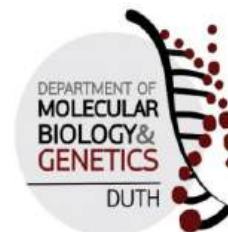




ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Αποδιάταξη πρωτεϊνικών στρωφών: προσομοιώσεις μοριακής
δυναμικής μιας παραλλαγής της πρωτεΐνης ROP με μερικά
ξεδιπλωμένες στροφές*

Καραποστόλη Γεωργία, 2572

Επιβλέπων:

Νικόλαος Μ. Γλυκός

Αναπληρωτής Καθηγητής Δομικής και Υπολογιστικής Βιολογίας

Εργαστήριο Δομικής και Υπολογιστικής Βιολογίας

Αλεξανδρούπολη, Ιούλιος 2025

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Αποδιάταξη πρωτεϊνικών στροφών: προσομοιώσεις μοριακής
δυναμικής μιας παραλλαγής της πρωτεΐνης ROP με μερικά
ξεδιπλωμένες στροφές*

Καραποστόλη Γεωργία, 2572

Επιβλέπων:

Νικόλαος Μ. Γλυκός

Αναπληρωτής Καθηγητής Δομικής και Υπολογιστικής Βιολογίας

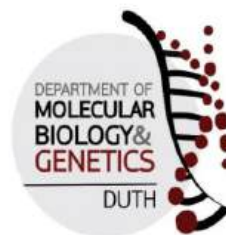
Εργαστήριο Δομικής και Υπολογιστικής Βιολογίας

Δηλώνω ότι η παρούσα εργασία με τίτλο “Αποδιάταξη πρωτεϊνικών στροφών: προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής μιας παραλλαγής της πρωτεΐνης ROP με μερικά ξεδιπλωμένες στροφές” είναι πρωτότυπη και πραγματοποιήθηκε από εμένα προσωπικά, προπτυχιακό φοιτητή του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, με Αρ. Μητρώου [2572]. Βεβαιώνω ότι κατά την εκπόνηση της εργασίας και τη συγγραφή της τηρήθηκαν τα προβλεπόμενα από το νόμο, καθώς και ότι ακολουθήθηκαν πλήρως οι αρχές της ακαδημαϊκής ηθικής και δεοντολογίας, οι οποίες απαγορεύουν την παραποίηση των αποτελεσμάτων, την κατάχρηση της διανοητικής ιδιοκτησίας άλλων και τη λογοκλοπή.

Αλεξανδρούπολη, Ιούλιος 2025



DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY & GENETICS



BACHELOR'S THESIS

***How protein turns unfold: molecular dynamics simulations of a ROP
protein variant carrying a partially unfolded turn***

Karapostoli Georgia, 2572

Supervisor:

Nicholaos M. Glykos

Associate Professor of Structural and Computational Biology

Structural and Computational Biology Lab

I declare that the present thesis entitled 'How protein turns unfold: molecular dynamics simulations of a ROP protein variant carrying a partially unfolded turn' is original and was carried out by me personally, as an undergraduate student of the Department of Molecular Biology and Genetics, with Registration Number [2572]. I certify that during the preparation and writing of the thesis, all legal requirements were followed, and that the principles of academic ethics and integrity were fully adhered to, which prohibit the falsification of results, the misuse of others' intellectual property, and plagiarism.

Alexandroupoli, July 2025

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον καθηγητή μου, Νικόλαο Γλυκό, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του. Η καθοδήγησή του όχι μόνο με βοήθησε να βρω τον δρόμο μου μέσα στο «χαώδες» σύμπαν της υπολογιστικής βιολογίας, αλλά και να τον περπατήσω με μεγαλύτερη σιγουριά.

