακολουθήσει πολλαπλά μονοπάτια.



«Moat landscape»: δείχνει μια διαδρομή A που αντιστοιχεί σε μια γρήγορη αναδίπλωση πρωτεΐνης και μια διαδρομή B που αντιστοιχεί σε μια αργή αναδίπλωση πρωτεΐνης εξαιτίας της ύπαρξης παγίδας.



«Champagne Glass landscape»: απεικονίζει πώς η εντροπία μπορεί να προκαλέσει έναν φραγμό στην ελεύθερη ενέργεια και να αναγκάσει την πολυπεπτιδική αλυσίδα να περιπλανάται στο επίπεδο και να μη φτάνει γρήγορα στη φυσική της διαμόρφωση.



«Golf course»: η πολυπεπτιδική αλυσίδα προσπαθεί να βρει τη φυσική διαμόρφωση σε ολόκληρη την επιφάνεια του «γηπέδου». Διαρκεί αρκετό χρονικό διάστημα η εύρεση της τρύπας και κατ' επέκταση της φυσικής διαμόρφωσης.

(Αναπαράγονται άνευ άδειας). Στις παραπάνω εικόνες, το N αντιστοιχεί στη φυσική κατάσταση.

1.4. Πειραματικές προσεγγίσεις (για την επίλυση του προβλήματος αναδίπλωσης πρωτεϊνών)

Για τη μελέτη της αναδίπλωσης και της δομής ως πιο αξιόπιστη μέθοδος θεωρείται μια πειραματική προσέγγιση. Μια από τις σημαντικότερες πειραματικές μεθόδους αποτελεί η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, κατά την οποία καθορίζεται η διευθέτηση των ατόμων μέσα σε έναν κρύσταλλο, από τον τρόπο με τον οποίο μια δέσμη ακτίνων Χ σκεδάζεται από τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου. Προσδιορίζεται η τρισδιάστατη εικόνα της πυκνότητας των ηλεκτρονίων του κρυστάλλου (10). Έπειτα είναι η μέθοδος του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) όπου μελετάται η αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων ενώ δύο ή περισσότερων διαστάσεων χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες. Τέλος, ο κυκλικός διχροϊσμός (CD) χρησιμοποιείται για την εύρεση της δευτεροταγούς δομής, η μέθοδος πρωτεϊνικής μηχανικής και η φασματομετρία μάζας αποτελούν, επίσης, πειραματικές μέθοδοι.

1.5. Υπολογιστικές προσεγγίσεις (για την επίλυση του προβλήματος αναδίπλωσης πρωτεϊνών)

Με σκοπό την επίλυση του προβλήματος αναδίπλωσης των πρωτεϊνών έχουν χρησιμοποιηθεί προσεγγίσεις τόσο θεωρητικές όσο και πειραματικές και υπολογιστικές. Το πρόβλημα που προκύπτει από τις πειραματικές προσεγγίσεις είναι ότι δεν αποτυπώνεται η πληθώρα διαμορφώσεων μεταξύ αποδιαταγμένης και αναδιπλωμένης δομής με ατομική ακρίβεια.

Συνδυαστικός κρίκος ανάμεσα στις θεωρητικές προσεγγίσεις και στις πειραματικές αποτελούν οι υπολογιστικές προσεγγίσεις. Με τις υπολογιστικές προσεγγίσεις γίνεται κατανοητός με μεγαλύτερη ακρίβεια και λεπτομέρεια ο μηχανισμός αναδίπλωσης αλλά και οι κινητικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες του συστήματος. Η ανάπτυξη της *in silico* προσέγγισης οφείλεται στην ελεύθερη διακίνηση πληροφοριών μέσω του διαδικτύου, στην ύπαρξη μεγάλων (και συχνά προσβάσιμων) βάσεων δεδομένων καθώς και εργαλείων ανάλυσης και στην ολοένα αυξανόμενη υπολογιστική ταχύτητα και απόδοση (11).

Οι σημαντικότερες εμπειρικές μέθοδοι στις οποίες βασίζεται η πρόβλεψη της δομής μιας πρωτεΐνης είναι οι εξής (12) (13):

- Μέθοδοι που δε βασίζονται σε πληροφορίες από βάσεις δεδομένων (*Ab initio*)
- Μέθοδοι που βασίζονται σε πληροφορίες από βάσεις δεδομένων
- Μέθοδοι αναγνώρισης αναδίπλωσης (*threading* ή *fold recognition*)
- Συγκριτικές μέθοδοι μοντελοποίησης και στρατηγικές στοίχισης αλληλουχιών

Η πρώτη κατηγορία βασίζεται στο ότι η φυσική δομή μιας πρωτεΐνης αντιστοιχεί στο ολικό ελάχιστο της ελεύθερης ενέργειάς της. Προσπαθούν να προβλέψουν τη φυσική διαμόρφωση λαμβάνοντας υπόψη μόνο την αμινοξική αλληλουχία. Η δεύτερη κατηγορία μεθόδων χρησιμοποιεί βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών και δημιουργεί μια αρχική τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή. Αυτές οι μέθοδοι δε συγκρίνουν μια αλληλουχία με μια γνωστή δομή αλλά συγκρίνουν τμήματα (π.χ. τμήματα αλληλουχιών) με τμήματα από γνωστές δομές πρωτεΐνης. Η τρίτη κατηγορία στηρίζεται στην ιδέα ότι η δομή είναι καλύτερα διατηρημένη εξελικτικά από την αλληλουχία. Ο στόχος των μεθόδων αυτών είναι να ταιριάξουν σωστά μια πρωτεϊνική αλληλουχία με ένα δομικό μοντέλο. Τέλος, στην τέταρτη κατηγορία μεθόδων μια αλληλουχία πρωτεϊνικών καταλοίπων στοιχίζεται με μια πρωτεϊνική αλληλουχία μιας άλλης πρωτεΐνης γνωστής δομής. Σε περίπτωση που η αλληλουχία είναι παρόμοια με την αλληλουχία από την πρωτεΐνη γνωστής δομής, τότε η πληροφορία που

αποκτάται από την ομοιότητα αυτή χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί το μοντέλο που απεικονίζει τη δομή της άγνωστης αλληλουχίας.

1.6. Χρήση πεπτιδίων στην αναδίπλωση πρωτεϊνών

Ως πεπτίδιο χαρακτηρίζεται μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που δεν ξεπερνά σε μήκος τα 50 κατάλοιπα αμινοξέων. Εξαιτίας των στοιχείων δευτεροταγούς δομής που περιέχονται στην τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών, έχουν γίνει πολλές μελέτες που χρησιμοποιούν πεπτίδια και όχι ολόκληρες πρωτεΐνες ως μοντέλα για τη μελέτη της αναδίπλωσης. Αυτό γίνεται επειδή θεωρείται πως οι τοπικές περιοχές της πρωτεΐνης έχουν την τάση να δημιουργούν δομές παρόμοιες με δομές της φυσικής διαμόρφωσης.

Ο ρόλος των πεπτιδίων στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής είναι καταλυτικός, καθώς χρησιμοποιούνται ευρέως και ελέγχουν την εγκυρότητα των δυναμικών πεδίων με στόχο τη βελτίωσή τους. Επίσης, είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός των μοριακών μηχανισμών της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης (στα αρχικά στάδια), καθώς τα πεπτίδια μιμούνται σε πολυπλοκότητα τις πρωτεΐνες και επιτρέπουν τη μελέτη τους.

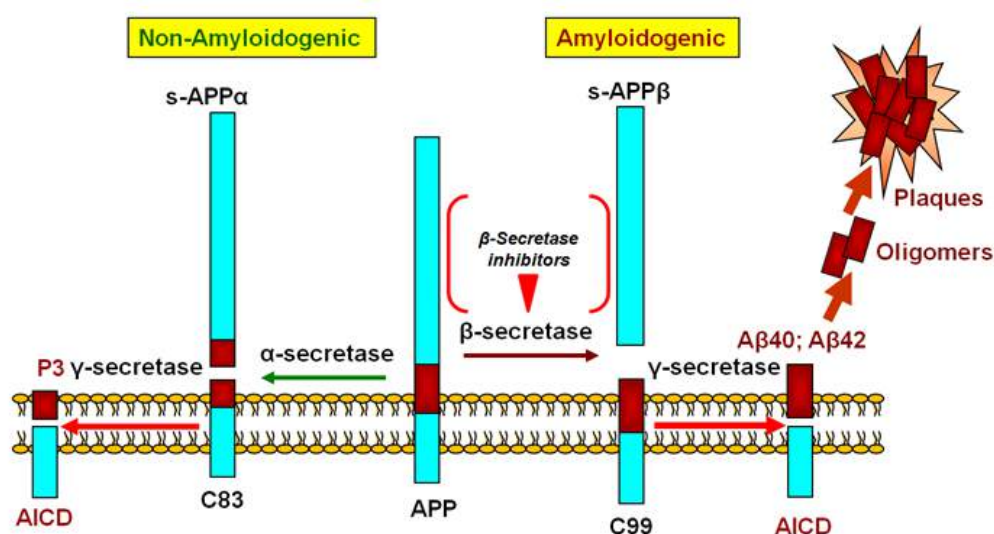
1.7. Το πεπτίδιο Αβ

Το β-Αμυλοειδές (Αβ) αποτελεί ένα πεπτίδιο με μήκος από 39 έως 43 αμινοξέα. Οι κυριότερες μορφές του στον εγκέφαλο, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στο αίμα και στο πλάσμα είναι οι Αβ₄₀ και Αβ₄₂. Το πεπτίδιο Αβ₄₂ είναι η κυριότερη μορφή στις αμυλοειδείς πλάκες.

Αλληλουχία: DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Κώδικας 3 γραμμάτων (3-letter-code): Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr - Glu - Val - His - His - Gln - Lys - Leu - Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - Val - Gly - Ser - Asn - Lys - Gly - Ala - Ile - Ile - Gly - Leu - Met - Val - Gly - Gly - Val - Val - Ile - Ala (14)

Το πεπτιδίο Αβ προκύπτει από την πρωτεόλυση μιας πρόδρομης πρωτεΐνης, της πρωτεΐνης APP. Η APP είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και τα νεφρά και λειτουργεί ως μεμβρανικός υποδοχέας. Η πρωτεΐνη APP έχει δύο μονοπάτια πρωτεόλυσης. Κατά το μη αμυλοειδικό μονοπάτι, η APP διασπάται από την α- και γ-σεκρετάση. Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή του s-APPα, του P3 και του AICD. Η άλλη οδός πρωτεόλυσης (αμυλοειδικό μονοπάτι) διασπά την πρωτεΐνη APP με την β- και γ-σεκρετάση, παράγοντας αρκετά κομμάτια πεπτιδίου Αβ, καθώς και s-APPβ και AICD (15).



Εικόνα 2: (αναπαράγεται άνευ αδείας) Στην εικόνα φαίνονται τα δύο μονοπάτια πρωτεόλυσης του APP, το μη αμυλοειδικό και το αμυλοειδικό. http://www.discoverymedicine.com/Can-Zhang/files/2012/09/discovery_medicine_no_76_can_zhang_figure_1.png.jhtml?id=15|attachment_18

Σημαντικό ρόλο κατέχει και η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE), η οποία είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 299 αμινοξέων που ρυθμίζει την ομοίωση των λιπιδίων, καθώς μεταφέρει λιπίδια από το ένα κύτταρο στο άλλο. Εκφράζεται σε διάφορα όργανα έχοντας υψηλότερη έκφραση στο ήπαρ και στον εγκέφαλο και έχει τρεις ισομορφές: ApoE2, ApoE3 και ApoE4. Αυτές οι τρεις ισομορφές διαφέρουν μόνο σε ένα ή δύο αμινοξέα, τα οποία είναι όμως ικανά να αλλοιώσουν τη δομή και τη λειτουργία. Το αλληλόμορφο ε4 έχει δειχθεί ως έναν ισχυρό γενετικό παράγοντα στην εκδήλωση της νόσου Alzheimer, η παρουσία του οποίου φαίνεται να επιταχύνει τη συσσώρευση, τη συσσωμάτωση και την εναπόθεση του Αβ στον εγκέφαλο. Το ¼ του πληθυσμού φέρει το αλληλόμορφο ε4 και κατέχει τετραπλάσια πιθανότητα

εμφάνισης της νόσου ενώ το 2% του πληθυσμού που είναι ομόζυγοι για το ε4 έχει περίπου δεκαπλάσια πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Οι ομόζυγοι για το ε3 αλληλόμορφο έχουν μέτρια πιθανότητα για την εμφάνιση της νόσου Alzheimer, ενώ το αλληλόμορφο ε2 δρα ως προστατευτικό ενάντια στη νόσο, καθώς τα άτομα που το φέρουν έχουν μικρότερη πιθανότητα να νοσήσουν (16) (17).

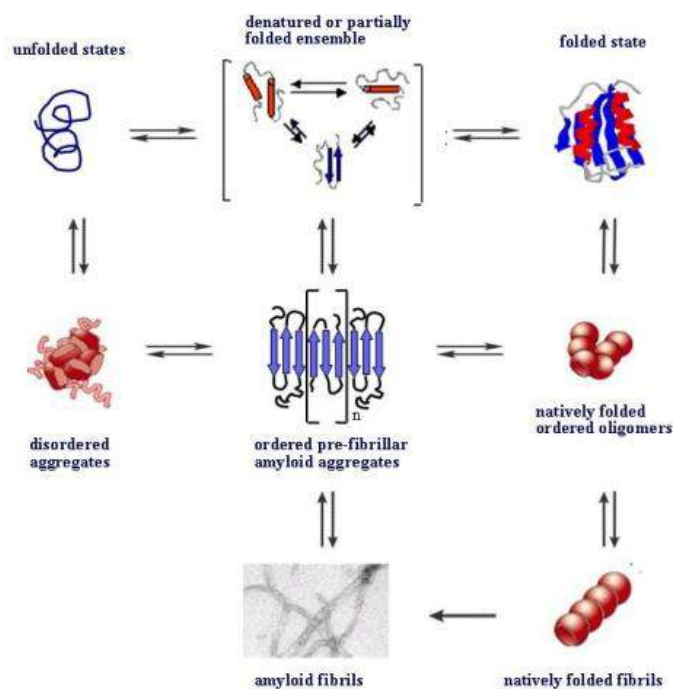
Η νόσος Alzheimer περιγράφηκε το 1907 από το Γερμανό ψυχίατρο Alois Alzheimer. Είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας (υπεύθυνη για το 75% των περιπτώσεων άνοιας) κατά την οποία προκαλούνται προβλήματα στη μνήμη, στη σκέψη και στη συμπεριφορά. Στην αρχή εκδηλώνονται ήπια συμπτώματα τα οποία σταδιακά επιδεινώνονται. Το αρχικό σύμπτωμα είναι συνήθως η αδυναμία ανάκλησης πρόσφατης αποκτηθείσας πληροφορίας και καθώς επιδεινώνεται η νόσος οδηγεί σε σοβαρά συμπτώματα όπως αποπροσανατολισμός, αλλαγές στη διάθεση, στην κρίση και στη συμπεριφορά, σύγχυση γεγονότων και δυσκολία στην ομιλία, στους υπολογισμούς, στην κατάποση και στο βάδισμα (18) (15).

Ιστολογικά, η πρόοδος της νόσου Alzheimer σχετίζεται με τρία (νευροπαθολογικά) χαρακτηριστικά: τη συσσώρευση εξωκυτταρικών πλακών που προκαλούνται από το αμυλοειδές β (Aβ), τα ενδοκυτταρικά νευροϊνιδιακά πλέγματα-κόμβοι (NFT –περιέχουν ζεύγη ελικοειδών ινιδίων που σχηματίζονται από δυσδιάλυτες υπερφωσφορυλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης Ταυ-) και το συναπτικό εκφυλισμό. Αυτά τα τρία γεγονότα συμβαίνουν κυρίως σε περιοχές του εγκεφάλου που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία της συνείδησης. Το Aβ παίζει κεντρικό ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στην πρόοδο της ασθένειας. Το πεπτιδίο Aβ παράγεται στα φυσιολογικά άτομα αλλά κάτω υπό ορισμένες συνθήκες, είναι δυνατό να αρχίσει η συσσώρευσή του με αποτέλεσμα την έναρξη της νόσου. Η νόσος χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία πλακών. Αυτές οι πλάκες αποτελούνται κυρίως από υψηλό ποσοστό αδιάλυτου Aβ και χωρίζονται στις διάχυτες (diffuse) και στις πλάκες με πυκνό πυρήνα (dense-core). Είναι γνωστό ότι πολλά άτομα αναπτύσσουν πλάκες καθώς γερνούν, όμως, αυτοί που πάσχουν από Alzheimer τείνουν να αναπτύσσουν με συγκεκριμένο

τρόπο/μοτίβο περισσότερες πλάκες, οι οποίες εδράζουν σε περιοχές που είναι υπεύθυνες για τη μνήμη πριν εξαπλωθούν και σε άλλες περιοχές (15) (18) (19) (20).

Το πεππίδιο που σχετίζεται με τη νόσο Alzheimer ανήκει στις intrinsically disordered proteins ή IDPs. Οι περισσότερες πρωτεΐνες υιοθετούν μια καλά καθορισμένη τρισδιάστατη δομή για να λειτουργήσουν. Τη δεκαετία του 1950 ανακαλύφθηκαν πολλές IDPs (όπως π.χ. κασεΐνη), παρ' όλ' αυτά, αγνοήθηκε η ύπαρξή τους μέχρι πρόσφατα. Την τελευταία δεκαετία, όμως, απασχόλησε την επιστημονική κοινότητα ξανά η ύπαρξη πρωτεϊνών που δεν υιοθετούν μια καλά καθορισμένη τρισδιάστατη δομή αλλά είναι, αδιαμφισβήτητα, σημαντικές στην κυτταρική λειτουργία (μεταγραφική ρύθμιση και μεταφραστικά και κυτταρικά σήματα). Η έλλειψη δομής αναφέρεται σε ολόκληρη την πρωτεΐνη ή σε μέρος αυτής και οφείλεται στην ύπαρξη πολλών πολικών αμινοξέων και προλίνης (21) (22) (23).

Έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφορα μοντέλα που προσπαθούν να ερμηνεύσουν τη διαδικασία συσσώρευσης του Αβ, από την αποδιαταγμένη του μορφή στο σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων, που αποτελούνται από β-φύλλα.



Εικόνα 3: (αναπαράγεται άνευ αδείας) (24) Συσσώρευση από την αποδιαταγμένη ή τη φυσική δομή του πεππίδιου Αβ.

1.8. Στόχος παρούσας εργασίας

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του πεπτιδίου $A\beta_{17-34}$ μέσω προσομοίωσης μοριακής δυναμικής και η σύγκριση των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης με πειραματικά αποτελέσματα από NMR του Genadiy Fonar και Abraham O. Samson (25).

2. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

2.1. Εισαγωγή στις προσομοιώσεις

Μοριακός μοντελισμός είναι η επιστήμη και τέχνη της μελέτης της μοριακής δομής και λειτουργίας, που έχει σκοπό την απόδοση μέσω υπολογιστών των ατομικών και των μοριακών αλληλεπιδράσεων, τόσο σε μικροσκοπικό όσο και σε μακροσκοπικό επίπεδο συμπεριφοράς των φυσικών συστημάτων. Η σύνδεση μεταξύ μικροσκοπικού και μακροσκοπικού κόσμου είναι εφικτή μέσω της στατιστικής μηχανικής (26). Τα μοντέλα μπορεί να είναι σκελετικά (όπως το DNA από τους Crick και Watson) ή πολυεδρικά (όπως τα μοντέλα του Nicholson). Επίσης, με τη βοήθεια των τεχνολογιών, μπορούν να δημιουργηθούν μοντέλα πολύπλοκων μορίων. Κατά το μοριακό μοντελισμό δημιουργούνται μοντέλα που έχουν τρεις διαστάσεις και οπτικοποιούνται με τη χρήση γραφικών.

Ο μοριακός μοντελισμός χρησιμοποιείται για να απαντήσει μια από τις παρακάτω ερωτήσεις:

Ποια είναι η διαμόρφωση ενός μορίου;

Ποια είναι η διαμόρφωση των τριγύρω μορίων;

Ποια είναι η διαμόρφωση του περιβάλλοντος;

Ποια είναι η αλληλεπίδραση δύο (ή περισσότερων) μορίων;

Οι μελέτες περιλαμβάνουν ορισμένα στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο επιλέγεται η μέθοδος που περιγράφει τη δομή και τις ιδιότητες του συστήματος, ενώ κατά το δεύτερο και τρίτο στάδιο πραγματοποιούνται υπολογισμοί και αναλύσεις δομών αντίστοιχα (27).

Η μοριακή δυναμική αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ των κλασσικών πειραμάτων και των υπολογιστών. Επιτρέπει την απόκτηση πληροφορίας που δύσκολα αποκτάται με τα κλασσικά πειράματα. Συνδυάζοντας την θεωρία με τα κλασσικά πειράματα είναι δυνατό να δημιουργηθεί μια πιο σφαιρική ιδέα για τη δομή του μορίου αλλά και για τη συμπεριφορά του.

Η αρχή της μοριακής δυναμικής έγινε στις αρχές του 1950 από τον Alder και Wainwright, οι οποίοι μελέτησαν τις αλληλεπιδράσεις που είχαν σκληρές σφαίρες αν και οι αρχικές ιδέες είχαν αρχίσει από τον van der Waals και τον Boltzmann. Το επόμενο βήμα έγινε το 1964 με ένα άρθρο του Rahman σχετικά με προσομοίωση μοριακής δυναμικής που έγινε σε υγρό Αργό, ενώ η μελέτη πάνω στο υγρό νερό του Stillinger και του Rahman δημοσιεύθηκε το 1971. Ακολούθησαν προσομοιώσεις πιο περίπλοκων υγρών συστημάτων. Η πρώτη προσομοίωση πρωτεΐνης έγινε το 1977 από τον McCammon και την ομάδα του με την πρωτεΐνη BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor). Οι προσομοιώσεις πολλών συστημάτων μπορούν να προσφέρουν λεπτομερή δεδομένα για τα φαινόμενα της κίνησης. Σήμερα είναι δυνατή η προσομοίωση συστημάτων με λιπίδια και συμπλεγμάτων DNA-πρωτεΐνης (28).

Η μοριακή δυναμική χωρίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής και τις προσομοιώσεις Monte Carlo. Για τις προσομοιώσεις Monte Carlo δημιουργείται μια νέα διαμόρφωση επιλέγοντας ένα τυχαίο μόριο, περιστρέφοντάς το και πραγματοποιώντας οποιοσδήποτε εσωτερικές δομικές παραλλαγές. Για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής οι νέες διαμορφώσεις δημιουργούνται με την εφαρμογή των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα σε όλα τα άτομα ταυτόχρονα (29).

2.1.1. Στατιστική Μηχανική

Η στατιστική μηχανική απαιτείται για τη μετατροπή της πληροφορίας από το μικροσκοπικό στο μακροσκοπικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής περιγράφουν το σύστημα σε ατομικό επίπεδο, όμως, στόχος είναι η μακροσκοπική μελέτη του συστήματος, γι αυτό είναι αναγκαία η χρήση στατιστικής μηχανικής.

Πολλές από τις ποσότητες που μπορούν να μετρηθούν με μια υπολογιστική προσομοίωση δε μπορούν να συγκριθούν με πειραματικά δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής του υγρού νερού μπορούν να μετρηθούν οι στιγμιαίες θέσεις και ταχύτητες όλων των ατόμων του υγρού, όμως αυτά τα δεδομένα δε μπορούν να συγκριθούν

με πειραματικά δεδομένα, αφού σε κανένα πείραμα δε δίδονται τέτοια στοιχεία (30).

Η στατιστική μηχανική ανήκει στον κλάδο των φυσικών επιστημών που μελετά μακροσκοπικά συστήματα από μοριακή σκοπιά. Στόχος είναι από τις ιδιότητες των μεμονωμένων μορίων που αποτελούν το σύστημα, να γίνουν κατανοητά και προβλέψιμα τα μακροσκοπικά φαινόμενα. Η σύνδεση μεταξύ μικρόκοσμου και μακρόκοσμου γίνεται με έναν μεγάλο αριθμό από πολύπλοκες μαθηματικές εξισώσεις, οι οποίες αξιοποιούνται από δεδομένα που παράγονται από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (31).

2.1.2. Μοριακή Μηχανική

Η μοριακή μηχανική χρησιμοποιεί την κλασσική μηχανική με σκοπό τη μοντελοποίηση μοριακών συστημάτων, τα οποία συνήθως αποτελούνται από μεγάλο αριθμό ατόμων. Η δυναμική ενέργεια μετράται με τη χρήση δυναμικών πεδίων και χρησιμοποιείται μια εξίσωση η οποία περιγράφει την δυναμική ενέργεια του συστήματος ως προς τις θέσεις των ατόμων από τα οποία αποτελείται το σύστημα (υπολογίζεται η θέση των πυρήνων των ατόμων και όχι οι κινήσεις των ηλεκτρονίων). Η δυναμική ενέργεια ενός μοριακού συστήματος εξαρτάται από το είδος των ατόμων που αποτελούν το μόριο, το είδος των δεσμών που σχηματίζονται και τις δίεδρες γωνίες που το σχηματίζουν (32).

Τρεις είναι οι αρχές που αποτελούν τη βάση της μοριακής μηχανικής: η θερμοδυναμική υπόθεση, η προσθετικότητα των δυναμικών και η δυνατότητα μεταφοράς. Η θερμοδυναμική υπόθεση θεωρεί ότι μια πληθώρα μακρομορίων οδηγούνται αυθόρμητα σε κατάσταση χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας (αναδιπλωμένη φυσική κατάσταση). Η προσθετικότητα των δυναμικών θεωρεί ότι οι δυνάμεις που δρουν πάνω στα άτομα μπορούν να εκφραστούν ως το άθροισμα των δυνάμεων που χωρίζονται σε δεσμικές και σε μη δεσμικές. Τέλος, η δυνατότητα της μεταφοράς θεωρεί ότι μπορούν να εφαρμοστούν δυναμικά που έχουν υπολογισθεί για αντιπροσωπευτικές δομές σε

πολυπλοκότερα μόρια, τα οποία θα αποτελούνται από τις ίδιες χημικές υποομάδες (11).

2.1.3. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αναπαριστούν την υπολογιστική προσέγγιση στη στατιστική μηχανική. Αποτελούν κομβικό σημείο των μαθηματικών, της βιολογίας, της χημείας, της φυσικής και των υπολογιστικών επιστημών. Χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ισορροπίας και των δυναμικών ιδιοτήτων πολύπλοκων συστημάτων. Με αυτή την υπολογιστική μέθοδο υπολογίζεται, συναρτήσει του χρόνου, η συμπεριφορά ενός μοριακού συστήματος με αποτέλεσμα πληροφορίες σχετικές με τις διακυμάνσεις και τις αλλαγές διαμόρφωσης που υπέστη το υπό μελέτη μόριο (11).

Για την έναρξη μιας προσομοίωσης απαιτούνται τα παρακάτω βήματα (30):

1. Προετοιμασία συστήματος κατά την οποία θέτονται οι παράμετροι οι οποίοι ορίζουν την κατάσταση του προς μελέτη συστήματος, όπως αριθμός σωματιδίων, αρχική θερμοκρασία κτλ.
2. Αρχικοποίηση συστήματος όπου ορίζονται αρχικές θέσεις αλλά και ταχύτητες των σωματιδίων
3. Υπολογισμός δυνάμεων κάθε σωματιδίου και θέσεων καθώς και ταχυτήτων καθ' όλη τη διάρκεια του τροχιακού
4. Σύλλογή και ανάλυση δεδομένων από τα τροχιακά

Έχουν πραγματοποιηθεί, πλέον, προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πρωτεϊνών, συμπλόκων πρωτεΐνης-DNA και συστημάτων λιπιδίων. Είναι εφικτές οι προσομοιώσεις σε ακραίες τιμές μεταβλητών (π.χ. ακραίες τιμές θερμοκρασίας ή πίεσης), οι οποίες δεν είναι εφικτό να μελετηθούν πειραματικά.

Η μέθοδος των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής βασίζεται στο δεύτερο νόμο του Νεύτωνα (κλασσική μηχανική). Σύμφωνα με το νόμο αυτό,

μπορεί να προβλεφθεί, δεδομένης της μάζας του αντικειμένου και της συνολικής δύναμης που ασκείται σε αυτό, η επιτάχυνσή του. Η εξίσωση του νόμου είναι η εξής:

$$F = ma,$$

όπου F είναι η δύναμη (το άθροισμα των δυνάμεων που ασκούνται στο σωματίδιο), m η μάζα του και a η επιτάχυνσή του.

Η επίλυση της εξίσωσης παράγει ένα τροχιακό το οποίο περιγράφει τις θέσεις, τις ταχύτητες και τις επιταχύνσεις των σωματιδίων του συστήματος καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.

Η δύναμη μπορεί επίσης να εκφραστεί και ως συνάρτηση της μεταβολής της δυναμικής ενέργειας:

$$F = -\frac{dV}{dr},$$

όπου V είναι η δυναμική ενέργεια και r είναι η θέση. Συνδυάζοντας την εξίσωση του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα και την παραπάνω εξίσωση με τις εξισώσεις της κίνησης, προκύπτουν οι εξής εξισώσεις:

$$a = -\frac{1}{m} \frac{dE}{dr} \text{ και } -\frac{dV}{dr} = \frac{md^2r}{dt^2},$$

όπου t είναι ο χρόνος.

Καθώς είναι εφικτή η πρόβλεψη της κατάστασης του συστήματος από τις παραπάνω εξισώσεις, για οποιαδήποτε χρονική στιγμή γνωρίζοντας τις αρχικές θέσεις, την αρχική κατανομή ταχυτήτων και την επιτάχυνση κάθε ατόμου, οι εξισώσεις αυτές καλούνται ντετερμινιστικές ή αιτιοκρατικές. Οι αρχικές θέσεις μπορούν να αποκτηθούν από πειράματα π.χ. κρυσταλλογραφία ακτίνων X ή φασματοσκοπία NMR.

Για τον υπολογισμό της αρχικής κατανομής των ταχυτήτων χρησιμοποιείται η κατανομή Maxwell-Boltzmann:

$$\rho(v) = \left(\frac{m}{2\pi k_B T}\right)^{\frac{1}{2}} \exp\left(\frac{-mv^2}{2k_B T}\right),$$

όπου v είναι η ταχύτητα, k_B είναι η σταθερά του Boltzmann και T είναι η θερμοκρασία του συστήματος.

Η επιτάχυνση προκύπτει μέσω του υπολογισμού της δυναμικής ενέργειας, χρησιμοποιώντας δυναμικά πεδία. Ο υπολογισμός της επιτάχυνσης αποτελεί μια απαιτητική υπολογιστική διαδικασία και γι αυτό το λόγο προσεγγίζεται από αλγόριθμους:

- Velvet algorithm
- Leap-frog algorithm
- Velocity Verlet
- Beeman's algorithm

Πολλοί από τους αλγόριθμους στηρίζονται στις επεκτάσεις των σειρών Taylor, που βασίζονται στη μείωση του αριθμού των όρων μιας εξίσωσης (καθίσταται ευκολότερη η επίλυσή της):

$$r(t + dt) = r(t) + v(t) dt + \frac{1}{2} a(t) dt^2 + \dots$$

$$v(t + dt) = v(t) + a(t) dt + \frac{1}{2} b(t) dt^2 + \dots$$

$$a(t + dt) = a(t) + b(t) dt + \dots$$

όπου r είναι η θέση (πρώτη εξίσωση), v είναι η ταχύτητα (δεύτερη εξίσωση) και a είναι η επιτάχυνση (τρίτη εξίσωση).

Οι αλγόριθμοι ολοκλήρωσης παρουσιάζουν ορισμένα σφάλματα τα οποία αφορούν την ακρίβεια των αποτελεσμάτων που παράγουν. Γι αυτό, η επιλογή του αλγορίθμου που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να πληροί κάποια κριτήρια με σκοπό τα δεδομένα που θα παραχθούν να συμπίπτουν όσο το δυνατό περισσότερο με την πραγματικότητα (31).

2.1.4. Δυναμικά Πεδία

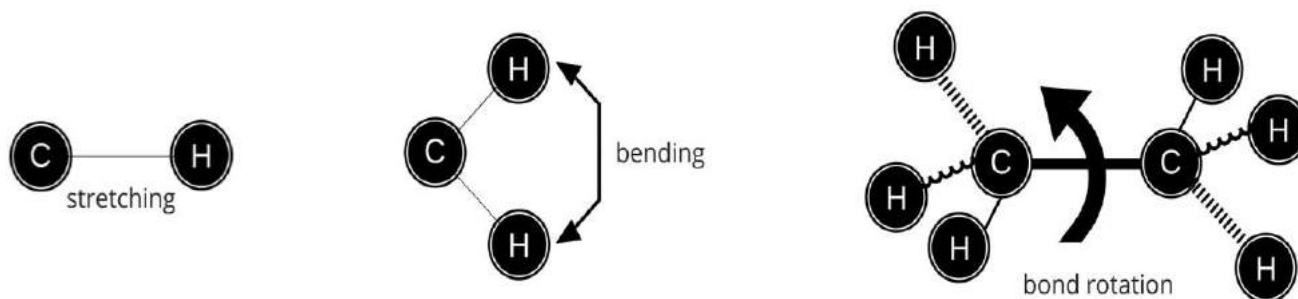
Δυναμικό Πεδίο στη χημεία, είναι μια μαθηματική περιγραφή της δυναμικής ενέργειας ενός συστήματος ατόμων. Στη φυσική, ως δυναμικό πεδίο, θεωρείται ένα πεδίο το οποίο περιγράφει τη θέση της δύναμης που θα ένωθε ένα σωματίδιο αν βρισκόταν στο συγκεκριμένο σημείο.

Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, τα δυναμικά πεδία αποτελούν εμπειρικές εξισώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται με σκοπό τον υπολογισμό των δυνάμεων και της δυναμικής ενέργειας του συστήματος, βάσει της θέσης των ατόμων αλλά και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι δεσμικές (εσωτερικές) ή μη δεσμικές (εξωτερικές).

$$V = E_{\text{bonded}} + E_{\text{non-bonded}}$$

Οι δεσμικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν το μήκος δεσμού, τη γωνία δεσμού και την περιστροφή δίεδρων γωνιών.

$$E_{\text{bonded}} = E_{\text{bond-stretch}} + E_{\text{angle-bend}} + E_{\text{rotate-along-bond}}$$



Εικόνα 4: Από δεξιά προς τα αριστερά παρουσιάζονται το μήκος δεσμού, η γωνία δεσμού και η περιστροφή των δίεδρων γωνιών που ανήκουν στις δεσμικές αλληλεπιδράσεις.

Οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις van der Waals και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (οι οποίες υπολογίζονται από τις εξισώσεις Lennard-Jones και Coulomb αντίστοιχα).

$$E_{\text{non-bonded}} = E_{\text{van-der-Waals}} + E_{\text{electrostatic}}$$

Η ολική ενέργεια του συστήματος ισούται με το άθροισμα της ενέργειας που παράγεται από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις για όλα τα ζεύγη ατόμων του συστήματος και της κινητικής ενέργειας (31).

Η επιτυχία ενός δυναμικού πεδίου έγκειται στο κατά πόσο τα αποτελέσματα που δίνει συγκλίνουν με τα πειραματικά αποτελέσματα. Πολλές μελέτες πρωτεϊνών και μακρομορίων βασίζονται σε (εμπειρικά) δυναμικά πεδία, γι αυτό το λόγο δεν υπάρχει ένα μόνο δυναμικό πεδίο που να εφαρμόζεται σε οποιοδήποτε μόριο. Στις μέρες μας, υπάρχουν πολλά δυναμικά πεδία που έχουν παρόμοιους μαθηματικούς τύπους. Οι διαφορές τους εντοπίζονται στις παραμέτρους και στους υπολογισμούς των δεσμικών και μη-δεσμικών αλληλεπιδράσεων. Τα δυναμικά πεδία υπόκεινται συνεχώς σε βελτιώσεις με σκοπό την αύξηση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων τους με τα αποτελέσματα από πειραματικά δεδομένα.

Τα πιο γνωστά δυναμικά πεδία είναι τα εξής:

- AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) (33)
- CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) (34)
- GROMOS (Groningen Molecular Simulation) (35)
- OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations) (36)

2.1.5. AMBER

Το Amber δεν αποτελεί μόνο ένα πακέτο μοριακής δυναμικής, αλλά περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό προγραμμάτων τα οποία συμβάλλουν στην εγκατάσταση, στην εκτέλεση και στην ανάλυση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Η συνεργασία παραπάνω από 40 ερευνητών αλλά και επιπλέον εξωτερικών συνεργατών οδήγησε στη δημιουργία του Amber (37). Το Amber έχει τροποποιηθεί αρκετές φορές από την πρώτη του έκδοση κι έχουν προκύψει διάφορες επιπλέον εκδόσεις. Οι πιο δημοφιλείς εκδόσεις είναι οι ff94, ff99SB, ff03 και GAFF. Η έκδοση ff94 (επηρεαζόμενη από δυνατότητες του δυναμικού πεδίου OPLS) είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο από τη στιγμή που εκδόθηκε. Οι εκδόσεις ff96 και ff99 είχαν τροποποιημένες

τις παραμέτρους υπολογισμού των διέδρων γωνιών. Καλύτερη ισορροπία των στοιχείων δευτεροταγούς δομής επιτεύχθηκε με την έκδοση ff99SB, στην οποία είχαν αντικατασταθεί οι παράμετροι για τις διέδρες γωνίας της κύριας αλυσίδας. Επιπλέον εκδόσεις αποτελούν τα ff99SB-STAR, ff99SB-ILDN και ff99SB-STAR-ILDN (το τελευταίο αποτελεί συνδυασμό των δύο προηγούμενων δυναμικών πεδίων) (38).

Η μορφή της εξίσωσης του δυναμικού πεδίου AMBER είναι η αυτή που αναγράφεται παρακάτω:

$$V(r^N) = \sum_{bonds} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{angles} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N f_{ij} \left\{ \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{oij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{oij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\}$$

Ο πρώτος όρος της συνάρτησης αναφέρεται στην ενέργεια που προκύπτει από τα ομοιοπολικά συνδεδεμένα άτομα κατά την έκταση δεσμού. Ο δεύτερος όρος αναφέρεται στην ενέργεια που προκύπτει από την κάμψη των δεσμικών ατόμων. Ο τρίτος όρος αναφέρεται στην ενέργεια που προκύπτει από την περιστροφή των ατόμων γύρω από τους δεσμούς. Τέλος, ο τέταρτος όρος αναφέρεται στην ενέργεια που προκύπτει από τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις (ενέργεια που οφείλεται σε δυνάμεις van der Waals και σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις) (39).

2.1.6. Διαλύτης

Το νερό, αποτελεί τον πιο συνηθισμένο αλλά και σημαντικό διαλύτη στη φύση. Έχει ιδιαίτερες ιδιότητες οι οποίες οφείλονται στην ικανότητα που έχουν τα μόριά του να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια νερού και να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου.

Ο διαλύτης επηρεάζει τη δομή ενός μορίου καθώς και τις ηλεκτροστατικές και τις θερμοδυναμικές παραμέτρους και γι αυτό το λόγο, η

παρουσία του κρίνεται απαραίτητη στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Υπάρχουν πολλά μοντέλα νερού που χρησιμοποιούνται στις προσομοιώσεις, τα οποία έχουν διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ τους ακόμα κι αν η προσομοίωση γίνεται στις ίδιες συνθήκες (40). Τα μοντέλα TIP3P (transferable intermolecular potential 3P), SPC (simple point charge) και SPC/E (extended simple point charge) είναι από τα πιο συνηθισμένα μοντέλα που θεωρούν πως τα μόρια νερού έχουν τρεις θέσεις αλληλεπίδρασης. Το μοντέλο TIP4P θεωρεί πως τα μόρια νερού έχουν τέσσερις θέσεις αλληλεπίδρασης με γειτονικά μόρια. Από όλα τα παραπάνω μοντέλα νερού, τα άτομα (από τα μόρια νερού) αντιμετωπίζονται ως άκαμπτες σφαίρες και χρησιμοποιούν τις εξισώσεις Lennard-Jones και Coulomb.

Η επίδραση του διαλύτη στην προσομοίωση μπορεί να γίνει με δύο διαφορετικούς τρόπους. Στον έναν τρόπο, τα μόρια του διαλύτη δε συμμετέχουν στην προσομοίωση κι έτσι η επίδρασή του προσδιορίζεται έμμεσα (χρησιμοποιώντας μια επιπλέον διηλεκτρική σταθερά), ενώ στην άλλη περίπτωση, τα μόρια του διαλύτη συμμετέχουν στην προσομοίωση (το σύστημα θα πρέπει να οριοθετηθεί με σκοπό την αποφυγή διάχυσης μορίων διαλύτη και τη χρήση περιορισμένου αριθμού μορίων διαλύτη) (31).

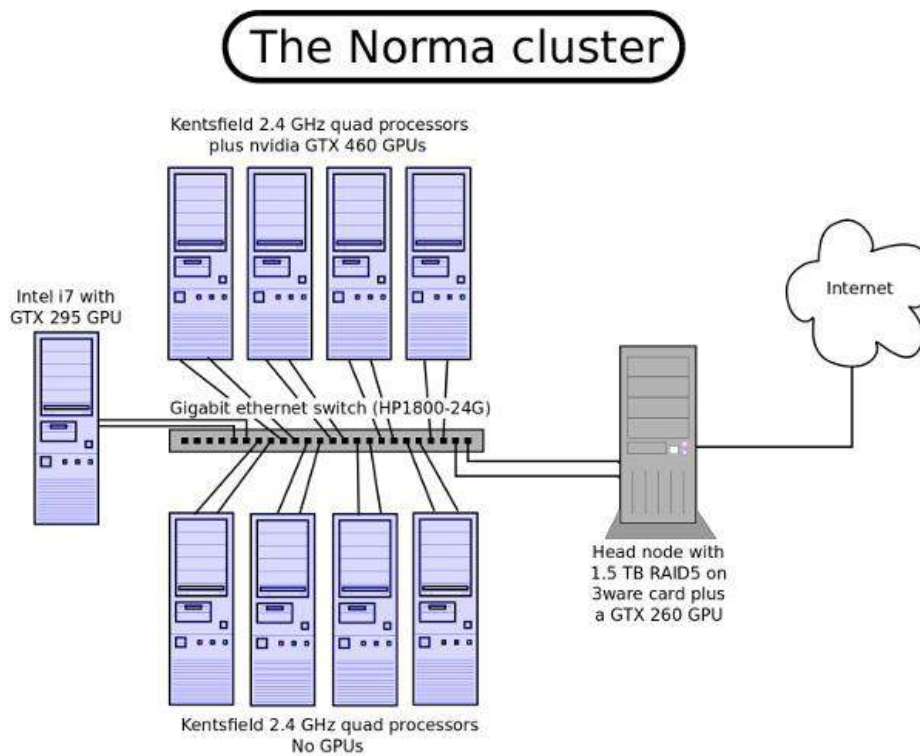
2.2. Προσομοιώσεις

Η μελέτη αναδίπλωσης του τμήματος 17-34 του πεπτιδίου Αβ πραγματοποιήθηκε με μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής. Η προσομοίωση αυτή έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος NAMD, το οποίο είναι ένα λογισμικό σχεδιασμένο να παράγει προσομοιώσεις μεγάλων βιομοριακών συστημάτων. Το NAMD είναι συμβατό με το δυναμικό πεδίο AMBER και CHARMM (41).