Ευχαριστώ την οικογένειά μου, η οποία ήταν πάντα δίπλα μου, για τη συνεχή στήριξη και την αγάπη της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου για τη συμπαράσταση και το χιούμορ τους, και ιδιαίτερα στο φίλο μου, που με στήριξε με υπομονή και ηρεμία σε κάθε βήμα αυτής της πορείας.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	iv
Περίληψη.....	vi
Abstract.....	vii
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. ROP: Μια Μικρή Πρωτεΐνη, Ένα Χρήσιμο Μοντέλο.....	1
1.2. Μετάλλαξη A31P: Από την Αλανίνη στην Προλίνη.....	3
1.3. Ο Σκοπός της Εργασίας.....	5
2. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής.....	6
2.1. Βασικές Αρχές των Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής.....	6
2.2. Χρησιμότητα και Εφαρμογές των Προσομοιώσεων.....	8
3. Μεθοδολογία.....	8
3.1. Προετοιμασία του Συστήματος για Προσομοιώσεις.....	8
3.2. Πειραματικό μέρος: Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής....	10
4. Αποτελέσματα.....	10
4.1. Root Mean Square Deviation (RMSD).....	10
4.2. “Non-Interesting” Προσομοιώσεις (320K).....	11
4.3. “Non-Interesting” Προσομοιώσεις (340K).....	23
4.4. “Interesting” Προσομοιώσεις	30
4.4.1. Προσομοίωση 320K/004.....	31
4.4.2. Προσομοίωση 320K/012.....	34
4.5. Δομές με Υψηλό RMSD.....	38
4.5.1. Προσομοίωση 320K/008.....	39
4.5.2. Προσομοίωση 320K/046.....	42
4.5.3. Προσομοίωση 320K/057.....	45
4.6. Ανάλυση της Προσομοίωσης 340K/006.....	47
4.6.1. Dihedral PCA.....	47
4.6.2. Secondary Structure	48
4.6.3. Dihedral PCA: Ολόκληρη Δομή.....	49
4.6.4. Dihedral PCA: Στροφή Α αλυσίδας.....	54
4.6.5. Dihedral PCA: Στροφή Β αλυσίδας.....	58
4.6.6. Secondary Structure: Ολόκληρη Δομή.....	61
4.6.7. Secondary Structure: Στροφή Α αλυσίδας.....	66
4.6.8. Secondary Structure: Στροφή Β αλυσίδας.....	68
5. Συμπεράσματα.....	70
6. Βιβλιογραφία.....	71

Περίληψη

Η πρωτεΐνη Rop είναι μια μικρή, καλά μελετημένη πρωτεΐνη του *E. coli* με δομή 4-α-ελικοειδούς δεματίου και ευαισθησία σε μεταλλάξεις. Η μετάλλαξη A31P μεταβάλλει την τοπολογία της σε μορφή “bisecting U”, επηρεάζοντας τη σταθερότητά της. Στην παρούσα εργασία μελετάται η συμπεριφορά μιας μερικώς ξεδιπλωμένης μορφής της Rop, προερχόμενης από τη φυσιολογική της δομή, στην οποία έχει εισαχθεί υπολογιστικά η μετάλλαξη A31P. Σκοπός είναι να διερευνηθεί αν η παρουσία της προλίνης στη θέση 31 μπορεί να οδηγήσει τη συγκεκριμένη μορφή σε πλήρη αποδιάταξη. Πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε θερμοκρασίες 320 K και 340 K, με αναλύσεις διαγραμμάτων RMSD σε συνάρτηση με το χρόνο, κύριων συνιστωσών στις διέδρες γωνίες και δευτεροταγούς δομής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη δεν αποδιατάσσεται περαιτέρω, αλλά αναδιπλώνεται σταδιακά προς τη φυσιολογική της μορφή. Η προλίνη στη θέση 31 φαίνεται να μην είναι συμβατή με αυτή τη δομή, καθώς εμποδίζει την πλήρη αποκατάσταση χωρίς όμως να οδηγεί σε πλήρη αποδιάταξη.