2.2.1. Τεχνικά χαρακτηριστικά για προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

Όπως προαναφέρθηκε, η προσομοίωση έγινε με το πρόγραμμα NAMD και χρησιμοποιήθηκε το δυναμικό πεδίο AMBER. Η πραγματοποίηση προσομοίωσης συστήματος που περιέχει μεγάλο αριθμό ατόμων απαιτεί υψηλή υπολογιστική δύναμη, κι έτσι, για να αποφευχθεί αυτή η χρονοβόρα και απαιτητική διαδικασία, συνδέονται παράλληλα υπολογιστές (δημιουργία cluster). Με αυτόν τον τρόπο γίνεται καταμερισμός των εργασιών ανάμεσα στους υπολογιστές που είναι συνδεδεμένοι στο cluster. Ένα τέτοιο cluster είναι η Norma.

Η Norma περιλαμβάνει 40 CPU (central processing unit) πυρήνες, συνολική φυσική μνήμη 46 Gbytes και 6 GP GPUs καταμεμημένα σε 10 κόμβους. Κάθε ένας από τους 9 κόμβους προσφέρουν 4 πυρήνες, 4 Gbytes φυσική μνήμη και δύο (gigabit) διασυνδέσεις δικτύου. Εξάιρεση αποτελεί ο τελευταίος κόμβος (Intel's i7 965 extreme) που έχει 6 Gbytes φυσική μνήμη και μια κάρτα γραφικών CUDA (Compute Unified Device Architecture)-capable GTX-295. Ο κύριος κόμβος παρέχει 4 πυρήνες, 8 Gbytes φυσική μνήμη, 1,5 Tbytes αποθηκευτικό χώρο, τρεις (gigabit) διασυνδέσεις δικτύου και μια nvidia GTX-260 GPU (graphics processing unit) (42).



Εικόνα 5: Απεικόνιση του υπολογιστικού συστήματος Norma.
<http://norma.mbg.duth.gr/index.php?id=about:intro>

2.2.2. Έναρξη προσομοιώσεων με NAMD

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής που χρησιμοποιούν το NAMD και το δυναμικό πεδίο AMBER απαιτούν τουλάχιστον 3 αρχεία:

- ένα αρχείο .pdb (Protein Data Bank), το οποίο περιέχει τις συντεταγμένες όλως των ατόμων (και των ετερογενών ατόμων) του συστήματος ή/και τις αντίστοιχες ταχύτητες. Αρχεία pdb είναι διαθέσιμα στη βάση δεδομένων PDB ή μπορούν να δημιουργηθούν από το χρήστη. Η μορφή ενός αρχείο .pdb είναι η εξής:

ATOM	1	N	LEU	A	1	-12.683	2.673	-0.315	1.00	4.71	N
ATOM	2	CA	LEU	A	1	-13.473	1.565	0.285	1.00	4.48	C
ATOM	3	C	LEU	A	1	-12.554	0.530	0.943	1.00	3.57	C
ATOM	4	O	LEU	A	1	-12.845	0.050	2.043	1.00	3.91	O
ATOM	5	CB	LEU	A	1	-14.344	0.897	-0.795	1.00	5.29	C
ATOM	6	CG	LEU	A	1	-15.570	0.123	-0.283	1.00	6.06	C
ATOM	7	CD1	LEU	A	1	-16.764	1.053	-0.099	1.00	6.56	C
ATOM	8	CD2	LEU	A	1	-15.918	-1.009	-1.237	1.00	6.72	C
ATOM	9	H1	LEU	A	1	-12.125	3.153	0.421	1.00	4.72	H
ATOM	10	H2	LEU	A	1	-13.318	3.365	-0.760	1.00	5.01	H
ATOM	11	H3	LEU	A	1	-12.034	2.299	-1.037	1.00	5.04	H
ATOM	12	HA	LEU	A	1	-14.117	1.985	1.044	1.00	4.87	H
ATOM	13	HB2	LEU	A	1	-14.689	1.665	-1.470	1.00	5.58	H
ATOM	14	HB3	LEU	A	1	-13.722	0.210	-1.350	1.00	5.45	H
ATOM	15	HG	LEU	A	1	-15.336	-0.310	0.679	1.00	6.19	H
ATOM	16	HD11	LEU	A	1	-17.012	1.511	-1.045	1.00	7.06	H
ATOM	17	HD12	LEU	A	1	-16.515	1.821	0.618	1.00	6.71	H
ATOM	18	HD13	LEU	A	1	-17.610	0.485	0.260	1.00	6.60	H
ATOM	19	HD21	LEU	A	1	-15.086	-1.695	-1.300	1.00	7.07	H
ATOM	20	HD22	LEU	A	1	-16.126	-0.604	-2.216	1.00	6.98	H

Εικόνα 6: Παρουσίαση του Αβ₁₇₋₃₄ PDB αρχείου. Οι στήλες από αριστερά προς τα δεξιά περιέχουν: τον τύπο καταχώρησης, τον αριθμό ατόμου, το όνομα ατόμου, το όνομα καταλοίπου, τον αριθμό τμήματος, τον αριθμό καταλοίπου, τις συντεταγμένες x, y και z, την κατοχή, τον παράγοντα θερμοκρασία και τον τύπο ατόμου.

- ένα αρχείο παραμετροποίησης δυναμικού πεδίου AMBER, το οποίο περιέχει όλες τις ειδικές πληροφορίες σχετικά με την τοπολογία και τις αναγκαίες παραμέτρους για τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας του συστήματος. Επίσης, καθορίζει κι άλλους παράγοντες, όπως π.χ. η δύναμη των δεσμών.
- ένα αρχείο διαμόρφωσης, στο οποίο καθορίζονται από τον χρήση όλες οι συνθήκες αλλά και ο τρόπος κατά τον οποίο θα διεξαχθεί η προσομοίωση. Το αρχείο που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση μοριακής δυναμικής του Αβ₁₇₋₃₄ είναι το παρακάτω:

```
#
# Input files
#
amber                on
readexclusions       yes
```

```

parmfile          abeta.prmtop
coordinates       heat_out.coor
velocities        heat_out.vel
extendedSystem    heat_out.xsc

#
# Adaptive ...
#
adaptTempMD       on
adaptTempTmin     280
adaptTempTmax     480
adaptTempBins     1000
adaptTempRestartFile output/restart.tempering
adaptTempRestartFreq 10000
adaptTempLangevin on
adaptTempRescaling off
adaptTempOutFreq  400

#
# Output files & writing frequency for DCD
# and restart files
#
outputname        output/equi_out
binaryoutput      off
restartname       output/restart
restartfreq       10000
binaryrestart     yes
dcdFile           output/equi_out.dcd
dcdFreq          400
DCDunitcell      yes

#
# Frequencies for logs and the xst file
#
outputEnergies    400
outputTiming      1600
xstFreq           400

#
# Timestep & friends

```

```

#
timestep                2.0
stepsPerCycle           20
nonBondedFreq           1
fullElectFrequency      2

#
# Simulation space partitioning
#
switching                on
switchDist               7
cutoff                   8
pairlistdist             9
# twoAwayX                yes

#
# Basic dynamics
#
COMmotion                no
dielectric                1.0
exclude                  scaled1-4
1-4scaling                0.833333
rigidbonds                all

#
# Particle Mesh Ewald parameters.
#
Pme                      on
PmeGridsizeX              40          # <===== CHANGE ME
PmeGridsizeY              40          # <===== CHANGE ME
PmeGridsizeZ              40          # <===== CHANGE ME

#
# Periodic boundary things
#
wrapWater                 on
wrapNearest               on
wrapAll                    on

```

```

#
# Langevin dynamics parameters
#
langevin          on
langevinDamping   1
langevinTemp      320          # <===== Check me
langevinHydrogen  off

langevinPiston    on
langevinPistonTarget  1.01325
langevinPistonPeriod  400
langevinPistonDecay  200
langevinPistonTemp  320          # <===== Check me

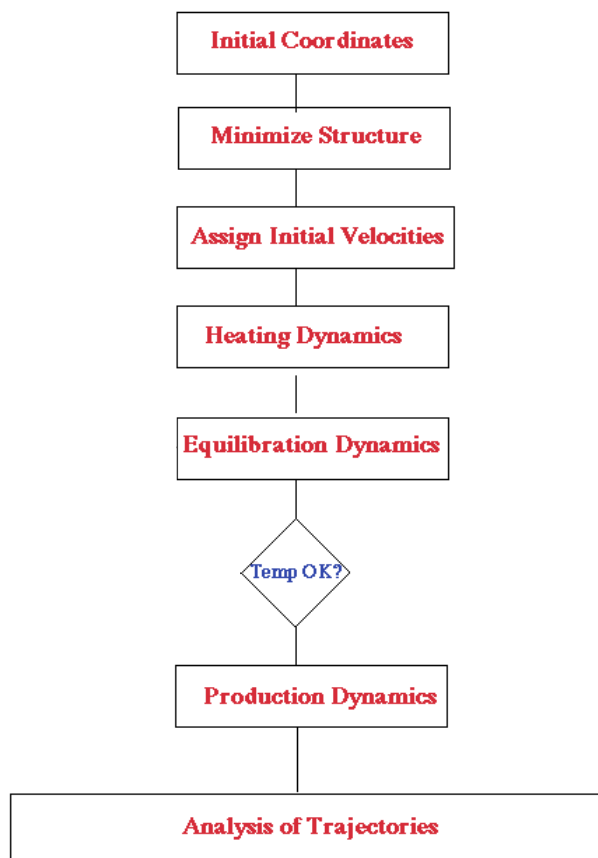
useGroupPressure  yes

firsttimestep     30000        # <===== CHANGE ME
run               500000000    ;# <===== CHANGE ME

```

2.2.3. Προετοιμασία συστήματος και στάδια προσομοίωσης

Η διεξαγωγή μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής απαιτεί μια συγκεκριμένη σειρά βημάτων που πρέπει να γίνουν. Το αποτέλεσμα της προσομοίωσης δίνει ένα τροχιακό που αποτελεί μια χρονική αλληλουχία από διαμορφώσεις.



Εικόνα 7: (αναπαράγεται άνευ αδείας) Βήματα για τη διεξαγωγή προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής.
http://www.ch.embnet.org/MD_tutorial/

Τα βήματα που πρέπει να γίνουν είναι η αρχικοποίηση των συντεταγμένων, η ελαχιστοποίηση της ενέργειας, η ανάθεση αρχικών ταχυτήτων, η θέρμανση, η εξισορρόπηση, ο έλεγχος θερμοκρασίας, η παραγωγική φάση και τέλος, η ανάλυση των τροχιακών.

Αρχικοποίηση συντεταγμένων

Αρχικά, πριν αρχίσει η προσομοίωση μοριακής δυναμικής, θα πρέπει να επιλεγθεί η αρχική διαμόρφωση του συστήματος, δηλαδή ένα σημείο εκκίνησης ή ένα $t = 0$. Σε πολλές προσομοιώσεις βιομορίων χρησιμοποιείται μια ήδη προσδιορισμένη δομή από X-ray ή NMR ως αρχική δομή. Επίσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και μια θεωρητική δομή από homology modeling. Η αρχικοποίηση είναι πολύ σημαντική καθώς επηρεάζει την ποιότητα της προσομοίωσης. Η αρχική δομή του πεπτιδίου Αβ₁₇₋₃₄ ήταν σε αποδιαταγμένη μορφή (extended state).

Ελαχιστοποίηση ενέργειας

Ελαχιστοποίηση ενέργειας γίνεται με σκοπό να αφαιρεθούν οποιοσδήποτε δυνατές van der Waals αλληλεπιδράσεις, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τα παραγόμενα δεδομένα (οδηγούν σε ασταθή προσομοίωση).

Θέρμανση

Κατά τη θέρμανση, οι αρχικές ταχύτητες αναθέτονται σε χαμηλή θερμοκρασία και αρχίζει η προσομοίωση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, νέες ταχύτητες αναθέτονται σε ελαφρώς υψηλότερη θερμοκρασία καθώς η προσομοίωση συνεχίζει κανονικά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία. Στην παρούσα προσομοίωση, τα όρια θερμοκρασίας είναι από 280K έως 480K σύμφωνα με τη μέθοδο adaptive tempering του NAMD. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, αν η δυναμική ενέργεια από την παραγόμενη δομή είναι μικρότερη από τη μέση τιμή της δυναμικής ενέργειας του συστήματος, τότε η θερμοκρασία αυξάνεται, ενώ αν η δυναμική ενέργεια της παραγόμενης δομής είναι υψηλότερη από τη μέση τιμή της δυναμικής ενέργειας του συστήματος, τότε η θερμοκρασία μειώνεται.

Εξισορρόπηση

Αυτή η φάση αναφέρεται στο δεύτερο νόμο του Νεύτωνα, ο οποίος εφαρμόζεται σε κάθε άτομο του συστήματος καθορίζοντας το τροχιακό του. Σε αυτό το στάδιο παρατηρούνται διάφορα χαρακτηριστικά του συστήματος, όπως η δομή, η πίεση, η θερμοκρασία και η ενέργεια. Η προσομοίωση συνεχίζεται μέχρι τα παραπάνω χαρακτηριστικά να παραμένουν σταθερά σε σχέση με το χρόνο.

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας και της πίεσης έγινε με τη χρήση του δυναμικού Langevin, ενώ ο υπολογισμός των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων έγινε με βάση τη μέθοδο Particle Mesh Ewald (PME).

Παραγωγική φάση

Η παραγωγική φάση αποτελεί το τελευταίο βήμα της προσομοίωσης (πριν την ανάλυση των αποτελεσμάτων). Κατά τη φάση αυτή, η προσομοίωση

εκτελείται για την επιθυμητή χρονική διάρκεια, η οποία μπορεί να διαρκεί από εκατοντάδες μs έως ns (ή και περισσότερο). Η είσοδος για την έναρξη αυτής της φάσης αποτελείται από τις συντεταγμένες, τις ταχύτητες και την ενέργεια του συστήματος που καταγράφηκαν στην προηγούμενη φάση. Από την προσομοίωση παράχθηκαν 17.970.200 διαμορφώσεις (frames).

3. Αποτελέσματα

3.1. Εισαγωγή

Με βάση τα πειράματά τους στην εύρεση της δομής του Αβ₁₇₋₃₄ με NMR οι Fonar και Samson αναφέρουν στη δημοσίευσή τους ότι «To the best of our knowledge, this study is the first to report an α -helix in Αβ in aqueous environment and at physiological conditions» (25).

Όπως προαναφέρθηκε, θα μελετηθεί η διαδικασία αναδίπλωσης του πεπτιδίου Αβ₁₇₋₃₄ και θα συγκριθούν τα αποτελέσματα της προσομοίωσης με πειραματικά αποτελέσματα. Χρησιμοποιήθηκαν κυρίως δύο προγράμματα για την ανάλυση του τροχιακού, το carma (43) και το grcarma (44). Τα παραπάνω χρησιμοποιούν δύο αρχεία εισόδου, ένα DCD αρχείο και ένα PSF αρχείο. Το πρώτο από αυτά τα αρχεία περιέχει το τροχιακό που παράχθηκε από την προσομοίωση (περιέχει τις συντεταγμένες από όλα τα άτομα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης). Κάθε σετ συντεταγμένων αντιστοιχεί σε μια διαμόρφωση (frame). Από την άλλη, το αρχείο PSF περιέχει τη δομική πληροφορία (π.χ. άτομα, δεσμούς, γωνίες κλπ.). Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι στην προσομοίωση (όπως και στο πείραμα) είχαν προστεθεί στα δύο άκρα από δύο γλουταμικά οξέα.

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Ανάλυση χαρτών RMSD (RMSD matrix)
- Ανάλυση δευτεροταγούς δομής (STRIDE)
- Ανάλυση με βάση τη θερμοκρασία
- Ανάλυση ομαδοποίησης (Cluster Analysis) και Ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis)
- Σύγκριση δομών από την προσομοίωση με τη δομή που προέκυψε από πειράματα NMR

3.2. Πίνακας RMSD και ανάλυση

Η RMSD (Root-Mean-Square Deviation), που χρησιμοποιείται ευρέως στη Δομική Βιολογία, υπολογίζει τη μέση απόσταση μεταξύ ατόμων μιας

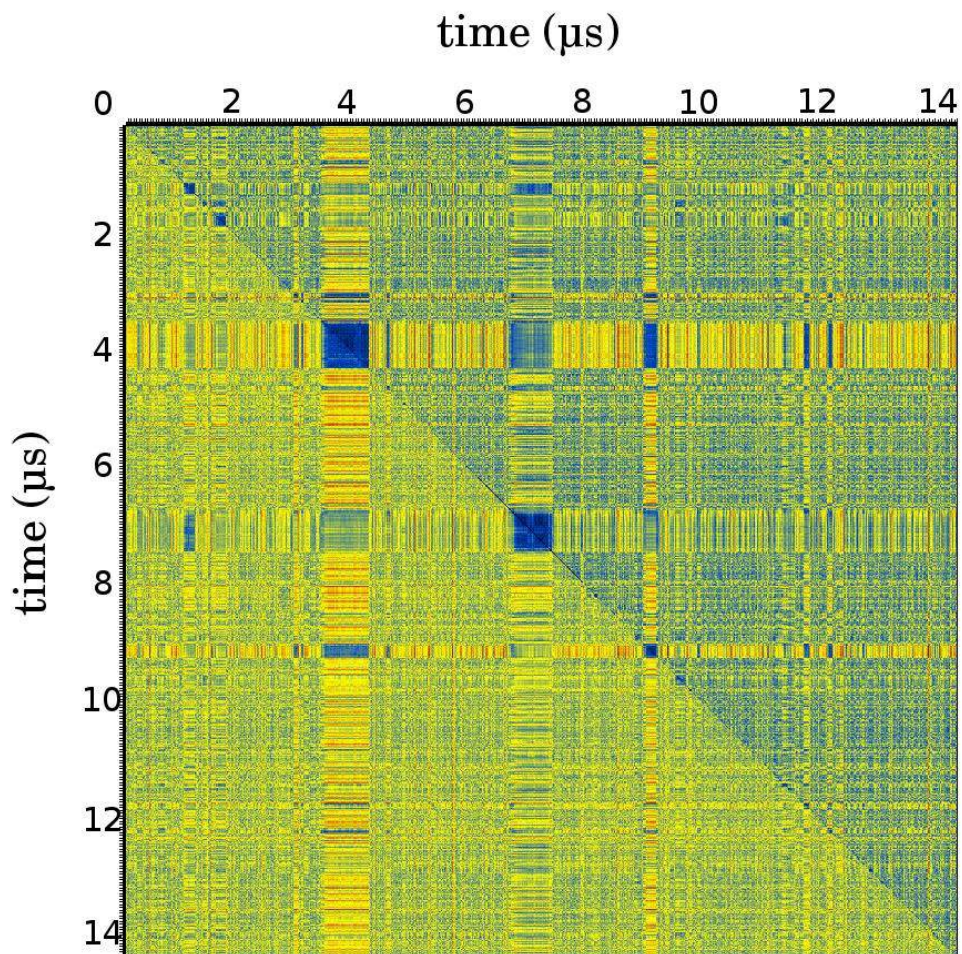
πρωτεΐνης και κάνει μια ποσοτική σύγκριση μεταξύ της δομής μια μερικώς αναδιπλωμένης πρωτεΐνης και μιας που βρίσκεται στη φυσική της διαμόρφωση. Όσο μικρότερη είναι η τιμή RMSD τόσο πιο πολύ μοιάζουν οι δύο δομές, ενώ όταν δύο δομές είναι ίδιες, η τιμή RMSD είναι 0.0 Å. Γενικά, δύο δομές εμφανίζουν κάποια ομοιότητα (σε αρκετά μεγάλο βαθμό) όταν η τιμή RMSD είναι μικρότερη από 2.0 Å. Η εξίσωση πάνω στην οποία στηρίζεται ο υπολογισμός της RMSD είναι:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{ref})^2}{N}},$$

όπου x_i είναι οι συντεταγμένες των ατόμων σε μια συγκεκριμένη στιγμή, x_{ref} είναι οι συντεταγμένες των ατόμων του μορίου αναφοράς και N είναι ο αριθμός των ατόμων.

Το αποτέλεσμα από μια ανάλυση RMSD είναι ένας πίνακας. Με τον πίνακα αυτό είναι δυνατή η σύγκριση της απόστασης οποιουδήποτε ατόμου μεταξύ κάθε δομής που προκύπτει κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Ο πίνακας είναι ένα τετράγωνο όπου στους άξονες τοποθετούνται οι δομές (κατά αύξουσα σειρά) από την πρώτη μέχρι την τελευταία δομή που προέκυψε από την προσομοίωση.

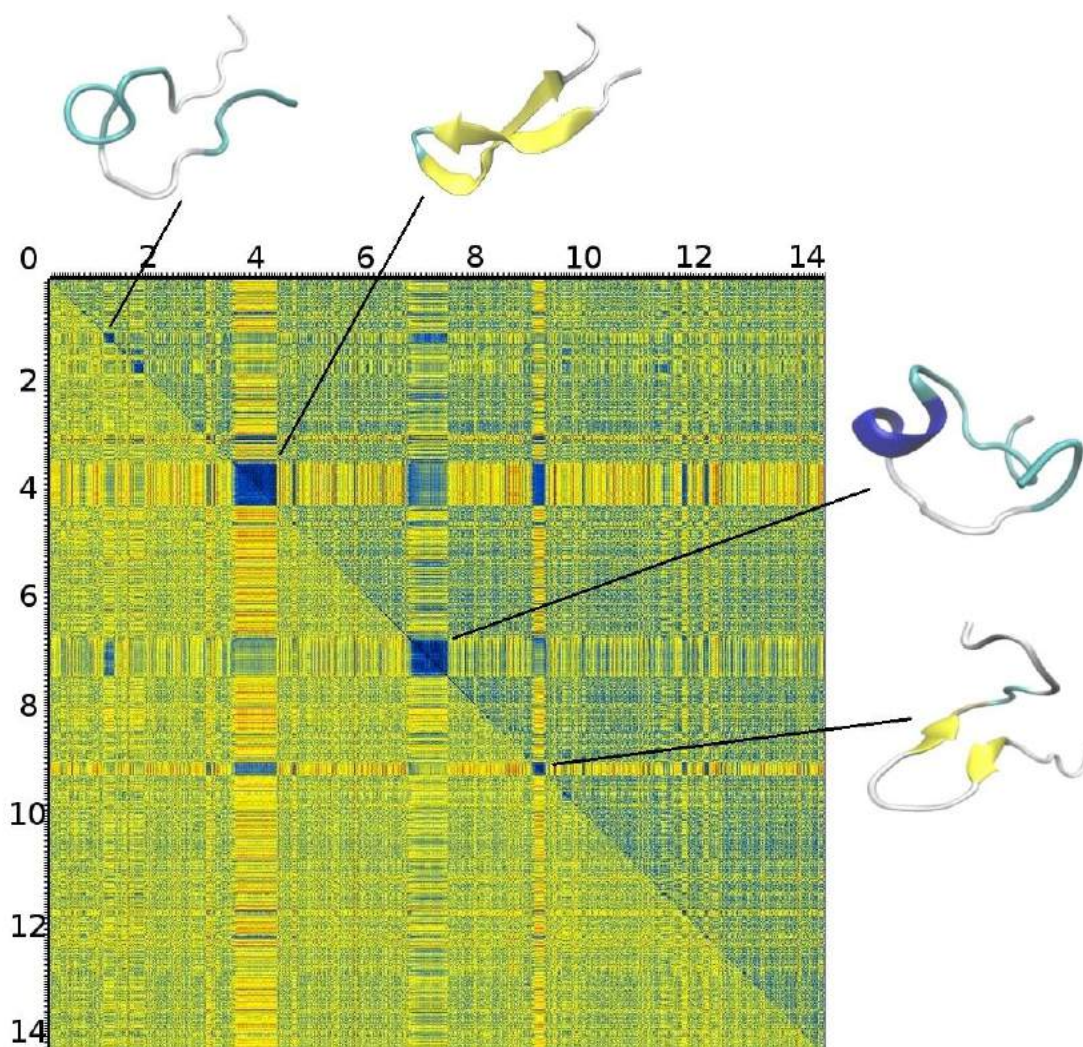
Η RMSD μεταξύ των δομών σε έναν πίνακα παρουσιάζεται με τη βοήθεια χρωματικής κλίμακας. Οι μικρές τιμές RMSD αντιστοιχούν σε σκούρο μπλε, ενώ οι μεγαλύτερες τιμές σε σκούρο κόκκινο χρώμα. Οι τιμές που βρίσκονται στην κύρια διαγώνιο είναι μηδενικές και απεικονίζονται με μαύρο χρώμα, καθώς αντιστοιχούν σε RMSD της κάθε δομής με τον εαυτό της. Όσες μπλε περιοχές βρίσκονται στο κέντρο της διαγωνίου υποδηλώνουν σταθεροποίηση της δομής για χρονικό διάστημα που είναι ανάλογο με το μήκος της περιοχής. Από την άλλη, όσες μπλε περιοχές βρίσκονται εκτός της διαγωνίου υποδηλώνουν όμοιες δομές που εμφανίστηκαν σε διαφορετικούς χρόνους κατά την προσομοίωση. Ο πίνακας RMSD που παράχθηκε από το grcarma παρουσιάζεται παρακάτω:



Εικόνα 8: Πίνακας RMSD των ατόμων backbone και heavy. Όσο πιο μπλε είναι η περιοχή, τόσο χαμηλότερη είναι η RMSD στην οποία αντιστοιχεί, ενώ όσο πιο κόκκινη είναι η περιοχή, τόσο υψηλότερη είναι η RMSD στην οποία αντιστοιχεί. Οι μπλε περιοχές που βρίσκονται στη διαγώνιο υποδεικνύουν σταθεροποίηση της δομής για χρονικό διάστημα ανάλογο με το μήκος της περιοχής ενώ αυτές που βρίσκονται εκτός της διαγωνίου υποδεικνύουν δομές όμοιες που εμφανίστηκαν σε διαφορετικούς χρόνους κατά την προσομοίωση.

Το επάνω μέρος του πίνακα αντιστοιχεί στα άτομα της κύριας αλυσίδας (backbone) και το κάτω μισό του πίνακα αντιστοιχεί στα βαριά άτομα (heavy). Το πεπτίδιο φαίνεται να είναι ασταθές και να μην έχει κάποια σταθερή δομή που να διακρίνεται σε σχέση με τις υπόλοιπες, καθώς δεν υιοθετεί μια συγκεκριμένη διαμόρφωση για μεγάλο χρονικό διάστημα (οι μπλε περιοχές είναι μικρές σε έκταση). Όμως, υπάρχουν κάποιες διακριτές στιγμές (τέσσερις) κατά τις οποίες το πεπτίδιο βρίσκεται σε αναδιπλωμένη κατάσταση. Η πρώτη στιγμή βρίσκεται περίπου στο 1 μ s, η δεύτερη στα 3,8-4,2 μ s, η τρίτη στα 6,8-7,2 μ s και η τέταρτη στα 9-9,3 μ s. Παρακάτω απεικονίζονται οι δομές για τις

τέσσερις αυτές χρονικές περιόδους με τη βοήθεια του προγράμματος VMD (Visual Molecular Dynamics).



Εικόνα 9: Πίνακας RMSD στον οποίο απεικονίζονται οι αντιπροσωπευτικές δομές τις χρονικές στιγμές που φαίνεται πως το πεπτιδίο είναι σε αναδιπλωμένη κατάσταση. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε 3_{10} έλικα, το κίτρινο σε β πτυχωτή επιφάνεια, το κυανό σε στροφή και το άσπρο σε σπείραμα.

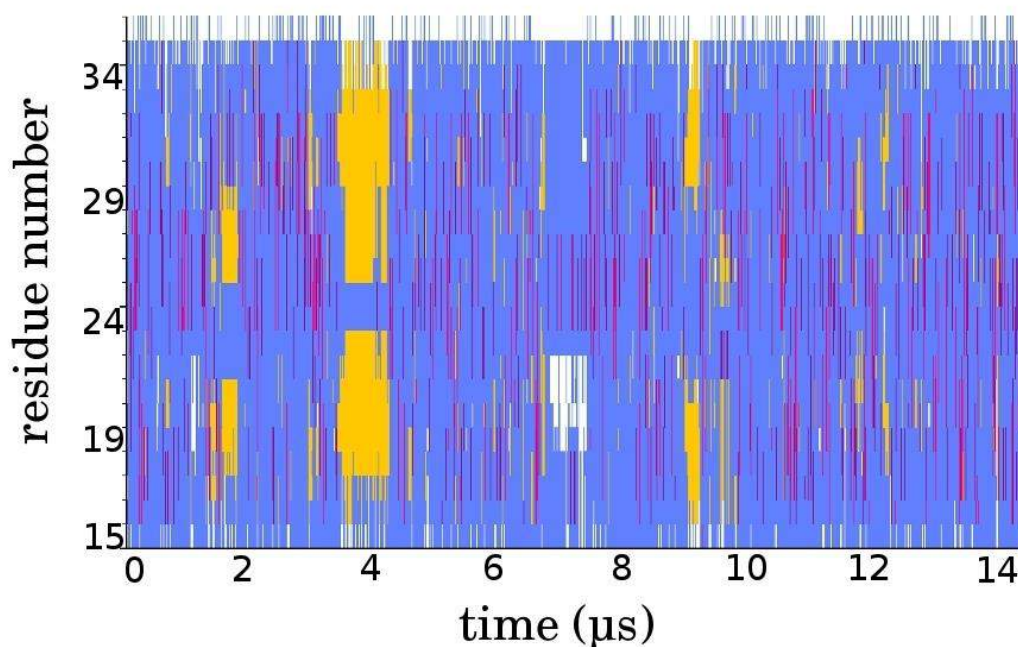
3.3. Ανάθεση δευτεροταγούς δομής

Η γνώση της δευτεροταγούς δομής αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STRIDE (STRuctural IDentification) (45). Το πρόγραμμα ανάθεσης δευτεροταγούς δομής STRIDE προσδιορίζει τη

δευτεροταγή δομή χρησιμοποιώντας την ενέργεια από τους δεσμούς υδρογόνου και πληροφορίες για τις διεδρες γωνίες της κύριας αλυσίδας.

Το αποτέλεσμα που παράγει το πρόγραμμα STRIDE είναι μια χρωματική αναπαράσταση για ολόκληρο το τροχιακό της προσομοίωσης. Η αντιστοίχιση των χρωμάτων σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής είναι η εξής:

- α-έλικα → ροζ
- β-φύλλο → κίτρινο
- 3_{10} έλικα → μωβ
- στροφή → μπλε
- τυχαίο σπείραμα → λευκό

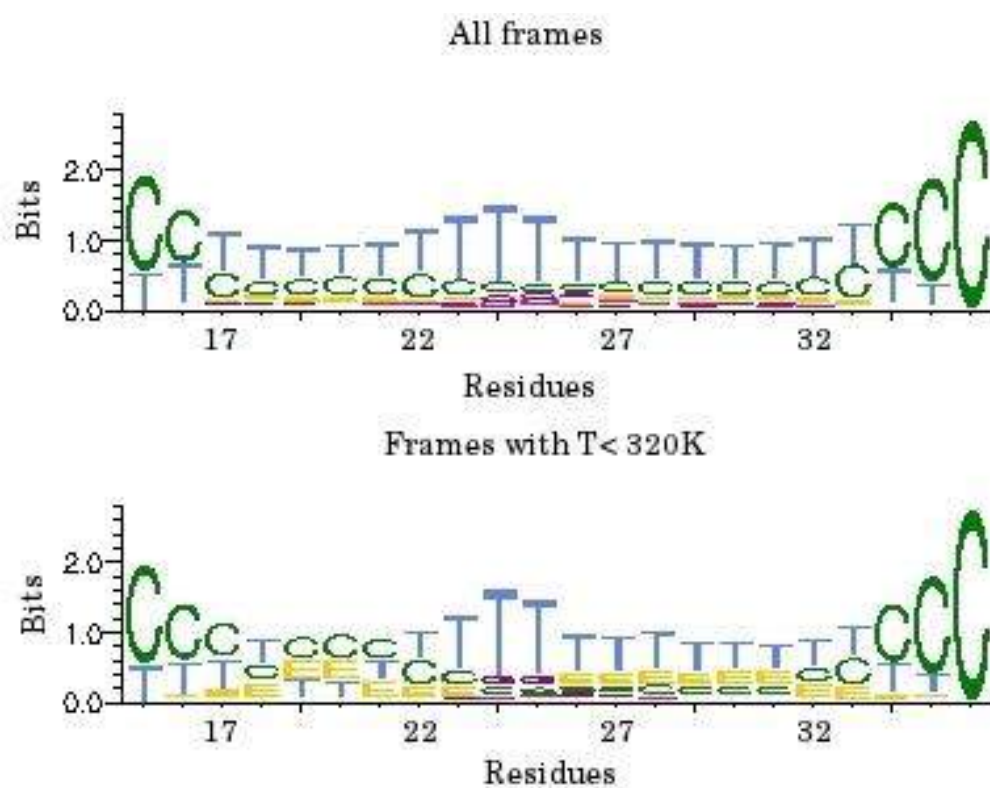


Εικόνα 10: Ανάθεση δευτεροταγούς δομής με χρωματική αναπαράσταση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής σε σχέση με το χρόνο της προσομοίωσης. Στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχούν οι διαμορφώσεις κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης ενώ στον κάθετο άξονα αντιστοιχούν τα αμινοξέα του πεπτιδίου Αβ₁₇₋₃₄. Η α-έλικα αντιστοιχεί σε ροζ, το β-φύλλο σε κίτρινο, η 3_{10} έλικα σε μωβ, η στροφή σε μπλε και το τυχαίο σπείραμα σε λευκό.

Το πρόγραμμα WebLogo παράγει μια αναπαράσταση της αλληλουχίας μέσω ενός πίνακα. Ο πίνακας αυτός αποτελείται από γράμματα τα οποία είναι στοιβαγμένα. Κάθε γράμμα αντιστοιχεί σε ένα κατάλοιπο της αλληλουχίας και το γράμμα με την υψηλότερη συχνότητα εμφανίζεται στο επάνω μέρος της

στοίβας (46). Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα από το WebLogo, τόσο για όλες τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης όσο και για τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K. Η αντιστοίχιση των γραμμάτων σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής είναι η εξής:

- H → α-έλικα
- E → β-φύλλο
- G → 3_{10} έλικα
- T → στροφή
- C → τυχαίο σπείραμα



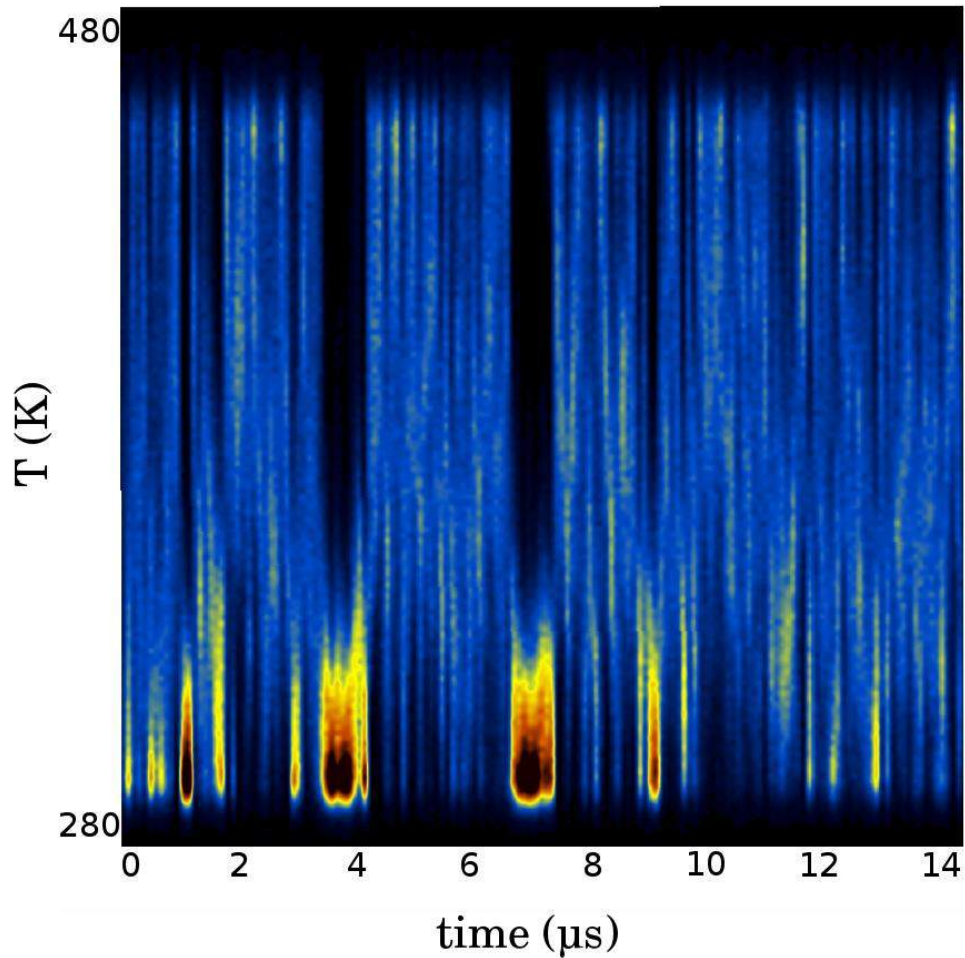
Εικόνα 11: Ανάθεση δευτεροταγούς δομής με το πρόγραμμα WebLogo. Επάνω: για όλες τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης. Κάτω: για τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη από 320K. Το γράμμα H αντιστοιχεί σε α-έλικα, το E σε β-φύλλο, το G σε 3_{10} έλικα, το T σε στροφή και το C σε τυχαίο σπείραμα.

Παρατηρώντας τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι το πεππίδιο ταλαντεύεται ανάμεσα σε διάφορες διαμορφώσεις και ειδικότερα ανάμεσα σε α-έλικα, β-φύλλο και στροφή. Παρ' όλ' αυτά δεν είναι δυνατή μια ξεκάθαρη διάκριση δομής καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, εκτός από την τάση του να επιλέγει τη στροφή (Εικόνα 10). Στην Εικόνα 10 διακρίνεται αυτή η

αστάθεια του πεπτιδίου, καθώς το μεγαλύτερο μέρος του έχει την τάση να σχηματίζει στροφή καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης. Εκτός από τα δύο πρώτα και τα δύο τελευταία αμινοξέα (γλουταμικά οξέα) που υιοθετούν δομή κυρίως στροφής και τυχαίου σπειράματος, τα υπόλοιπα παίρνουν τη μορφή στροφής. Υπάρχουν, βέβαια, κάποιες στιγμές που υιοθετείται ξεκάθαρα η δομή του β-φύλλου από τα αμινοξέα 18-21 και 26-29, 18-23 και 26-34, 16-20 και 30-34, ενώ το υπόλοιπο πεπτίδιο έχει τη μορφή στροφής. Οι στιγμές αυτές κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης είναι λίγο πριν τα 2μs, στα 4μs και λίγο μετά τα 9μs, αντίστοιχα. Επίσης, υπάρχει ένα χρονικό διάστημα στα 7μs κατά το οποίο τα αμινοξέα 19-22 υιοθετούν τη δομή του τυχαίου σπειράματος τη στιγμή που τα υπόλοιπα αμινοξέα υιοθετούν κυρίως τη δομή της στροφής (απεικονίζονται και εξαιρετικά μικρές στιγμές όπου κάποια αμινοξέα παίρνουν τη μορφή της α-έλικας). Τα παραπάνω συμπεράσματα από την Εικόνα 10, συμφωνούν και με την Εικόνα 11, αν και στην αναπαράσταση όλων των διαμορφώσεων υπάρχει μια ξεκάθαρη προτίμηση για στροφή σε όλο το μήκος της αλληλουχίας ενώ για τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K, η προτίμηση των αμινοξέων είναι μεγαλύτερη για στροφή αλλά υπάρχουν και προτιμήσεις για τυχαίο σπείραμα καθώς και για β-φύλλο.

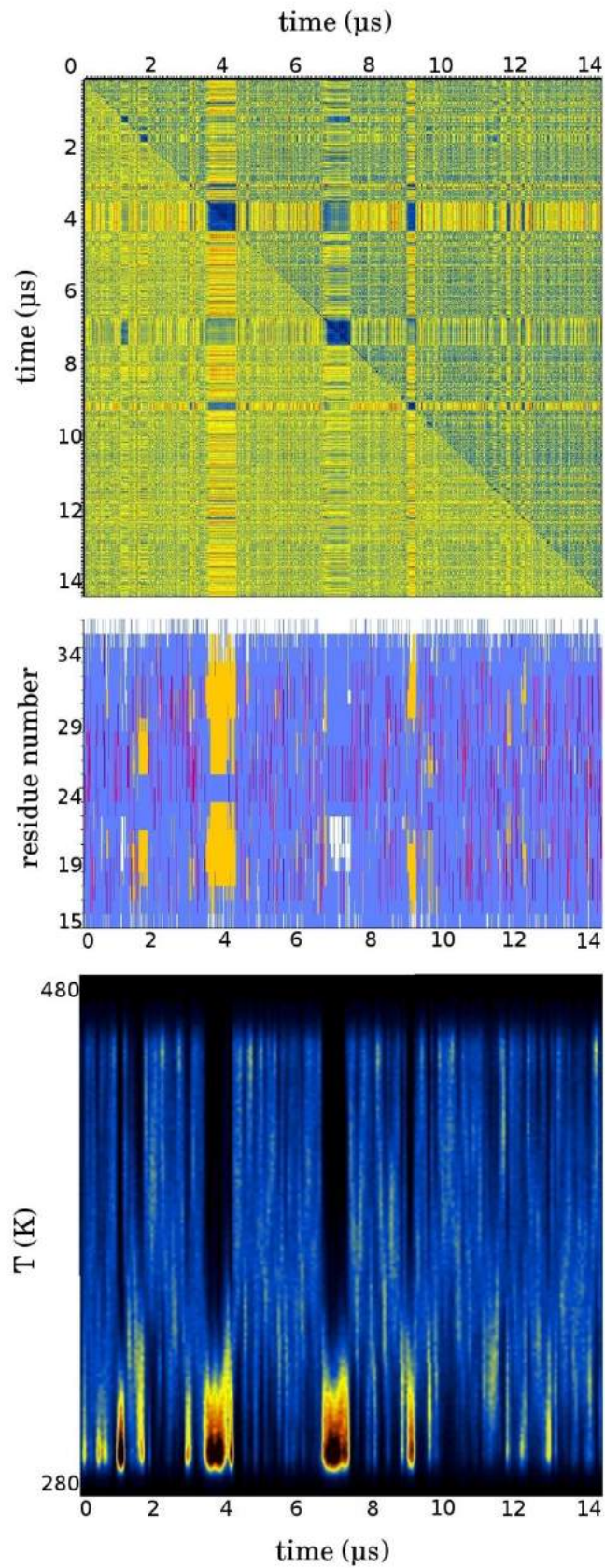
3.4. Αναλύσεις με βάση τη θερμοκρασία

Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης χρησιμοποιήθηκε adaptive tempering κι έτσι είναι δυνατή η περαιτέρω ανάλυση του παραγόμενου τροχιακού με βάση τη θερμοκρασία κάθε διαμόρφωσης του τροχιακού. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης αυτής απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 12). Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε μικρό αριθμό διαμορφώσεων, το κίτρινο σε μεσαίο αριθμό διαμορφώσεων και το κόκκινο καθώς και το μαύρο αντιστοιχούν σε μεγάλο αριθμό διαμορφώσεων.



Εικόνα 12: Διάγραμμα κατανομής της θερμοκρασίας σε σχέση με το συνολικό χρόνο της προσομοίωσης. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε μικρό αριθμό διαμορφώσεων, το κίτρινο σε μεσαίο αριθμό διαμορφώσεων και το κόκκινο καθώς και το μαύρο σε μεγάλο αριθμό διαμορφώσεων.

Όπως ήταν αναμενόμενο, στις χαμηλές θερμοκρασίες (μικρότερες από 320K) συναντώνται οι σταθερές δομές που διακρίθηκαν από τις παραπάνω εικόνες. Αυτό φαίνεται καλύτερα στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 13: Απεικόνιση ανάλυσης RMSD, ανάλυση δευτεροταγούς δομής και κατανομής θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο. Φαίνεται ότι οι σταθερές δομές αντιστοιχούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (μικρότερες από 320K).