Λέξεις κλειδιά: πρωτεΐνη Rop, μετάλλαξη A31P, προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

Abstract

The Rop protein is a small, well-studied protein from *E. coli*, characterized by a 4-helix bundle structure and sensitivity to mutations. The A31P mutation alters its topology into a “bisecting U” form, affecting its stability. This study investigates the behavior of a partially unfolded form of Rop, derived from its native structure into which the A31P mutation has been computationally introduced. The aim is to examine whether the presence of proline at position 31 can lead this particular unfolded form to complete unfolding. Molecular dynamics simulations were performed at temperatures of 320 K and 340 K, with analyses including RMSD plots over time, dihedral Principal Component Analysis and secondary structure evaluation. The results showed that the protein does not further unfold but gradually refolds towards its native conformation. Proline at position 31 appears to be incompatible with this structure, as it prevents full restoration without causing complete unfolding.

Keywords: Rop protein, A31P mutation, molecular dynamics simulations

1. Εισαγωγή

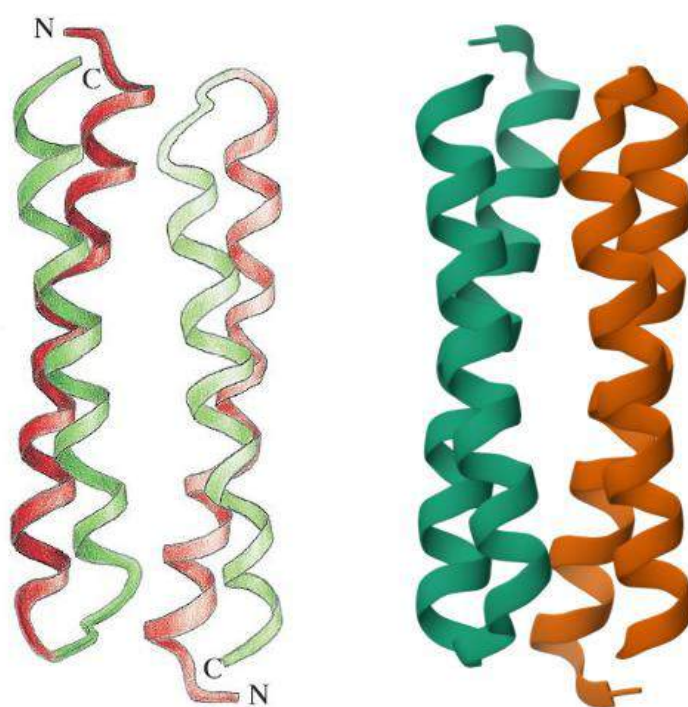
1.1. ROP: Μια Μικρή Πρωτεΐνη, Ένα Χρήσιμο Μοντέλο

Η παρούσα εργασία εξετάζει την πρωτεΐνη Rop (Repressor of Primer), μια μικρή πρωτεΐνη που απαντάται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και συγκεκριμένα στο βακτήριο *Escherichia coli*. Παρά το μικρό μοριακό της μέγεθος (~15 kDa), διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του αριθμού αντιγράφων των πλασμιδίων τύπου ColE1, λειτουργώντας ως αρνητικός ρυθμιστής της αντιγραφής τους. Η δράση της βασίζεται στη μεσολάβηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο μικρών RNA μορίων: του RNA I, που λειτουργεί ανασταλτικά, και του RNA II, το οποίο αποτελεί το κινητήριο μόριο για την έναρξη της αντιγραφής. Μέσω της σταθεροποίησης του συμπλόκου RNA I - RNA II, η Rop προάγει την αποτελεσματική αναστολή της αντιγραφικής διαδικασίας, συμβάλλοντας στον αυστηρό έλεγχο του αριθμού των πλασμιδίων στο κύτταρο [1,2].