3.5. Ανάλυση ομαδοποίησης (Cluster Analysis) και Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis)

Η ομαδοποίηση αφορά το διαχωρισμό σε μικρότερες ομάδες μιας μεγάλης ομάδας αντικειμένων (δεδομένων) με σκοπό την απόκτηση παραπάνω πληροφορίας και δυνατότητας ανάλυσής της. Δεν υπάρχει σαφής ορισμός της λέξης cluster, καθώς αυτή χρησιμοποιείται υποκειμενικά με βάση την τεχνική στην οποία εφαρμόζεται (47). Τα δεδομένα που βρίσκονται στην ίδια ομάδα μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους σε σχέση με τα δεδομένα που βρίσκονται στις άλλες ομάδες και η ομαδοποίηση αυτή διευκολύνει τον εντοπισμό μοτίβων κίνησης.

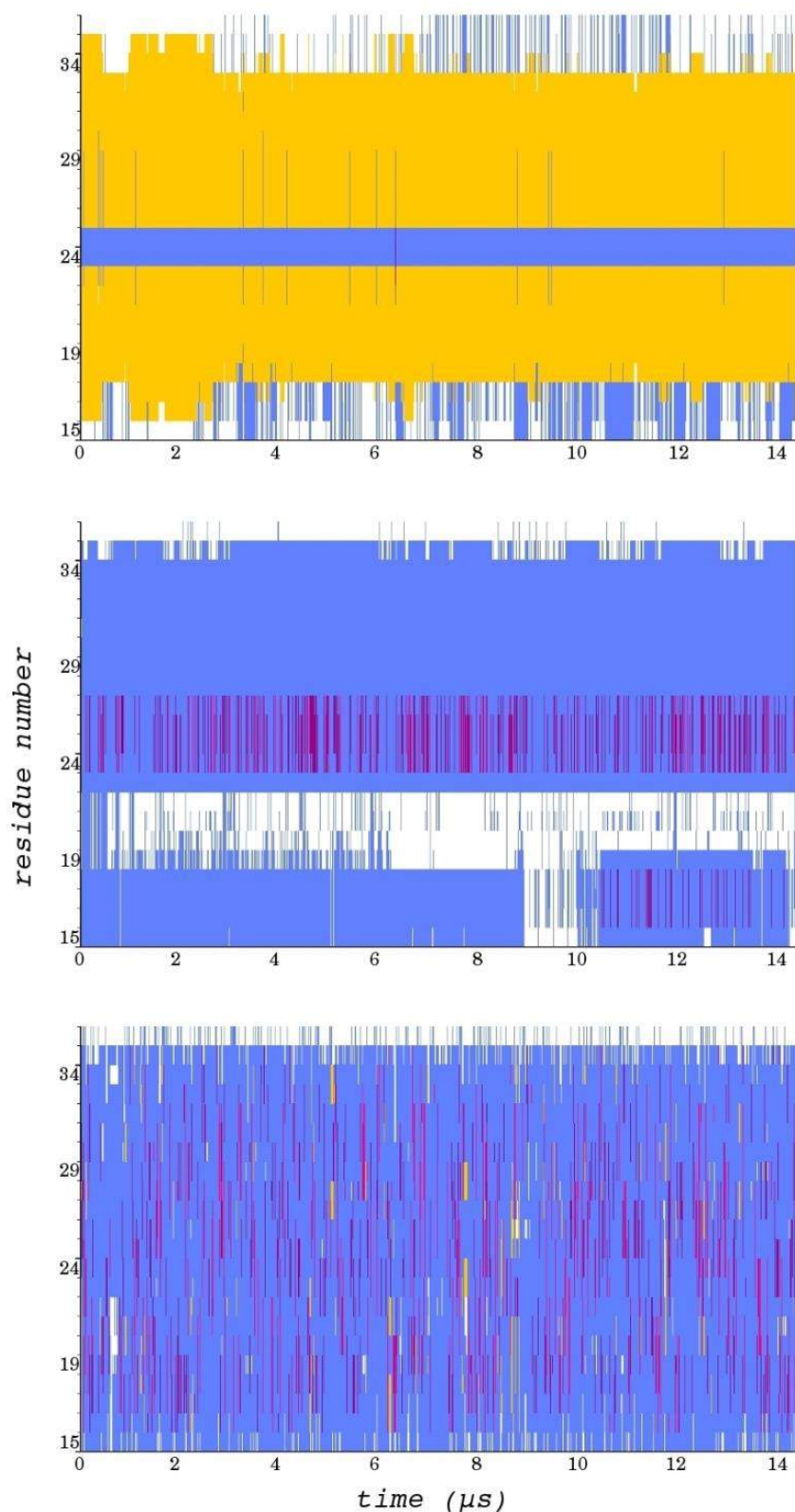
Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), ή όπως ονομάζεται αλλιώς ανάλυση quasiharmonic ή μέθοδος essential dynamics, αποτελεί μια από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους στη συστηματική μείωση των διαστάσεων ενός πολύπλοκου συστήματος καθώς μειώνοντας τον αριθμό των διαστάσεων είναι δυνατή η ανάλυση των δεδομένων. Εξάγει τα πιο σημαντικά στοιχεία των δεδομένων χρησιμοποιώντας έναν πίνακα συσχέτισης. Υπάρχουν δύο κατηγορίες ανάλυσης κύριων συνιστωσών που χρησιμοποιούνται στα τροχιακά από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής: η cPCA (Cartesian PCA) και η dPCA (Dihedral PCA). Στην πρώτη περίπτωση, η μείωση των διαστάσεων βασίζεται στις καρτεσιανές συντεταγμένες των ατόμων που ορίζουν τις ατομικές μετατοπίσεις σε κάθε διαμόρφωση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση, η μείωση των διαστάσεων βασίζεται στις δίεδρες γωνίες (ϕ, ψ) της κύριας αλυσίδας (48) (49).

Εφαρμόστηκε dihedral Principal Component Analysis (dPCA), χωρίς τις γωνίες χ_1 , στο τροχιακό της προσομοίωσης. Οι αναλύσεις έγιναν με το πρόγραμμα grcarma, στο οποίο είχε δοθεί η εντολή να εξάγει το maximum 10 ομάδες (clusters). Υπολογίστηκαν τα ενεργειακά τοπία, ανά ζεύγη, τα οποία προκύπτουν από την προβολή των τροχιακών στα επίπεδα που ορίζονται από τους τρεις πρώτους eigenvectors που έχουν τα μεγαλύτερα eigenvalues. Οι ομάδες που εντοπίστηκαν από το πρόγραμμα είναι οι εξής:

- Cluster 1: 611.558 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 2: 536.168 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 3: 43.273 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 4: 25.516 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 5: 87.842 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 6: 53.803 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 7: 16.834 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 8: 4.051.592 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 9: 25.596 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις
- Cluster 10: 37.800 από τις 17.970.200 διαμορφώσεις

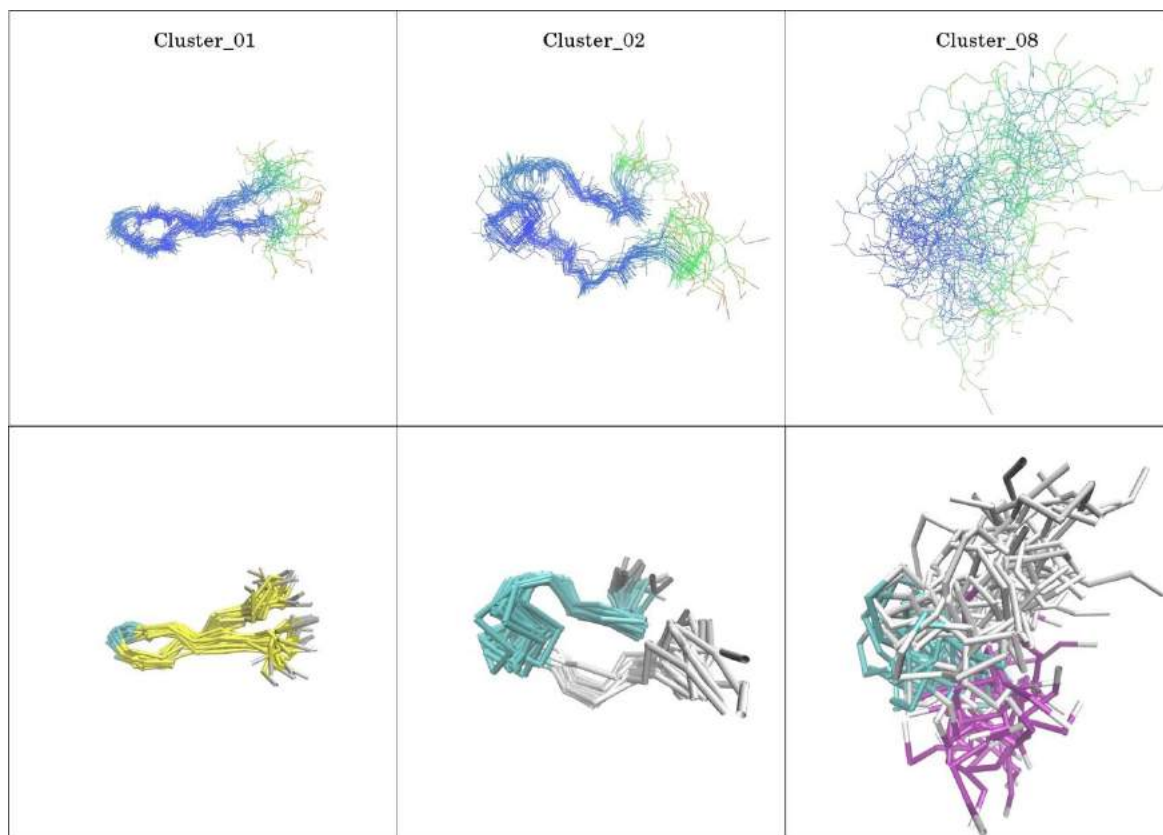
Το πρόγραμμα απέδωσε σε clusters 5.489.982 διαμορφώσεις (ποσοστό περίπου 30,5% του συνολικού τροχιακού). Η πρώτη ομάδα, δηλαδή το cluster με τις περισσότερες διαμορφώσεις (το 8^ο από τα 10), αντιστοιχεί περίπου στο 22,5% του συνολικού τροχιακού, η δεύτερη ομάδα (το 1^ο από τα 10) αντιστοιχεί περίπου στο 3,4% του συνολικού τροχιακού και η τρίτη ομάδα (το 2^ο από τα 10) αντιστοιχεί περίπου στο 2,3% του συνολικού τροχιακού.

Στη συνέχεια αναλύονται περαιτέρω τα τρία μεγαλύτερα clusters. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάθεσης δευτεροταγούς δομής STRIDE για το 1^ο, το 2^ο και το 8^ο cluster. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:



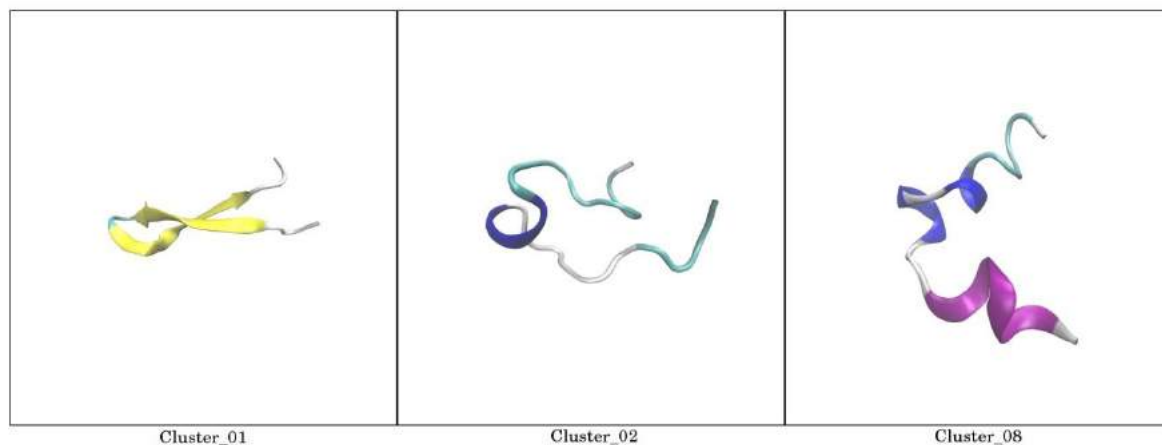
Εικόνα 14: Ανάθεση δευτεροταγούς δομής με χρωματική αναπαράσταση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής σε σχέση με το χρόνο της προσομοίωσης για τις διαμορφώσεις των clusters 1, 2 και 8. Από πάνω προς τα κάτω: cluster 1, cluster 2 και cluster 8. Στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχούν οι διαμορφώσεις κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, ενώ στον κάθετο άξονα αντιστοιχούν τα αμινοξέα του πεπτιδίου Αβ₁₇₋₃₄. Η α-έλικα αντιστοιχεί σε ροζ, το β-φύλλο σε κίτρινο, η 3_{10} έλικα σε μωβ, η στροφή σε μπλε και το τυχαίο σπείραμα σε λευκό.

Με υπέρθεση των δομών των τριών clusters, με τη βοήθεια του προγράμματος VMD, παίρνουμε τις παρακάτω εικόνες:



Εικόνα 15: Υπέρθεση 25 δομών από καθένα από τα clusters 1,2 και 8. Επάνω απεικονίζονται με χρωματική κλίμακα όπου το χρώμα μπλε αντιστοιχεί στις μικρότερες τιμές rmsf, το πράσινο σε ενδιάμεσες τιμές και το κόκκινο στις μεγαλύτερες τιμές rmsf. Κάτω απεικονίζονται οι ίδιες δομές όπου το χρώμα αντιστοιχεί στη δευτεροταγή δομή. Το μωβ χρώμα αντιστοιχεί σε α-έλικα, το κίτρινο σε β πτυχωτή επιφάνεια, το κυανό σε στροφή και το άσπρο σε σπείραμα.

Οι αντιπροσωπευτικές δομές για καθένα από τα παραπάνω clusters είναι οι εξής:



Εικόνα 16: Οι αντιπροσωπευτικές δομές για τα clusters 1, 2 και 8 (από αριστερά προς τα δεξιά) όπως αποδόθηκαν από το πρόγραμμα gcrarna. Οι απεικονίσεις έγιναν με το πρόγραμμα VMD. Το μωβ χρώμα αντιστοιχεί σε α-έλικα, το μπλε σε 3_{10} έλικα, το κίτρινο σε β πτυχωτή επιφάνεια, το κυανό σε στροφή και το άσπρο σε σπείραμα.

Στην Εικόνα 14, που απεικονίζονται με χρωματική αναπαράσταση τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής, φαίνεται πως στη δομή του πρώτου γραφήματος υπάρχουν δύο β πτυχωτές επιφάνειες (κατάλοιπα 18-23 και 25-33) και μια στροφή στα κατάλοιπα 24-25. Το N- και C-τελικό άκρο δεν υιοθετεί μια σταθερή δομή καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης αλλά ταλαντεύεται ανάμεσα σε στροφή, τυχαίο σπείραμα και β πτυχωτή επιφάνεια. Όσον αφορά το δεύτερο γράφημα, φαίνεται να υιοθετείται η δομή της στροφής σε όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα εκτός από τα 19-22 τα οποία φαίνεται να υιοθετούν τη δομή του τυχαίου σπειράματος και τα 24-27 τα οποία φαίνεται να προτιμούν τη δομή της α- και 3_{10} έλικας. Υπάρχει, βέβαια, και μια στιγμή γύρω στα 9-10 μs κατά την οποία τα αμινοξέα 15-18 φαίνεται να προτιμούν τη δομή του τυχαίου σπειράματος. Τέλος, στο τρίτο γράφημα φαίνεται να ταλαντεύονται οι διαμορφώσεις ανάμεσα σε διάφορες δευτεροταγείς δομές, και κυρίως ανάμεσα σε στροφή και έλικες (α- και 3_{10} έλικα) αν και υπάρχουν και αρκετές δυσδιάκριτες στιγμές κατά τις οποίες υιοθετείται η δομή του τυχαίου σπειράματος από διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα.

Τα παραπάνω συμπεράσματα είναι ορατά και από την Εικόνα 15, στην οποία γίνεται υπέρθεση 25 διαμορφώσεων από κάθε cluster, αλλά και από

την αντιπροσωπευτική δομή του κάθε cluster (Εικόνα 16). Στο 1^ο cluster φαίνονται οι δύο β πτυχωτές επιφάνειες οι οποίες χωρίζονται από μια στροφή, στο 2^ο cluster φαίνεται η διαμόρφωση της στροφής και του τυχαίου σπειράματος και στο 3^ο cluster φαίνεται η διαμόρφωση του τυχαίου σπειράματος, της στροφής και της α-έλικας. Τέλος, και οι αντιπροσωπευτικές δομές καθενός από τα 3 clusters φαίνεται να ταιριάζουν με τα αποτελέσματα από το STRIDE.

3.6. NOEs

Το φάσμα NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) είναι πολύ χρήσιμο στη φασματοσκοπία NMR. Τα σήματα που δίνει το NOE είναι πιθανό να βοηθήσουν στην επιβεβαίωση τόσο της δευτεροταγούς όσο και της τριτοταγούς δομής, αφού είναι δυνατό να μελετηθούν τμήματα της πρωτεΐνης τα οποία είναι απομακρυσμένα (που χωρίζονται από πολλούς δεσμούς) στην πρωτοταγή δομή αλλά είναι κοντά στο χώρο. Με άλλα λόγια το φάσμα NOE δίνει κορυφές μεταξύ ζευγών ατόμων υδρογόνου που βρίσκονται κοντά στο χώρο, ανεξάρτητα αν ανήκουν σε αμινοξέα που βρίσκονται μακριά στην πρωτοταγή δομή. Τα σήματα που δίνει το φάσμα NOE αφορούν άτομα υδρογόνου που βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 5 Å.

Το σήμα που δίνει το φάσμα NOE εξαρτάται από την απόσταση των δύο ατόμων:

$$\text{NOE} = 1/r^6 f(t_c),$$

όπου το r είναι η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων και το t_c είναι ο χρόνος που απαιτείται για μια πλήρη περιστροφή για 1 rad. Αυτό που εξάγεται από το φάσμα NOE (από την ταυτοποίηση των σημάτων NMR) είναι μια λίστα με περιορισμούς στην απόσταση (distance restraints) μεταξύ συγκεκριμένων ζευγών υδρογόνου. Τα σήματα NOE στηρίζονται στην r^{-6} απόσταση των πυρήνων. Η λίστα περιέχει έναν μεγάλο αριθμό τέτοιων αποστάσεων που χωρίζονται (συνήθως) σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την ένταση της κορυφής. Μέσω της λίστας αυτή, είναι δυνατή η αναγνώριση στοιχείων

δευτεροταγούς δομής καθώς σε αυτά υπάρχουν πολύ συγκεκριμένα μοτίβα στα οποία αλληλεπιδρούν τα υδρογόνα των ατόμων τους (1) (50).

Τα NOEs που προέκυψαν από την προσομοίωση υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν με τα δεδομένα που προέκυψαν από το πείραμα. Δημιουργήθηκε μια λίστα με όλα τα πιθανά ζεύγη πρωτονίων, χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα σε γλώσσα Perl, το prep_proton.pl, το οποίο βασίστηκε στο αρχείο PSF της προσομοίωσης. Στη λίστα παρέμειναν όσα ζευγάρια είχαν παρατηρηθεί και στο πείραμα. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία μιας λίστας με 19 ζεύγη από υδρογόνα του αζώτου που είναι συνδεδεμένα με υδρογόνα του C_α.

Οι αποστάσεις r^{-3} και r^{-6} υπολογίστηκαν με ένα πρόγραμμα σε γλώσσα C, το noe_averaging. Τα σήματα NOEs υπολογίστηκαν για όλες τις διαμορφώσεις του τροχιακού, για τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K και τέλος, για όλες τις διαμορφώσεις ξεκινώντας από τη διαμόρφωση 6.000.000 (και όχι από την αρχή του τροχιακού).

Για την αξιολόγηση ανάμεσα στα πειραματικά αποτελέσματα και αυτά από την προσομοίωση μοριακής δυναμικής, χρησιμοποιήθηκε το upper bound violation (ανώτατο όριο παραβίασης). Με αυτό μπορεί να βρεθεί οποιαδήποτε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο αποτελέσματα (πειράματος και προσομοίωσης). Ένας περιορισμός (restraint) δε θεωρείται upper bound violation αν η τιμή του r^{-6} είναι μικρότερη από την τιμή του upper bound του NOE. Για να γίνει πιο κατανοητό, αν το σήμα έχει χαρακτηριστεί πειραματικά ως δυνατό αλλά το r^{-6} δεν ανήκει μέσα στα όρια του δυνατού σήματος, τότε ο περιορισμός θεωρείται upper bound violation και πρέπει να προσμετρηθεί στη μέση τιμή του upper bound violation. Ο τύπος για να υπολογισθεί το upper bound violation είναι ο εξής:

$$v(i,j) = r^{-6} - nmr(i,j),$$

όπου το $v(i,j)$ είναι η παραβίαση μεταξύ των i , j και το $nmr(i,j)$ είναι η πειραματική τιμή του upper bound.

Η μέση τιμή του upper bound υπολογίζεται από το άθροισμα όλων των παρατηρούμενων upper bound violations διαιρούμενο με το συνολικό αριθμό των ζευγών πρωτονίων.

Οι τρεις ομάδες στις οποίες κατηγοριοποιούνται τα σήματα είναι οι εξής:

- Δυνατό (1,8 – 2,7 Å)
- Μέτριο (2,7 – 3,3 Å)
- Αδύναμο (3,3 – 5,0 Å)

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την προσομοίωση καθώς και τα σήματα NOEs από το πείραμα. Στον Πίνακα 1 περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα για όλες τις διαμορφώσεις του τροχιακού, στον Πίνακα 2 οι διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K, ενώ στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις διαμορφώσεις που ξεκινούν από το 6.000.000. Η συντομογραφία S αναφέρεται στο strong (δυνατό), η M στο medium (μέτριο) και η W στο weak (αδύναμο).