Η πρωτεΐνη Rop παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της χαρακτηριστικής της δομής, η οποία αποτελείται από τέσσερις α -έλικες που σχηματίζουν ένα σταθερό σύμπλεγμα. Αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα πρωτεΐνης με υπερδευτεροταγή δομή, σχηματίζοντας ένα 4- α -ελικοειδές δεμάτιο (4- α -helical bundle), όπου οι α -έλικες συγκροτούνται μεταξύ τους μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου [3,4]. Πρόκειται για ένα ομοδιμερές, με καθεμία από τις δύο ταυτόσημες πολυπεπτιδικές αλυσίδες του (A και B) να περιλαμβάνει 63 αμινοξέα. Κάθε αλυσίδα σχηματίζει δύο αντιπαράλληλες α -έλικες, συνδεδεμένες μέσω ενός σύντομου βρόχου τριών καταλοίπων, οδηγώντας σε μια χαρακτηριστική διάταξη έλικα-στροφή-έλικα (helix-turn-helix). Αυτή η δομή συμβάλλει στο σχηματισμό ενός αντιπαράλληλου σπειρωμένου σπειράματος (coiled-coil) ανάμεσα στις α -έλικες, όπου οι έλικες της κάθε αλυσίδας τυλίγονται μεταξύ τους δημιουργώντας μία διπλή υπερέλικα (εικόνα 1 και 2) [3,5].

Η Rop είναι μια καλά μελετημένη και χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για πειραματικές και υπολογιστικές μελέτες [1,5]. Λόγω της απλής δομής της και της ασυνήθιστης ευαισθησίας της σε μεταλλάξεις, κυρίως στην περιοχή του βρόχου, έχει προσελκύσει σημαντικό ερευνητικό

ενδιαφέρον. Οι μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη σταθερότητα και τη δυναμική της πρωτεΐνης, καθιστώντας τη μελέτη τους κρίσιμη για την κατανόηση της σχέσης δομής-λειτουργίας [6,7,8]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μετάλλαξη A31P, που προκαλεί αλλαγές στη δομή του βρόχου και επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά της πρωτεΐνης κατά την αναδίπλωση. Η αξιολόγηση και η ανάλυση τέτοιου είδους μεταλλάξεων συνεισφέρει νέα επιστημονικά δεδομένα σχετικά με τους παράγοντες που μεταβάλλουν τη σταθερότητα και τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Rop. [8,9].



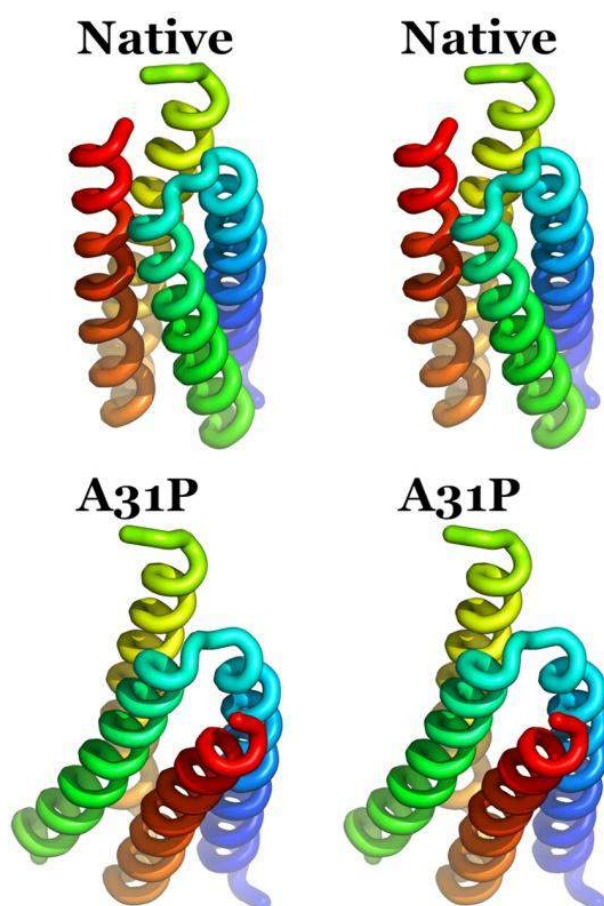
Εικόνα 1 και 2: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης Rop. Το 4-α-ελικοειδές δεμάτιο σχηματίζεται από δύο συμμετρικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, καθεμία από τις οποίες φέρει δύο αντιπαράλληλες α-έλικες. Οι έλικες της κάθε αλυσίδας σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο σπειρωμένο σπείραμα (coiled-coil). Αναπαραγωγή χωρίς άδεια από τους Branden C., Tooze J. Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών, 2η Έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 1999. (αριστερή εικόνα) και RCSB PDB-1ROP (δεξιά εικόνα) 2025.

1.2. Μετάλλαξη A31P: Από την Αλανίνη στην Προλίνη

Η μετάλλαξη A31P στην πρωτεΐνη Rop αφορά την αντικατάσταση της αλανίνης στη θέση 31 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με προλίνη, προκαλώντας σημαντική αλλαγή στη δομή της και τη σταθερότητά της. Η Rop σχηματίζει συνήθως ένα αριστερόστροφο 4-α-ελικοειδές δεμάτιο με σταθερή επταδική περιοδικότητα, η οποία είναι ένα μοτίβο επτά διαδοχικών αμινοξέων, όπου συγκεκριμένες θέσεις (a και d) είναι υδρόφοβες και ευθύνονται για τη σωστή αναδίπλωση και αλληλεπίδραση των α-ελίκων στον υδρόφοβο πυρήνα του δεματίου [8,9].

Η αλανίνη στη θέση 31 έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς είναι το μοναδικό αμινοξύ στο βρόχο που συνδέει τις δύο α-έλικες και ταυτόχρονα σχηματίζει υδρογονικούς δεσμούς με αμινοξέα και από τις δύο έλικες, συμβάλλοντας στη σταθερότητα και τη διατήρηση της δομής του δεματίου [1,4]. Συνεπώς, η αντικατάστασή της με προλίνη, ένα αμινοξύ με περιορισμένη ευελιξία και διαφορετική δομή, διαταράσσει αυτήν την κρίσιμη αλληλεπίδραση. Ειδικότερα, η προλίνη στη θέση 31 δεν επιτρέπει το σχηματισμό δίεδρων γωνιών, ούτε συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου, όπως η αλανίνη, με αποτέλεσμα να προκαλεί σημαντική τοπική αναδιαμόρφωση στο βρόχο [10]. Κάτι τέτοιο διαταράσσει την περιοδικότητα της δομής οδηγώντας σε αλλαγή της τοπολογίας σε μια νέα, δεξιόστροφη μορφή που ονομάζεται «bisecting U» (εικόνα 3). Η μεταβολή αυτή επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ελίκων και μειώνει περαιτέρω τη σταθερότητα της πρωτεΐνης [9,10,11].

Στο άρθρο «The Curious Case of A31P, a Topology-Switching Mutant of the Repressor of Primer Protein: A Molecular Dynamics Study of Its Folding and Misfolding», οι συγγραφείς διερεύνησαν τη συμπεριφορά της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης A31P μέσω μοριακών προσομοιώσεων. Ξεκινώντας από την φυσιολογική δομή της Rop, αντικατέστησαν υπολογιστικά την αλανίνη στη θέση 31 με προλίνη και παρατήρησαν τη δομική της εξέλιξη κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αρχική, φυσιολογική δομή της Rop καθίσταται ασταθής λόγω της μετάλλαξης, οδηγώντας σε μερική αποδίπλωση του βρόχου της A αλυσίδας. Η αλλαγή αυτή συμφωνεί με τα πειραματικά δεδομένα, σε αντίθεση με αρχικές υπολογιστικές προβλέψεις που υποστήριζαν διατήρηση της φυσιολογικής δομής, γεγονός που οδήγησε στη μελέτη του παραπάνω υποθετικού μοντέλου [9].