Αριθμός	Αριθμός αμινοξέος	Αριθμός πρωτονίων	Πειραματική ταξινόμηση	(r) ⁻⁶ (all frames)	sd (r) -6 (all frames)	Upper bound violation
1	30A – 34L	225-278	4.4 (weak)	5.114085 W	3.764820	0,714085
2	28K – 32I	196-252	4.4 (weak)	5.128102 W	4,052084	0,728102
3	27N – 31I	182-233	4.4 (weak)	5.834420 W	4.485190	1.434420
4	26S – 30A	171-223	4.4 (weak)	5.573298 W	3,875985	1,173298
5	23D – 27N	136-180	4.4 (weak)	5.024364 W	3,634233	0,624364
6	20F – 24V	91-146	4.4 (weak)	5.996636 W	4.378780	1,596636
7	19F – 23D	71-134	4.4 (weak)	5.719266 W	4,059478	1,319266
8	32I – 33G	254-271	4.0 (weak)	2.375830 S	2.289030	
9	31I – 32I	235-252	4.0 (weak)	2.404696 S	0,978383	
10	30A – 31I	225-233	4.0 (weak)	2.535327 S	1,747948	
11	28K – 29G	196-216	4.0 (weak)	2.575038 S	2,488523	
12	27N – 28K	182-194	4.0 (weak)	2.515948 S	1,975476	
13	24V – 25G	148-162	4.0 (weak)	2.746595 M	2,477066	
14	23D – 24V	136-146	4.0 (weak)	2.503680 S	2,463713	
15	22E – 23D	121-134	4.0 (weak)	2.526631 S	0,894304	
16	21A – 22E	111-119	4.0 (weak)	2.448708 S	2.480550	
17	20F – 21A	91-109	4.0 (weak)	2.517361 S	2,426603	
18	19F – 20F	71-89	4.0 (weak)	2.493266 S	2,286826	
19	18V – 19F	55-69	4.0 (weak)	2.481329 S	2,450796	

Πίνακας 1: NOEs για όλες τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης. Από αριστερά προς τα δεξιά αναγράφεται: ο αριθμός του NOE, ο αριθμός του αμινοξέος, ο αριθμός των πρωτονίων, η πειραματική ταξινόμηση, το r^{-6} για όλες τις διαμορφώσεις, η τυπική απόκλιση και το ανώτατο όριο παραβίασης.

Αριθμός	Αριθμός αμινοξέος	Αριθμός πρωτονίων	Πειραματική ταξινόμηση	$(r)^{-6}$ (320K)	sd $(r)^{-6}$ (320K)	Upper bound violation
1	30A – 34L	225-278	4.4 (weak)	5.388081 W	3,979472	0,988081
2	28K – 32I	196-252	4.4 (weak)	5.299356 W	4,193184	0,899356
3	27N – 31I	182-233	4.4 (weak)	6.143475 W	4,705122	1,743475
4	26S – 30A	171-223	4.4 (weak)	6.269939 W	4,307104	1,869939
5	23D – 27N	136-180	4.4 (weak)	5.319779 W	3,639700	0,919779
6	20F – 24V	91-146	4.4 (weak)	6.754682 W	4,827088	2,354682
7	19F – 23D	71-134	4.4 (weak)	6.519154 W	4,625087	2,119154
8	32I – 33G	254-271	4.0 (weak)	2.310166 S	2,139741	
9	31I – 32I	235-252	4.0 (weak)	2.317558 S	2,384638	
10	30A – 31I	225-233	4.0 (weak)	2.425081 S	2,505066	
11	28K – 29G	196-216	4.0 (weak)	2.570027 S	2,532954	
12	27N – 28K	182-194	4.0 (weak)	2.482100 S	2,457836	
13	24V – 25G	148-162	4.0 (weak)	2.753907 M	2,353626	
14	23D – 24V	136-146	4.0 (weak)	2.425259 S	2,469943	
15	22E – 23D	121-134	4.0 (weak)	2.572872 S	2,490953	
16	21A – 22E	111-119	4.0 (weak)	2.360956 S	2,514011	
17	20F – 21A	91-109	4.0 (weak)	2.461325 S	2,345091	
18	19F – 20F	71-89	4.0 (weak)	2.367415 S	2,103529	
19	18V – 19F	55-69	4.0 (weak)	2.402272 S	2,468860	

Πίνακας 2: NOEs για τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K. Από αριστερά προς τα δεξιά αναγράφεται: ο αριθμός του NOE, ο αριθμός του αμινοξέος, ο αριθμός των πρωτονίων, η πειραματική ταξινόμηση, το r^{-6} για τις διαμορφώσεις σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K, η τυπική απόκλιση και το ανώτατο όριο παραβίασης.

Αριθμός	Αριθμός αμινοξέος	Αριθμός πρωτονίων	Πειραματική ταξινόμηση	(r) ⁻⁶ (selected)	sd (r) ⁻⁶ (selected)	Upper bound violation
1	30A – 34L	225-278	4.4 (weak)	5.013448 W	3,725935	0,613448
2	28K – 32I	196-252	4.4 (weak)	5.058787 W	4,040627	0,658787
3	27N – 31I	182-233	4.4 (weak)	5.776257 W	4,455960	1,376257
4	26S – 30A	171-223	4.4 (weak)	5.587906 W	3,883187	1,187906
5	23D – 27N	136-180	4.4 (weak)	4.944058 W	3,561921	0,544058
6	20F – 24V	91-146	4.4 (weak)	5.921075 W	4,346999	1,521075
7	19F – 23D	71-134	4.4 (weak)	5.670083 W	4,058214	1,270083
8	32I – 33G	254-271	4.0 (weak)	2.388724 S	2,249379	
9	31I – 32I	235-252	4.0 (weak)	2.413593 S	0,945812	
10	30A – 31I	225-233	4.0 (weak)	2.551588 S	1,690421	
11	28K – 29G	196-216	4.0 (weak)	2.576745 S	2,487191	
12	27N – 28K	182-194	4.0 (weak)	2.556175 S	1,914251	
13	24V – 25G	148-162	4.0 (weak)	2.739691 S	2,439596	
14	23D – 24V	136-146	4.0 (weak)	2.509988 S	2,458800	
15	22E – 23D	121-134	4.0 (weak)	2.517968 S	0,864532	
16	21A – 22E	111-119	4.0 (weak)	2.453110 S	2,476811	
17	20F – 21A	91-109	4.0 (weak)	2.568810 S	2,423724	
18	19F – 20F	71-89	4.0 (weak)	2.494963 S	2,234793	
19	18V – 19F	55-69	4.0 (weak)	2.515699 S	2,452833	

Πίνακας 3: NOEs για τις διαμορφώσεις που ξεκινούν από το 6.000.000. Από αριστερά προς τα δεξιά αναγράφεται: ο αριθμός του NOE, ο αριθμός του αμινοξέος, ο αριθμός των πρωτονίων, η πειραματική ταξινόμηση, το r^{-6} για τις διαμορφώσεις που ξεκινούν από το 6.000.000, η τυπική απόκλιση και το ανώτατο όριο παραβίασης.

μ.ο. παραβίασης (all frames)	αριθμός παραβιάσεων
0,3995	7

μ.ο. Παραβίασης (320K)	αριθμός παραβιάσεων
0,5734	7

μ.ο. Παραβίασης (selected)	αριθμός παραβιάσεων
0,37745	7

Φαίνεται πως η μέση τιμή του upper bound και στις τρεις περιπτώσεις υπερβαίνει τα 0,05 Å κατά πολύ, κάτι το οποίο υποδηλώνει πως η προσομοίωση δεν έρχεται σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα.

3.7. Χημικές μετατοπίσεις (Chemical Shifts)

Η πυρηνική χημική μετατόπιση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε φάσμα NMR το 1950. Οι χημικές μετατοπίσεις αποτελούν ένα μέτρο του πόσο μακριά παράγεται ένα σήμα από το πρωτόνιο σε σχέση με το μόριο αναφοράς (συχνότητα συντονισμού πυρήνα σε σχέση με μόριο αναφοράς). Είναι πολύ χρήσιμες στην παροχή δομικής πληροφορίας, καθώς καθορίζουν τις δευτεροταγείς δομές που υπάρχουν μέσα σε ένα πεπτιδίο αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ή μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη (51).

Εξαιτίας του γεγονότος ότι για τις intrinsically disordered proteins δεν υπάρχουν πολλές υψηλής ακρίβειας τεχνικές που να μαρτυρούν τη δομή

τους, οι χημικές μετατοπίσεις που προκύπτουν από το NMR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή δομικής πληροφορίας (52).

Οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις (Secondary Chemical Shifts – Δδ) αναγνωρίστηκαν από τον Dalgarno και τους συνεργάτες του, οι οποίοι εξέφρασαν πως οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις από NMR των α C-H πρωτονίων (των πρωτεϊνών) έχουν τη δυνατότητα να συσχετιστούν με τον προσανατολισμό του α C-H πρωτονίου στη γειτονική ομάδα καρβονυλίου (53). Αποκαλύπτουν την τάση του κάθε αμινοξικού καταλοίπου του πεπτιδίου προς ένα είδος δευτεροταγούς δομής, δηλαδή προς α-έλικα, β-φύλλο, τυχαίο σπείραμα κλπ. Ο υπολογισμός των δευτεροταγών χημικών μετατοπίσεων γίνεται με αφαίρεση της τιμής τυχαίου σπειράματος (δ_{rc}) από την παρατηρούμενη τιμή της χημικής μετατόπισης (δ_{obs}) του αντίστοιχου ατόμου του αμινοξέως:

$$\Delta\delta = \delta_{obs} - \delta_{rc}$$

Οι χημικές μετατοπίσεις τυχαίου σπειράματος είναι οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων που συνιστούν τα αμινοξικά κατάλοιπα των intrinsically disordered proteins. Αναγκαία είναι η ακρίβεια των τιμών των χημικών μετατοπίσεων του τυχαίου σπειράματος, και γι αυτό έχουν γίνει πολλές μελέτες με σκοπό τη βελτίωση της ακρίβειας των τιμών (54).

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτεϊνών έχει βρεθεί ότι ακολουθούν ορισμένα μοτίβα τα οποία προδίδουν και τη δομή. Οι χημικές μετατοπίσεις του H^α κυμαίνεται μεταξύ 3,5-5,5 ppm, ενώ του HN μεταξύ 6,5-10 ppm. Όταν τα αμινοξικά κατάλοιπα, με εξαίρεση τη γλυκίνη, βρίσκονται σε έλικα τότε οι μετατοπίσεις του H^α είναι ανοδικές σε σχέση με τις τιμές του τυχαίου σπειράματος κατά μέσο όρο 0,30 ppm, ενώ όταν βρίσκονται σε β-φύλλο, οι μετατοπίσεις του H^α είναι καθοδικές κατά μέσο όρο 0,46 ppm. Οι μετατοπίσεις του HN είναι πιο ευαίσθητες στο περιβάλλον από αυτές του H^α. Γενικά, οι χημικές μετατοπίσεις των N και CO επηρεάζονται σημαντικά από την αλληλουχία, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις των C^α, C^β, H^α και H^β επηρεάζονται λιγότερο (55).

Όσον αφορά τις χημικές μετατοπίσεις για το πεππίδιο Αβ₁₇₋₃₄, χρησιμοποιήθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις από τη μέθοδο NMR που είναι διαθέσιμες από τη δημοσίευση των Fonar και Samson (25) με σκοπό τον υπολογισμό των πειραματικών δευτεροταγών χημικών μετατοπίσεων. Ο υπολογισμός αυτός έγινε βάσει των τιμών των πειραματικών μετατοπίσεων και των τιμών τυχαίου σπειράματος από τη δημοσίευση του Wishart και της ομάδας του (56).

Για τις χημικές μετατοπίσεις της προσομοίωσης, αυτές υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα carma σε συνδυασμό με το SPARTA+ (ο συνδυασμός τους αποτελούσε ένα πρόγραμμα γραμμένο σε γλώσσα Perl). Έπειτα, για τον υπολογισμό των δευτεροταγών χημικών μετατοπίσεων χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές τυχαίου σπειράματος όπως και στις πειραματικές χημικές μετατοπίσεις.

Υπολογίστηκαν οι δευτεροταγείς πειραματικές χημικές μετατοπίσεις, οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις για όλες τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης καθώς και οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις για τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K.

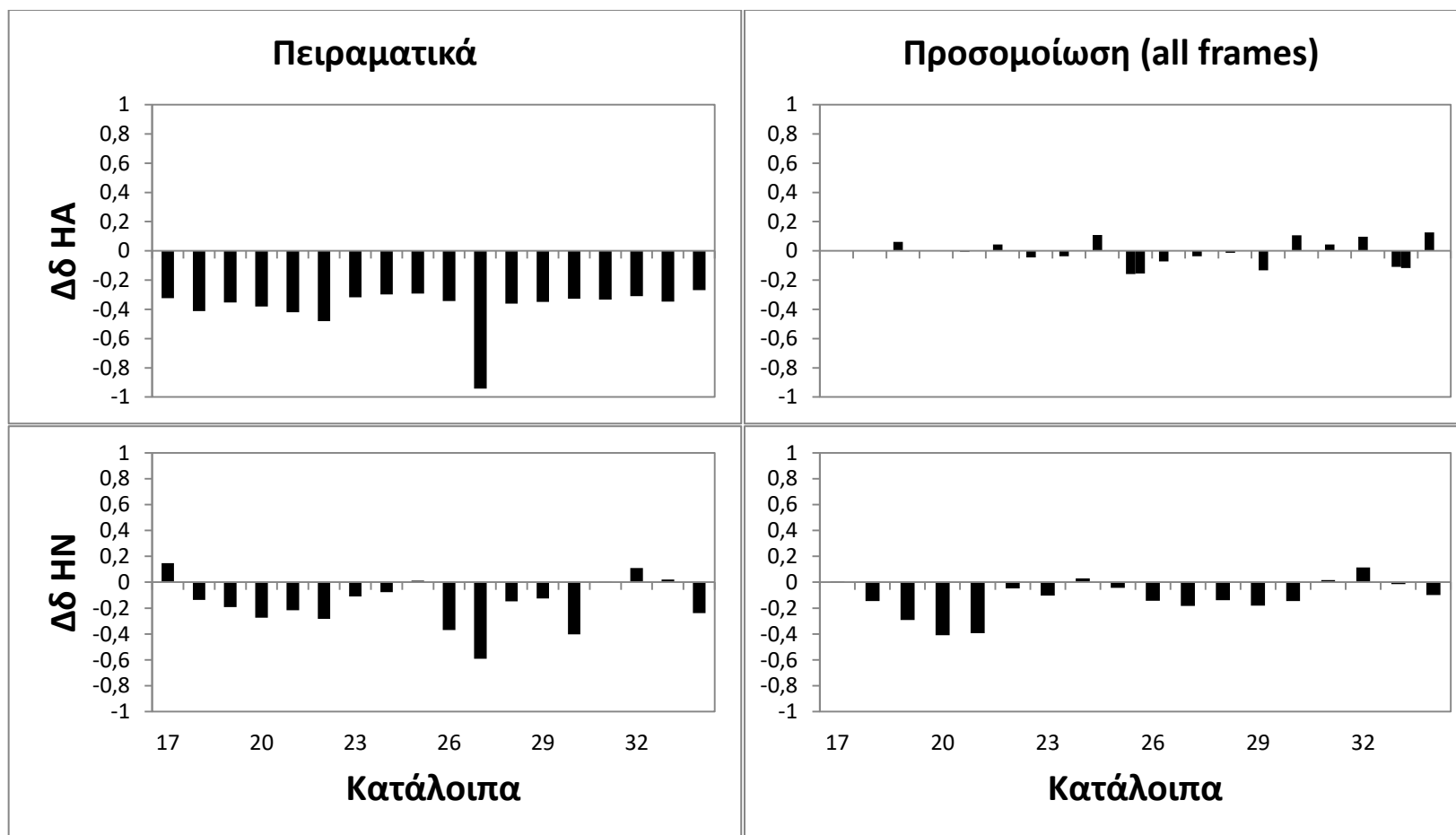
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες και γραφήματα. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις ενώ στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις τόσο του πειράματος όσο και όλων των διαμορφώσεων της προσομοίωσης καθώς και των διαμορφώσεων που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K. Στα γραφήματα αναπαρίστανται οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις των ΗΑ και ΗΝ του πειράματος, όλων των διαμορφώσεων της προσομοίωσης και των διαμορφώσεων που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K.

Αριθμός καταλόιπου	Κατάλοιπο	Όνομα ατόμου	Chemical shift (πειραματικά)	Chemical shift (all frames)	Chemical shift (320K)	Chemical Shift (random coil)
17	L	HA	4,016	4,3414	4,3812	4,34
17	L	HN	8,307	8,1662	8,2052	8,16
18	V	HA	3,708	4,1822	4,3814	4,12
18	V	HN	7,894	7,8853	7,8915	8,03
19	F	HA	4,267	4,6184	4,7235	4,62
19	F	HN	8,109	8,0072	8,1792	8,30
20	F	HA	4,240	4,6143	4,7317	4,62
20	F	HN	8,026	7,8903	8,0025	8,30
21	A	HA	3,901	4,3630	4,4150	4,32
21	A	HN	8,023	7,8465	7,7903	8,24
22	E	HA	3,870	4,3050	4,3342	4,35
22	E	HN	8,138	8,3717	8,4960	8,42
23	D	HA	4,322	4,6023	4,6291	4,64
23	D	HN	8,231	8,2360	8,1763	8,34
24	V	HA	3,822	4,2294	4,2161	4,12
24	V	HN	7,954	8,0594	8,1787	8,03
25	G	HA2	3,668	3,8011	3,7712	3,96
25	G	HA3	3,668	3,8045	3,7727	3,96
25	G	HN	8,341	8,2855	8,3537	8,33
26	S	HA	4,127	4,3977	4,4166	4,47
26	S	HN	7,940	8,1671	8,1332	8,31
27	N	HA	3,798	4,7023	4,6943	4,74
27	N	HN	7,809	8,2170	8,1960	8,40
28	K	HA	3,959	4,3078	4,2305	4,32
28	K	HN	8,143	8,1509	8,1696	8,29
29	G	HA2	3,610	3,8271	3,8412	3,96
29	G	HN	8,205	8,1488	8,0878	8,33
30	A	HA	3,993	4,4274	4,4765	4,32
30	A	HN	7,837	8,0956	8,0893	8,24
31	I	HA	3,836	4,2143	4,3269	4,17
31	I	HN	8,003	8,0157	8,1235	8,00
32	I	HA	3,860	4,2665	4,2963	4,17
32	I	HN	8,109	8,1142	8,2745	8,00
33	G	HA2	3,613	3,8500	3,8888	3,96
33	G	HA3	3,613	3,8436	3,8797	3,96
33	G	HN	8,351	8,3163	8,3987	8,33
34	L	HA	4,072	4,4672	4,4692	4,34
34	L	HN	7,921	8,0601	8,0843	8,16

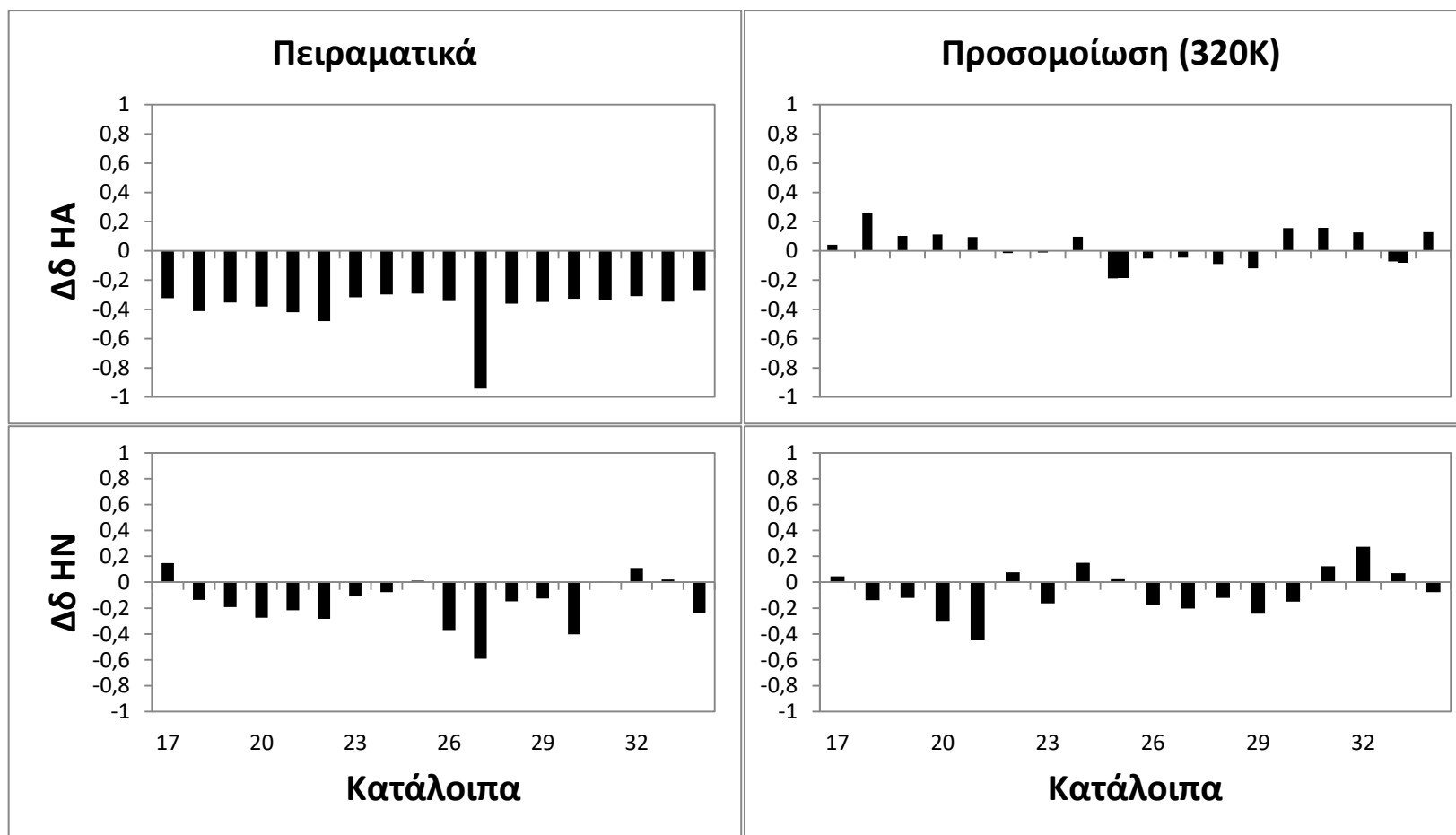
Πίνακας 4: Χημικές μετατοπίσεις. Στις στήλες από αριστερά προς τα δεξιά αναγράφεται: ο αριθμός καταλόιπου, το κατάλοιπο, το όνομα του ατόμου, οι πειραματικές χημικές μετατοπίσεις, οι χημικές μετατοπίσεις της προσομοίωσης για όλες τις διαμορφώσεις, οι χημικές μετατοπίσεις της προσομοίωσης για τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K και οι χημικές μετατοπίσεις του τυχαίου σπειράματος.

Αριθμός καταλόγου	Κατάλογο	Όνομα ατόμου	Δδ (πειραματικά)	Δδ (all frames)	Δδ (320K)
17	L	HA	-0,324	0,0014	0,0412
17	L	HN	0,147	0,0062	0,0452
18	V	HA	-0,412	0,0622	0,2614
18	V	HN	-0,136	-0,1447	-0,1385
19	F	HA	-0,353	-0,0016	0,1035
19	F	HN	-0,191	-0,2928	-0,1208
20	F	HA	-0,38	-0,0057	0,1117
20	F	HN	-0,274	-0,4097	-0,2975
21	A	HA	-0,419	0,043	0,095
21	A	HN	-0,217	-0,3935	-0,4497
22	E	HA	-0,48	-0,045	-0,0158
22	E	HN	-0,282	-0,0483	0,076
23	D	HA	-0,318	-0,0377	-0,0109
23	D	HN	-0,109	-0,104	-0,1637
24	V	HA	-0,298	0,1094	0,0961
24	V	HN	-0,076	0,0294	0,1487
25	G	HA2	-0,292	-0,1589	-0,1888
25	G	HA3	-0,292	-0,1555	-0,1873
25	G	HN	0,011	-0,0445	0,0237
26	S	HA	-0,343	-0,0723	-0,0534
26	S	HN	-0,37	-0,1429	-0,1768
27	N	HA	-0,942	-0,0377	-0,0457
27	N	HN	-0,591	-0,183	-0,204
28	K	HA	-0,361	-0,0122	-0,0895
28	K	HN	-0,147	-0,1391	-0,1204
29	G	HA2	-0,35	-0,1329	-0,1188
29	G	HN	-0,125	-0,1812	-0,2422
30	A	HA	-0,327	0,1074	0,1565
30	A	HN	-0,403	-0,1444	-0,1507
31	I	HA	-0,334	0,0443	0,1569
31	I	HN	0,003	0,0157	0,1235
32	I	HA	-0,31	0,0965	0,1263
32	I	HN	0,109	0,1142	0,2745
33	G	HA2	-0,347	-0,11	-0,0712
33	G	HA3	-0,347	-0,1164	-0,0803
33	G	HN	0,021	-0,0137	0,0687
34	L	HA	-0,268	0,1272	0,1292
34	L	HN	-0,239	-0,0999	-0,0757

Πίνακας 5: Δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις. Στις στήλες από αριστερά προς τα δεξιά αναγράφεται: ο αριθμός καταλόγου, το κατάλογο, το όνομα του ατόμου, οι πειραματικές δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις, οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις της προσομοίωσης για όλες τις διαμορφώσεις και οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις της προσομοίωσης για τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K.



Εικόνα 17: Απεικόνιση δευτεροταγών χημικών μετατοπίσεων. Επάνω από αριστερά προς τα δεξιά: φαίνονται οι πειραματικές δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις για το HA ενώ δεξιά φαίνονται για το ίδιο στοιχείο οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις για όλες τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης. Κάτω από αριστερά προς τα δεξιά: οι πειραματικές δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις για το HN και οι χημικές μετατοπίσεις για το ίδιο άτομο για όλες τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης.



Εικόνα 18: Απεικόνιση δευτεροταγών χημικών μετατοπίσεων. . Επάνω από αριστερά προς τα δεξιά: φαίνονται οι πειραματικές δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις για το HA ενώ δεξιά φαίνονται για το ίδιο στοιχείο οι δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις για τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K. Κάτω από αριστερά προς τα δεξιά: οι πειραματικές δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις για το HN και οι χημικές μετατοπίσεις για το ίδιο άτομο για τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K.

Οι διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα αποτελέσματα που υπολογίστηκαν πειραματικά και σε αυτά που υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα είναι προφανείς. Τα αποτελέσματα που μοιάζουν είναι τα ΗΝ των καταλοίπων 23 και 32 που αφορούν όλες τις διαμορφώσεις, και τα ΗΝ των καταλοίπων 18 και 25 που αφορούν τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K. Επίσης, παρουσιάζονται και διαφορές, κυρίως στις χημικές μετατοπίσεις που αφορούν το ΗΑ, ανάμεσα στις χημικές μετατοπίσεις που αφορούν όλες τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης και αυτές που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K. Ωστόσο, οι διαφορές αυτές είναι μικρές σε σχέση με τις διαφορές που παρουσιάζονται με τα αποτελέσματα του πειράματος.

Για να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ των πειραματικών δευτεροταγών χημικών μετατοπίσεων και αυτών της προσομοίωσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο στατιστικές αναλύσεις.

Η πρώτη είναι η ανάλυση reduced χ^2 που υπολογίζεται με τον εξής τύπο:

$$\chi^2 = \frac{1}{\nu} \sum \frac{(O-E)^2}{\sigma^2},$$

όπου Σ είναι το άθροισμα, O είναι οι παρατηρούμενες τιμές (αντιστοιχούν στις δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις των δομών της προσομοίωσης), E είναι οι αναμενόμενες τιμές (αντιστοιχούν στις πειραματικές δευτεροταγείς χημικές μετατοπίσεις), σ^2 είναι η διασπορά των παρατηρούμενων τιμών και ν είναι οι βαθμοί ελευθερίας.

Ο γενικός κανόνας που ισχύει είναι ο εξής:

- Αν $\chi^2 = 1$, τότε τα παρατηρούμενα και τα θεωρητικά δεδομένα είναι σε συμφωνία με τη διασπορά (υψηλός βαθμός συσχέτισης)
- Αν $\chi^2 < 1$, τότε υπάρχει υπερβολικός βαθμός συσχέτισης ή οι τιμές της διασποράς έχουν υπερτιμηθεί
- Αν $\chi^2 > 1$, τότε δεν υπάρχει υψηλός βαθμός συσχέτισης (πλήρης συσχέτιση) μεταξύ των δεδομένων ή οι τιμές της διασποράς έχουν υποτιμηθεί (μέτριο μοντέλο)

- Αν $\chi^2 \gg 1$, τότε υπάρχει μεγάλη υποτίμηση της διασποράς

Τη δεύτερη στατιστική ανάλυση αποτελεί ο γραμμικός συντελεστής συσχέτισης r (linear correlation coefficient), ο υπολογισμός του οποίου γίνεται με τον εξής τύπο:

$$r = r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}},$$

όπου Σ είναι το άθροισμα, x_i είναι η τιμή του πρώτου σετ δεδομένων για τη θέση i , y_i είναι η τιμή του δεύτερου σετ δεδομένων για τη θέση i , \bar{x} είναι ο μέσος όρος των τιμών του πρώτου σετ δεδομένων και \bar{y} είναι ο μέσος όρος των τιμών του δεύτερου σετ δεδομένων.

Ο γενικός κανόνας που ισχύει είναι ο εξής:

- Αν $r = 1$, τότε υπάρχει πλήρη θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο σετ δεδομένων
- Αν $r = 0$, τότε δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ των δεδομένων
- Αν $r = -1$, τότε υπάρχει πλήρη αρνητική συσχέτιση

Με τη βοήθεια των δευτεροταγών χημικών μετατοπίσεων τόσο του πειράματος όσο και της προσομοίωσης, οι τιμή του χ^2 και του γραμμικού συντελεστή συσχέτισης r είναι οι εξής:

- $\chi^2 = 0,096$
- $r = 0,069$

Οι τιμές της τυπικής απόκλισης που παράχθηκαν από την προσομοίωση ήταν μεγάλες, κι αυτό δικαιολογεί το πολύ μικρό νούμερο του χ^2 , καθώς στο μαθηματικό τύπο η τυπική απόκλιση όχι μόνο βρίσκεται στον παρονομαστή αλλά είναι υψωμένη και στο τετράγωνο.

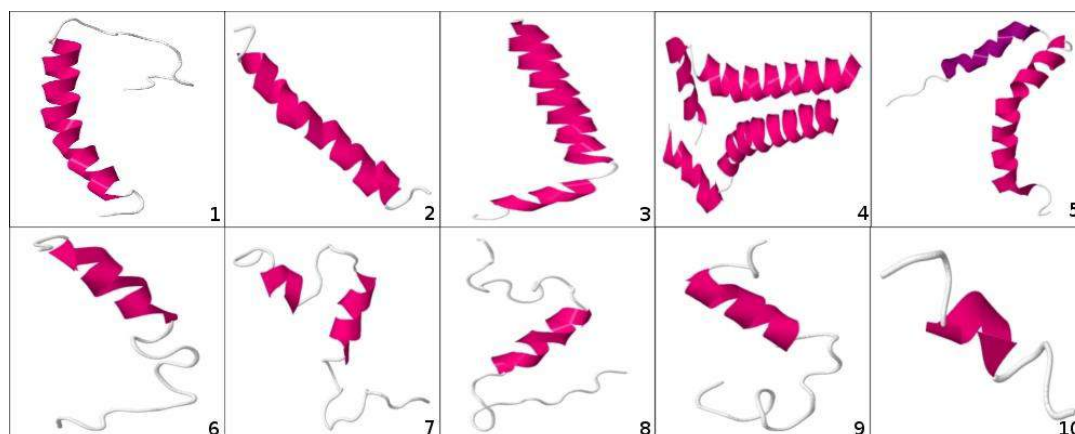
4. Συζήτηση

Οι intrinsically disordered proteins (IDPs) έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια, λόγω της δομής τους. Σε αυτές τις πρωτεΐνες ανήκει και το πεπτίδιο Αβ το οποίο σχετίζεται κυρίως με τη νόσο Alzheimer. Το ενδιαφέρον στο πεπτίδιο αυτό είναι η δομή του, η οποία αλλάζει κατά την μετάβαση από την υγιή κατάσταση στην νόσο Alzheimer.

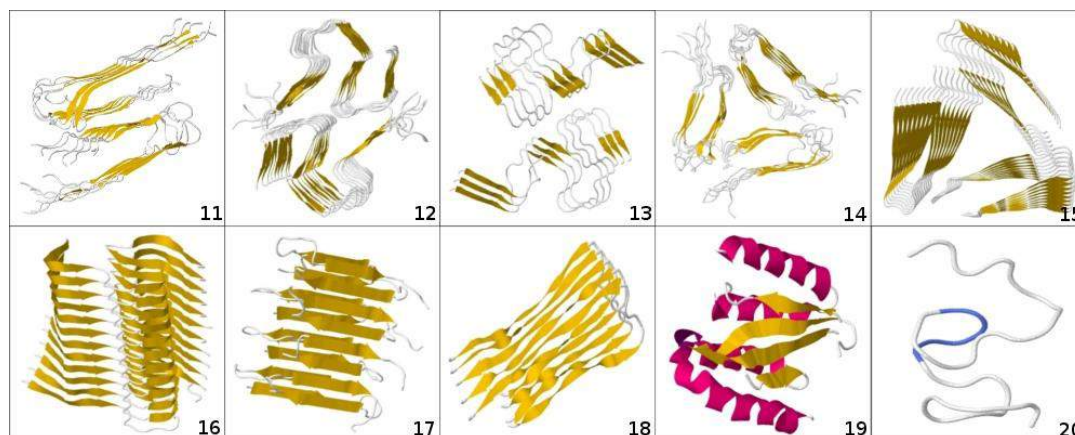
Πολλές μελέτες έχουν γίνει με σκοπό την εύρεση και κατανόηση του ρόλου της δομής του Αβ στην έναρξη και πρόοδο της ασθένειας. Σχεδόν 20 χρόνια πριν, μελέτες με NMR έδειξαν ότι το πεπτίδιο Αβ υιοθετεί δομή α-έλικας με επακόλουθη μετατροπή σε β-φύλλο σε μέσο που προσομοιάζει το περιβάλλον της μεμβράνης, ενώ σε SDS το πεπτίδιο έχει μια α-έλικα στο C-τελικό άκρο (57) (58). Λίγο αργότερα, αποτελέσματα έδειξαν πως το Αβ υιοθετεί μια σειρά από βρόχους, κλώνους και στροφές χωρίς καμία α-έλικα ή β-φύλλο διαμόρφωση (59). Το 2008, σε ένα άρθρο του ο Massimo (24) ανέφερε ότι η συσσώρευση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται από αρχικές συσσωρεύσεις μονομερών ή ολιγομερών που διατηρούν τη φυσική τους δομή πριν υποκύψουν σε αλλαγές στη διαμόρφωσή τους προς τη δημιουργία αμυλοειδών και ότι το κλειδί για τη δημιουργία ινιδίων αποτελεί η συσσώρευση των ολιγομερών προ-ινιδίων. Την ίδια χρονιά, ο Hoyer και οι συνεργάτες του (60) ανέφεραν ότι η διαμόρφωση του πεπτιδίου Αβ είναι μια β-φουρκέτα κατά την οποία τα αμινοξέα 17-23 και 30-36 δημιουργούν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου για να σχηματίσουν τους δύο κλώνους του β-φύλλου. Ένα θεωρητικό μοντέλο που παρουσίαζαν υποστήριζε τη μετάβαση από την αποδιαταγμένη μορφή του Αβ προς το σχηματισμό μιας β-φουρκέτας κι έπειτα διαλυτών ολιγομερών που στη συνέχεια θα σχημάτιζαν ινίδια. Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη με τη χρήση NMR, το Αβ υιοθετεί μια καλά χαρακτηρισμένη τρισδιάστατη δομή με μια σταθερή έλικα στο κέντρο με την οποία επικοινωνούν τα δύο άκρα (κωδικός PDB ID: 2lfm) (61). Σε μια ανασκόπηση του 2015 (62) αναφέρονται τα τρία στάδια κατά τα οποία συμβαίνει η συσσώρευση του αμυλοειδούς. Αρχικά τα διαλυτά μονομερή συγκεντρώνονται για να σχηματίσουν έναν πυρήνα (έχει παρατηρηθεί η λανθασμένη αναδίπλωση σε πειράματα προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (63)), έπειτα αυτοί οι πυρήνες πυροδοτούν τον πολυμερισμό και την

ανάπτυξη ινιδίων και τέλος, όλα τα διαλυτά ινίδια μετατρέπονται σε ώριμα ινίδια διατασσόμενα πλευρικά.

Παρ' όλ' αυτά, επικρατεί μια σύγχυση ως προς τη δομή που υιοθετεί το μονομερές Αβ. Αυτή η σύγχυση είναι ορατή όταν παρατηρήσει κανείς τις δομές που έχουν κατατεθεί στην *rcb* και αφορούν τη διαμόρφωση του πεπτιδίου Αβ (όχι σε *arolar* περιβάλλον).



Εικόνα 19: Διαμορφώσεις που έχουν βρεθεί με NMR και έχουν κατατεθεί στην PDB και αφορούν ολόκληρο ή μέρος του πεπτιδίου Αβ. Ο κωδικός που έχουν οι διαμορφώσεις αυτές στην PDB είναι ο εξής: **1.1ba4 2.1amb 3.2llm 4.2loh 5.2lp1 6.1nmj 7.1aml 8.1ba6 9.1bjb 10.1qcm**. Το φούξια χρώμα αντιστοιχεί σε α-έλικα, το μπλε σε 3_{10} έλικα, το κίτρινο σε β-φύλλο, το γαλάζιο σε (β)στροφή και το άσπρο σε τυχαίο σπείραμα. Η προβολή έγινε με JSmol.



Εικόνα 20: Διαμορφώσεις που έχουν βρεθεί με NMR και έχουν κατατεθεί στην PDB και αφορούν πρωτο-ινίδια, ινίδια, μέρος ή ολόκληρη τη Αβ (και στην εικόνα 19 σε σύμπλοκο) . Ο κωδικός που έχουν οι διαμορφώσεις αυτές στην PDB είναι ο εξής: **11.2lmn 12.5kk3 13.2hao 14.2lmp 15.2mprz 16.2mxx 17.2lnq 18.2beg 19.2otk 20.1hz3**. Το φούξια χρώμα αντιστοιχεί σε α-έλικα, το μπλε σε 3_{10} έλικα, το κίτρινο σε β-φύλλο, το γαλάζιο σε (β)στροφή και το άσπρο σε τυχαίο σπείραμα. Η προβολή έγινε με JSmol.

Αυτό που παρατηρείται είναι μια προτίμηση του πεπτιδίου να υιοθετεί δομή τυχαίου σπειράματος στα άκρα του (N- και C- τελικό άκρο). Στο

εσωτερικό του, έχουν παρατηρηθεί τόσο α-έλικες, 3_{10} έλικες και β πτυχωτές επιφάνειες με ένα σπείραμα ενδιάμεσα όσο και στροφές και τυχαίο σπείραμα. Το σίγουρο είναι ότι τα αποτελέσματα μελετών ινιδίων δίνουν διαμορφώσεις συνδυασμού β-φύλλων (παράλληλων μεταξύ τους) και στροφής καθώς και τυχαίο σπείραμα στα άκρα (στις περισσότερες περιπτώσεις).

Εξαιτίας της δυσκολίας εύρεσης της τριτοταγούς δομής με τη χρήση πειραματικών τεχνικών, οι ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στις υπολογιστικές μεθόδους, κυρίως στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με τη χρήση διάφορων δυναμικών πεδίων αλλά και παραμέτρων που αφορούν τη διεξαγωγή της προσομοίωσης.

Με τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής μπορούν να προκύψουν αποτελέσματα τα οποία δύσκολα θα μπορούσαν να εξαχθούν ακολουθώντας πειραματικές μεθόδους. Η ύπαρξη υψηλής τάσης για σχηματισμό διαμορφώσεων που σχετίζονται με φουρκέτα (κατάλοιπα 17-21 και 30-36 με ενδιάμεση στροφή στα 24-28) και με αποδιαταγμένα άκρα έχει παρατηρηθεί σε προσομοίωση (64). Σε άλλη περίπτωση παρατηρείται η διαμόρφωση φουρκέτας στο κέντρο του πεπτιδίου μαζί με μια μικρή έλικα στο N-τελικό άκρο για το $A\beta_{40}$ και η διαμόρφωση φουρκέτας ή βρόχου στο C-τελικό άκρο για το $A\beta_{42}$ (65), ενώ σε άλλη προσομοίωση με το δυναμικό πεδίο FF99SB διαμορφώθηκαν clusters τα οποία είχαν κυρίως δομή β-φύλλου, δηλαδή υπήρχε cluster που οι διαμορφώσεις που περιλάμβανε υιοθετούσαν ένα β-φύλλο (κατάλοιπα 4-6 και 38-40) μαζί με μια έλικα (κατάλοιπα 8-12), τη στιγμή που άλλο cluster είχε β φουρκέτα με ή χωρίς α-έλικα στα κατάλοιπα 20-23, ή το σχηματισμό 3_{10} έλικας στα κατάλοιπα 29-33, ενώ το μεγαλύτερο μέρος των διαμορφώσεων υιοθετούσαν τη δομή τυχαίου σπειράματος (με μια μικρή 3_{10} έλικα στα κατάλοιπα 21-24) (66). Σε μελέτη που χρησιμοποίησαν πολλά δυναμικά πεδία υποστήριξαν ότι με το δυναμικό πεδίο OPLS το πεπτίδιο υιοθετεί β δομή στα κατάλοιπα 17-21 και 30-36 με μια ενδιάμεση στροφή στα κατάλοιπα 24-28, με το ILDN το πεπτίδιο έχει δυνατό β στοιχείο που χωρίζεται από βρόχους και ότι τα κατάλοιπα 7-9, 21-29 και 37-38 περιέχουν στροφές και ακανόνιστη δομή και τέλος, με το CHARMM υποστήριξαν ότι τα κατάλοιπα 25-26 σχηματίζουν στροφή και τα κατάλοιπα 29-30, 33-34 και 37-38 έχουν

μεγαλύτερη τάση να σχηματίζουν στροφή σε σχέση με τα άλλα δυναμικά πεδία (67). Σε δημοσίευση, που στηριζόταν σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής κατά τις οποίες έγινε, επίσης, χρήση πολλών δυναμικών πεδίων, βγήκε το συμπέρασμα ότι η δομή του τυχαίου σπειράματος κυριαρχεί στα δύο τελικά άκρα και στα κατάλοιπα 15-18, ενώ πιο συγκεκριμένα στο CHARMM22* η διαμόρφωση αποτελούνταν από τυχαίο σπείραμα κοντά στα άκρα και στα κατάλοιπα 16-18 και από μια σταθερή έλικα στο υδρόφοβο C-τελικό άκρο, στο CHARMM22 η διαμόρφωση αποτελούνταν κυρίως από στροφές και τυχαία σπείραμα καθώς και από μια οριακά σταθερή έλικα στο C-τελικό άκρο και στο OPLS-AA η διαμόρφωση του πεπτιδίου ήταν κυρίως στροφή και τυχαίο σπείραμα (68). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, έχουν βρεθεί διαμορφώσεις του Αβ με τη χρήση του CHARMM22* και του OPLS που έχουν την τάση για β φουρκέτα στο C-τελικό άκρο (69). Σε μεγάλης διάρκειας προσομοίωση, η σταθερή διαμόρφωση του Αβ ήταν η β πτυχωτή επιφάνεια – στροφή – β πτυχωτή επιφάνεια και οι συντάκτες του άρθρου πρότειναν τη δομή αυτή σαν ενδιάμεση στη δημιουργία ινιδίων (70), όμως και σε άλλο άρθρο υποστηρίζεται πως το λεγόμενο «β-hairpin» είναι το ενδιάμεσο από τις πρωτεΐνες πλούσιες σε α-έλικες σε ινίδια πλούσια σε β-φύλλα (71).