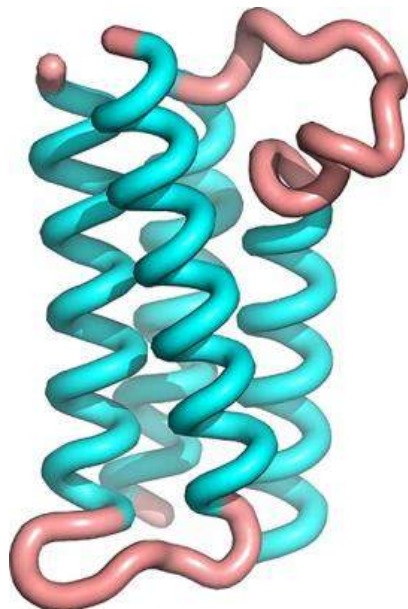
Εικόνα 3: Στερεοδιαγράμματα (wall-eyed) της φυσιολογικής Rop (πάνω) και της μεταλλαγμένης A31P (κάτω), με χρωματισμό από N (μπλε) σε C-τελικό (κόκκινο). Η Rop έχει αριστερόστροφη 4-α-ελικοειδή διάταξη, ενώ η A31P μεταβάλλει την τοπολογία σε δεξιόστροφη «bisecting U». Αναπαραγωγή χωρίς άδεια από τους Vouzina, O.-D., Tapanidis, A. & Glykos*, N.M. (2024), «The curious case of A31P, a topology-switching mutant of the Repressor of Primer protein: A molecular dynamics study of its folding and misfolding».

1.3. Ο Σκοπός της Εργασίας

Η παρούσα πτυχιακή εργασία επεκτείνει τη μελέτη που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα, εστιάζοντας στη δυναμική συμπεριφορά μιας μερικώς ξεδιπλωμένης διαμόρφωσης της πρωτεΐνης Rop, στην οποία έχει εισαχθεί υπολογιστικά η μετάλλαξη A31P. Η ξεδιπλωμένη περιοχή εντοπίζεται κυρίως στο βρόχο της A αλυσίδας της πρωτεΐνης, ενώ η B αλυσίδα διατηρεί σε μεγαλύτερο βαθμό τη δευτεροταγή της δομή. Αν και η συγκεκριμένη διαμόρφωση δεν έχει προσδιοριστεί πειραματικά, χρησιμοποιείται ως σημείο εκκίνησης για να διερευνηθεί κατά πόσο η πρωτεΐνη μπορεί να ξεδιπλωθεί πλήρως λόγω της μετάλλαξης. Στόχος είναι να αξιολογηθεί αν η παρουσία της προλίνης στη θέση 31 προκαλεί τόσο έντονη διαταραχή, ώστε να οδηγήσει σε ολοκληρωμένη αποδόμηση της φυσιολογικής δομής της Rop.

Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο η μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή της Rop με την μετάλλαξη A31P (εικόνα 4) και πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες: 320 Kelvin (K) και 340 K, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της θερμικής ενέργειας στη δομική της σταθερότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τη δομή που χρησιμοποιήθηκε έχουν αφαιρεθεί τα κατάλοιπα 58-63, καθώς παρουσιάζουν υψηλή κινητικότητα που επηρεάζει αρνητικά την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Οι προσομοιώσεις επιτρέπουν την παρακολούθηση της δομικής εξέλιξης της πρωτεΐνης, αποκαλύπτοντας αλλαγές στη δευτεροταγή δομή κατά την αναδίπλωση ή αποδίπλωση.