Όταν οι προσομοιώσεις αφορούν πρωτο-ινίδια ή ινίδια, το αποτέλεσμα δεν περιλαμβάνει έλικες. Ενδεικτικά, ο Hummer και οι συνεργάτες του μελέτησαν πρωτο-ινίδια και υποστήριξαν πως υιοθετούν δομή β-φύλλου με μια γέφυρα στα κατάλοιπα 23-28 και πως τα πρωτο-ινίδια σχηματίζονται από δύο στρώσεις πεπτιδίων που έχουν σχήμα καμπύλης U και αποτελούνται από β-φύλλα (72).

Τα αποτελέσματα από τις παραπάνω προσομοιώσεις συμφωνούσαν τις περισσότερες φορές με τα πειραματικά δεδομένα πάνω στα οποία είχαν στηριχθεί. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί αυτή η ετερογένεια που παρουσιάζουν στη δομή ολόκληρου ή μέρος του Αβ τόσο τα πειραματικά αποτελέσματα (με NMR) όσο και τα αποτελέσματα από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Όσον αφορά την παρούσα πτυχιακή εργασία, σκοπός της ήταν να αξιολογήσει την ακρίβεια της μεθόδου των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής στην αναγνώριση και επιτυχημένη διαμόρφωση της δομής του

πεπτιδίου $A\beta_{17-34}$ και να συγκρίνει τα αποτελέσματα της προσομοίωσης με αποτελέσματα που έχουν προκύψει από πειράματα με φάσμα NMR. Το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην προσομοίωση, από πειραματικά αποτελέσματα του Fonar και Samson (25), έχει βρεθεί πως διαμορφώνει δύο α-έλικες στα κατάλοιπα 20-26 και 28-33 και μια διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος (βρόχου) στα κατάλοιπα 26-28, διαμόρφωση που έρχεται σε αντίθεση με άλλα πειράματα που υποδεικνύουν την παρουσία β φουρκέτας ή τυχαίου σπειράματος.

Η προσομοίωση μοριακής δυναμικής που πραγματοποιήθηκε έκανε χρήση του δυναμικού πεδίου AMBER και ήταν αρκετά εκτεταμένη σε χρονική διάρκεια ($\approx 14 \mu s$). Τα αποτελέσματα που παρήγαγε αυτή η προσομοίωση έδειξαν πως το πεπτίδιο παρουσίαζε μια αστάθεια στη δομή του. Από τον πίνακα RMSD διακρίνονται, ωστόσο, 4 περιοχές που αντιστοιχούν σε αναδιπλωμένη και σταθερή κατάσταση: η μια αντιστοιχεί σε διαμόρφωση που περιέχει στροφές και τυχαίο σπείραμα, μια ακόμα περιέχει εκτός από στροφές και τυχαίο σπείραμα και μια μικρή 3_{10} έλικα και δύο που αντιστοιχούν σε στροφές και τυχαίο σπείραμα μαζί με δύο β πτυχωτές επιφάνειες. Παρ' όλ' αυτά, καμία από αυτές τις τέσσερις διαμορφώσεις δεν ταυτίζεται με τη δομή από το πείραμα NMR.

Εκτός από τις διακριτές περιοχές στον πίνακα RMSD όπου το πεπτίδιο υιοθετεί ανά διαστήματα ορισμένες διαμορφώσεις δευτεροταγούς δομής, το γράφημα με την αναπαράσταση δευτεροταγούς δομής δείχνει πως για το μεγαλύτερο μέρος της προσομοίωσης το πεπτίδιο υιοθετεί τη δομή της στροφής, με ανεπαίσθητα μικρές περιόδους όπου το πεπτίδιο εκτός από στροφές περιλαμβάνει α-έλικα ή/και 3_{10} έλικα και 3 διακριτές περιόδους όπου το πεπτίδιο περιλαμβάνει δύο β πτυχωτές επιφάνειες και στροφές (οι δύο από τις τρεις αυτές περιόδους αντιστοιχούν στις σταθερές καταστάσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα RMSD). Τα άκρα του πεπτιδίου αντιστοιχούν σε τυχαίο σπείραμα (είναι τα πρόσθετα γλουταμικά οξέα στην αλληλουχία του $A\beta_{17-34}$). Στο γράφημα WebLogo, που αφορά όλες τις διαμορφώσεις της προσομοίωσης, φαίνεται η προτίμηση όλου του πεπτιδίου για στροφή κι έπειτα για τυχαίο σπείραμα, εκτός από τα άκρα που η προτίμηση για τυχαίο

σπείραμα είναι ξεκάθαρη. Σε αντίθεση, για τις διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε θερμοκρασία μικρότερη των 320K, η προτίμηση εκτός από στροφή και τυχαίο σπείραμα είναι σε ορισμένα τμήμα του πεπτιδίου και β πτυχωτή επιφάνεια (σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με τη στροφή και το τυχαίο σπείραμα).

Επίσης, τα NOEs και οι (δευτεροταγείς) χημικές μετατοπίσεις δε συμφωνούσαν με τα πειραματικά αποτελέσματα. Η μέση τιμή του ανώτατου ορίου παραβίασης (average upper bound violation) για όλες τις διαμορφώσεις του πεπτιδίου ήταν 0,3995. Το χ^2 για τις χημικές μετατοπίσεις ήταν 0,096.

Η μόνη σύγκλιση των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να αφορά τα άκρα του πεπτιδίου όπου και στις δύο περιπτώσεις αντιστοιχούν σε στροφή ή τυχαίο σπείραμα. Στην προσομοίωση παρουσιάστηκαν κάποια εξαιρετικά μικρά χρονικά διαστήματα όπου εμφανίζονταν έλικες (α - και 3_{10}) που όμως δεν ήταν σταθερές όπως συνέβη στο πείραμα.

Αν θα δινόταν η ευκαιρία υπεράσπισης της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα δινόταν η παρακάτω γραμμή: γιατί στο άρθρο γίνεται αναφορά πως σε μια άλλη μελέτη με τη χρήση NMR βρέθηκε πως το Αβ₁₋₄₂ υιοθετεί τη δομή α -έλικας στα κατάλοιπα 8-25 και 28-38 σε διάλυμα HFPI/H₂O 30:70, τη στιγμή που στην ίδια μελέτη αναφέρεται πως με την αύξηση του ποσοστού του νερού σε 90-99% σταθεροποιείται β διαμόρφωση στο πεπτιδίο (73); Και γιατί αφότου έχουν βγάλει αποτελέσματα από το φάσμα NMR να διεξάγουν πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής με τη μέθοδο Chou-Fasman, η οποία μπορεί να μην είναι αξιόπιστη, όπως αναφέρεται, αλλά δεν παύει να είναι πολύ παλιά και (ας επιτραπεί η έκφραση) ξεπερασμένη;

Μήπως, από την άλλη, φταίει η ανάλυση του τροχιακού;

Το μόνο σίγουρο είναι πως το πρόβλημα με την εύρεση της δομής του πεπτιδίου Αβ παραμένει και θα πρέπει να βρεθεί τόσο το σωστό μέσο όσο και ο σωστός τρόπος έτσι ώστε να γίνει εφικτή η επίλυση αυτού το προβλήματος.

5. Βιβλιογραφία

1. **Carl Branden, John Tooze.** *Introduction to protein structure.* s.l. : Garland Science, 1999. pp. 117-123, 542-546.
2. **Anfinsen, Christian B.** Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 1973, Vol. 181, pp. 223-230.
3. **Levinthal, Cyrus.** Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chemie Biologique.* 1968, Vol. 65, pp. 44-45.
4. **Unnati Ahluwalia, Nidhi Katyal, Shashank Deep.** Models of protein folding. *Journal of Proteins and Proteomics.* 2012, Vol. 3, pp. 85-93.
5. **Samreen Amani, Aabgeena Naeem.** Understanding protein folding from globular to amyloid state Aggregation: Darker side of protein. *Process Biochemistry.* 2013, Vol. 48, pp. 1651-1664.
6. **Martin Karplus, David L. Weaver.** Protein folding dynamics: The diffusion-collision model and experimental data. *Protein Science.* 1994, Vol. 3, pp. 650-668.
7. **Bengt Nölting, David A. Agard.** How General Is The Nucleation–Condensation Mechanism? *Proteins.* 2008, Vol. 73, pp. 754-764.
8. **Fersht, Alan.** *Structure and Mechanism in Protein Science.* New York : W. H. Freeman and Company, 1999. pp. 585-587.
9. **Shu-Qun Liu, Xing-Lai Ji, Yan Tao, De-Yong Tan, Ke-Qin Zhang, Yun-Xin Fu.** Protein Folding, Binding and Energy Landscape: A Synthesis. [ed.] Pravin Kaumaya. *Protein Engineering.* s.l. : INTECH, 2012, pp. 207-251.
10. **Kamal Gandhi, Anil Kumar, Saurabh Gosewade, Ravinder Kaushik, Darshan Lal.** X-Ray Crystallography and Its Applications in Dairy Science: A Review. *Research and Reviews: Journal of Dairy Science and Technology.* 2013, Vol. 2.
11. **Schlick, Tamar.** *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide.* 2. s.l. : Springer, 2002. pp. 41-44, 251-256, 426-427. Vol. 21.
12. **Anna, Tramontano.** The role of molecular modelling in biomedical research. 2006, Vol. 580, pp. 2928-2934.
13. **Marcio Dorn, Mariel Barbachan e Silvab, Luciana S. Buriola, Luis C. Lamba.** Three-Dimensional Protein Structure Prediction: Methods and Computational Strategies. *Computational Biology and Chemistry.* 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2014.10.001>.
14. Beta Amyloid 1-42 peptide. [Online] INNOVAGEN.
<http://shop.innovagen.com/peptide.php?code=sp-ba42>.
15. **Sadigh-Eteghad S., Sabermarouf B., Majdi A., Talebi M., Farhoudi M., Mahmoudi J.** Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Medical Principles and Practice.* 2015, Vol. 24, pp. 1-10.

16. **Jungsu Kim, Jacob M. Basak, David M. Holtzman.** The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2009, Vol. 63, pp. 287-303.
17. **Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell.** *Principles of Neural Science*. s.l. : BROKEN HILL, 2000. pp. 862-868.
18. alzheimer's association. [Online] <http://www.alz.org/>.
19. **Alberto Serrano-Pozo, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, Bradley T. Hyman.** Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2011, Vol. 1.
20. **M. Paul Murphy, Harry LeVine.** Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010, Vol. 19, pp. 311-323.
21. **Christopher J. Oldfield, A. Keith Dunker.** Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. *Annual Review of Biochemistry*. 2014, Vol. 83, pp. 553-584.
22. **M Madan Babu, Robin van der Lee, Natalia Sanchez de Groot, Jorg Gsponer.** Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Current Opinion in Structural Biology*. 2011, Vol. 3, pp. 432-440.
23. **H. Jane Dyson, Peter E. Wright.** INTRINSICALLY UNSTRUCTURED PROTEINS AND THEIR FUNCTIONS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, Vol. 6, pp. 197-208.
24. **Stefani, Massimo.** Protein Folding and Misfolding on Surfaces. *International Journal of Molecular Science*. 2008, Vol. 9, pp. 2516-2542.
25. **Genadiy Fonar, Abraham O. Samson.** NMR structure of the water soluble A β 17–34 peptide. *Bioscience Reports*. 2014, Vol. 34.
26. **Cuendet, Michel.** Molecular Dynamics Simulation: A Short Introduction. [Online] EMBL, 2008. http://www.ch.embnet.org/CoursEMBnet/Pages3D08/slides/MD_cours_opt.pdf.
27. **Kaźmierkiewicz, Rajmund.** *INTRODUCTION TO MOLECULAR MODELING*. Gdańsk : s.n., 2011. pp. 10-11.
28. **Karplus, Martin.** Molecular Dynamics of Biological Macromolecules: A Brief History and Perspective. *Biopolymers*. 2002, Vol. 68, pp. 350-358.
29. **William L. Jorgensen, Julian Tirado-Rives.** Monte Carlo vs Molecular Dynamics for Conformational Sampling. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, 100.
30. **Daan Frenkel, Berend Smit.** *Understanding Molecular Simulation From Algorithms to Applications*. s.l. : ACADEMIC PRESS, 1996. pp. 9-13, 64-65.
31. **Roland Stote, Annick Dejaegere, Dmitry Kuznetsov, Laurent Falquet.** Theory of Molecular Dynamics Simulations. [Online] 1999. http://www.ch.embnet.org/MD_tutorial/.

32. **I. Kyrikou, A. Kapou, T. Mavromoustakos, K. Poulos.** Molecular Modeling: A Valuable Tool in the Development of Rational Drug Design. *PHARMAKEFTIKI*. 2001, Vol. III, 14, pp. 109-123.
33. AMBER force field. [Online] <http://ambermd.org/>.
34. CHARMM force field. [Online] <https://www.charmm.org/charmm/?CFID=dad41029-cdcd-407f-b5aa-523aaaa367b3&CFTOKEN=0>.
35. GROMOS force field. [Online] http://www.gromacs.org/Documentation/Terminology/Force_Fields/GROMOS.
36. **Tirado-Rives, William L. Jorgensen and Julian.** The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*. 1996, 110, pp. 1657-1666.
37. **Romelia Salomon-Ferrer, David A. Case, Ross C. Walker.** An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Computational Molecular Science*. 2012, Vol. 3, pp. 198-210.
38. **Viktor Hornak, Robert Abel, Asim Okur, Bentley Strockbine, Adrian Roitberg, and Carlos Simmerling.** Comparison of multiple AMBER force fields and development of improved protein backbone parameters. *PROTEINS*. 2006, Vol. 65, pp. 712-725.
39. **Wendy D. Cornell, Piotr Cieplak, Christopher I. Bayly, Ian R. Gould, Kenneth M. Merz, Jr., David M. Ferguson, David C. Spellmeyer, Thomas Fox, James W. Caldwell, and Peter A. Kollman.** A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 1995, 117, pp. 5179-5197.
40. **Nilsson, Pekka Mark and Lennart.** Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry*. 2001, 105, pp. 9954-9960.
41. **James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kalé, and Klaus Schulten.** Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 2005, Vol. 26, pp. 1781-1802.
42. The Norma computer cluster. [Online] <http://norma.mbg.duth.gr/>.
43. **NM, Glykos.** Software news and updates. Carma: a molecular dynamics analysis program. *Journal of Computational Chemistry*. 2006, Vol. 27, pp. 1965-1768.
44. **Koukos PI, Glykos NM.** Grcarma: A fully automated task-oriented interface for the analysis of molecular dynamics trajectories. *Journal of Computational Chemistry*. 2013, Vol. 34, pp. 2310-2312.
45. **Matthias Heinig, Dmitrij Frishman.** STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acid Research*. 2004, Vol. 32, pp. 500-502.

46. **Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE.** WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*. 2004, Vol. 14, pp. 1188-1190.
47. **Rui Xu, Donald C. Wunsch.** Clustering Algorithms in Biomedical Research: A Review. *IEEE REVIEWS IN BIOMEDICAL ENGINEERING*. 2010, Vol. 3, pp. 120-154.
48. **Alexandros Altis, Phuong H. Nguyen, Rainer Hegger, Gerhard Stock.** Dihedral angle principal component analysis of molecular dynamics simulations. *THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*. 2007, Vol. 126.
49. **Charles C. David, Donald J. Jacobs.** Principal Component Analysis: A Method for Determining the Essential Dynamics of Proteins. *Methods in Molecular Biology*. 2014, Vol. 1084, pp. 193-226.
50. **Williamson, Mike P.** Applications of the NOE in Molecular Biology. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. 2009, 3, pp. 77-109.
51. **Jerome M. Karp, Ertan Eryilmaz, David Cowburn.** Correlation of chemical shifts predicted by molecular dynamics simulations for partially disordered proteins. *Journal of Biomolecular NMR*. 2015, Vol. 61, pp. 35-45.
52. **Mark V. Berjanskii, David S. Wishart.** Unraveling the meaning of chemical shifts in protein NMR. *Proteins and Proteomics*. 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.07.005>.
53. **D. C. DALGARNO, B. A. LEVINE, and R. J. P. WILLIAMS.** Structural information from NMR secondary chemical shifts of peptide α C-H protons in proteins. *Bioscience Reports*. 1983, Vol. 3, pp. 443-452.
54. **Steven P. Mielke, V.V. Krishnan.** Characterization of protein secondary structure from NMR chemical shifts. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2009, Vol. 54, pp. 141-165.
55. **Wishart, David S.** Interpreting protein chemical shift data. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2011, Vol. 58, pp. 62-87.
56. **David S. Wishart, Colin G. Bigam, Arne Holm, Robert S. Hodges and Brian D. Sykes.** ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of Biomolecular NMR*. 1995, Vol. 5, pp. 67-81.
57. **Keith J. Marciniowski, Haiyan Shao, Erin L. Clancy, Michael G. Zagorski.** Solution Structure Model of Residues 1-28 of the Amyloid β -Peptide When Bound to Micelles. *Journal of the American Chemical Society*. 1998, Vol. 120, pp. 11082-11091.
58. **Coles M, Bicknell W, Watson AA, Fairlie DP, Craik DJ.** Solution structure of amyloid beta-peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochemistry*. 1998, Vol. 37, pp. 11064-11077.

59. **Zhang S, Iwata K, Lachenmann MJ, Peng JW, Li S, Stimson ER, Lu Y, Felix AM, Maggio JE, Lee JP.** The Alzheimer's peptide a beta adopts a collapsed coil structure in water. *Journal of Structural Biology*. 2000, Vol. 130, pp. 130-141.
60. **Hoyer W, Grönwall C, Jonsson A, Ståhl S, Härd T.** Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, Vol. 105, pp. 5099-5104.
61. **Subramanian Vivekanandan, Jeffrey R. Brender, Shirley Y. Lee, Ayyalusamy Ramamoorthy.** A partially folded structure of amyloid-beta(1–40) in an aqueous environment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, Vol. 411, pp. 312-316.
62. **Salahuddin, Parveen.** Protein Folding, Misfolding, Aggregation And Amyloid Formation: Mechanisms of A β Oligomer Mediated Toxicities. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research*. 2015, Vol. 1, pp. 36-45.
63. **CHEWOOK LEE, SIHYUN HAM.** Characterizing Amyloid-Beta Protein Misfolding From Molecular Dynamics Simulations With Explicit Water. *Journal of Computational Chemistry*. 2011, Vol. 32, pp. 349-355.
64. **David J. Rosenman, Christopher Connors, Wen Chen, Chunyu Wang, Angel E. Garcia.** A β Monomers Transiently Sample Oligomer and Fibril-Like Configurations: Ensemble Characterization Using a Combined MD/NMR Approach. *Journal of Molecular Biology*. 2013, Vol. 425, pp. 3338-3359.
65. **Nikolaos G. Sgourakis, Yilin Yan, Scott McCallum, Chunyu Wang, and Angel E. Garcia.** The Alzheimer's Peptides A β 40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water: A Combined MD/NMR Study. *Journal of Molecular Biology*. 2007, Vol. 368, pp. 1448-1457.
66. **Nikolaos G. Sgourakis, Myrna Merced-Serrano, Christos Boutsidis, Petros Drineas, Zhemind Du, Chynyu Wand, Angel E. Garcia.** Atomic-Level Characterization of the Ensemble of the A β (1-42) Monomer in Water Using Unbiased Molecular Dynamics Simulations and Spectral Algorithms. *Journal of Molecular Biology*. 2011, Vol. 405, pp. 570-583.
67. **David J. Rosenman, Chunyu Wang, Angel E. García.** Characterization of Ab monomers through the convergence of ensemble properties among simulations with multiple force fields. *The Journal of Physical Chemistry*. 2016, Vol. 120, pp. 259-277.
68. **Christopher M. Siwy, Christopher Lockhart, Dmitri K. Klimov.** Is the Conformational Ensemble of Alzheimer's A β 10-40 Peptide Force Field Dependent? [Online] 2017. 10.1371/journal.pcbi.1005314.
69. **Martin Carballo-Pacheco, Birgit Strodel.** Comparison of force fields for Alzheimer's A β 42: a case study for intrinsically disordered proteins. *Protein Science*. 2017, Vol. 26, pp. 174-185.

70. **Wei Han, Yun-Dong Wu.** A Strand-Loop-Strand Structure Is a Possible Intermediate in Fibril Elongation: Long Time Simulations of Amyloid- β Peptide (10-35). *Journal of the American Chemical Society*. 2005, Vol. 127, pp. 15408-15416.
71. **Feng Ding, Jose M. Borreguero, Sergey V. Buldyrey, H. Eugene Stanley, Nikolay V. Dokholyan.** Mechanism for the α -Helix to β -Hairpin Transition. *PROTEINS*. 2013, Vol. 53, pp. 220-228.
72. **Nicolae-Viorel Buchete, Robert Tycko, Gerhard Hummer.** Molecular Dynamics Simulations of Alzheimer's β -Amyloid Protofilaments. *Journal of Molecular Biology*. 2005, Vol. 353, pp. 804-821.
73. **Simona Tomaselli, Veronica Esposito, Paolo Vangone, Nico A. J. van Nuland, Alexandre M. J. J. Bonvin, Remo Guerrini, Teodorico Tancredi, Piero A. Temussi, Delia Picone.** The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's A β (1-42) peptide in aqueous media is reversible a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding. *ChemBioChem*. 2006, Vol. 7, pp. 257-267.
77. **David S. Wishart, Brian D. Sykes.** The ^{13}C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *Journal of Biomolecular NMR*. 1994, Vol. 4, pp. 171-180.