Μέσω μεθόδων, όπως η ανάλυση των διαγραμμάτων του RMSD (Root Mean Square Deviation) σε συνάρτηση με το χρόνο, που καταγράφουν τις μεταβολές στις θέσεις των ατόμων με το χρόνο και η παρακολούθηση της δευτεροταγούς δομής, αξιολογείται η σταθερότητα και η εξέλιξη της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης. Παράλληλα, αναλύθηκε μία συγκεκριμένη προσομοίωση μέσω αναλύσεων dPCA (dihedral Principal Component Analysis) και Secondary Structure με τη βοήθεια του εργαλείου grcarma, για την εξαγωγή κύριων συνιστωσών, που αποτυπώνουν τις κυριότερες διαμορφωτικές μεταβολές στο χρόνο, καθώς και των μεταβολών στα δευτεροταγή στοιχεία, όπως οι α-έλικες και τα β-φύλλα, αντίστοιχα.



Εικόνα 4: Τρισδιάστατη απεικόνιση της μερικώς ξεδιπλωμένης μορφής της φυσιολογικής πρωτεΐνης Rop, που φέρει τη μετάλλαξη A31P στην οποία είναι εμφανής η αποδιάταξη του βρόχου της Α αλυσίδας, η οποία βρίσκεται στο πίσω μέρος της δομής. Αναπαραγωγή χωρίς άδεια από τους Vouzina, O.-D., Tafañidis A. & Glykos N.M. (2024), «The curious case of A31P, a topology-switching mutant of the Repressor of Primer protein: A molecular dynamics study of its folding and misfolding».

2. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

2.1. Βασικές Αρχές των Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (molecular dynamics simulations) αποτελούν θεμελιώδες εργαλείο στη βιολογία, καθώς επιτρέπουν την παρακολούθηση της κίνησης των ατόμων μέσα σε μεγάλα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA, κατά την πάροδο του χρόνου [12]. Πρόκειται για μια υπολογιστική μέθοδο που στηρίζεται στην επίλυση των κλασικών εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα για κάθε άτομο του συστήματος. Η βασική εξίσωση που χρησιμοποιείται είναι:

$$m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = \mathbf{f}_i,$$

όπου m_i είναι η μάζα του ατόμου i και $\ddot{\mathbf{r}}_i$ η επιτάχυνσή του. Η δύναμη $\mathbf{f}_i$ υπολογίζεται από το δυναμικό ενέργειας U , το οποίο περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων [13].

Για τον υπολογισμό αυτών των αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιούνται τα δυναμικά πεδία (force fields), δηλαδή σύνολα εξισώσεων και παραμέτρων που προσεγγίζουν τη συνολική δυναμική ενέργεια του συστήματος [14]. Οι εξισώσεις αυτές περιλαμβάνουν όρους για δεσμικές (bonding) και μη δεσμικές (non-bonding) αλληλεπιδράσεις.

Οι δεσμικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τα εξής:

- Bond stretching: ενέργεια από παραμόρφωση του μήκους του δεσμού,
- Angle bending: ενέργεια από παραμόρφωση της γωνίας μεταξύ δύο δεσμών,
- Dihedral torsions: ενέργεια από περιστροφή γύρω από δεσμούς που καθορίζουν 4 διαδοχικά άτομα και
- Improper torsions: χρησιμοποιούνται για να διατηρούν την επίπεδη γεωμετρία ή να αποτρέπουν μη ρεαλιστικές διαμορφώσεις [13,14].

Ενώ οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τις:

- Δυνάμεις van der Waals: ασθενείς ελκτικές ή απωστικές δυνάμεις μεταξύ μορίων ή ατόμων και τις
- Ηλεκτροστατικές δυνάμεις: έλξη ή άπωση μεταξύ φορτισμένων ομάδων ή ιόντων [13,14].

Επιπλέον, για να αξιολογηθεί η σημασία των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων είναι απαραίτητη η σύνδεσή τους με τις αρχές της στατιστικής μηχανικής. Μέσω αυτής, τα δεδομένα που προκύπτουν από τις μικροσκοπικές κινήσεις των ατόμων μπορούν να μεταφραστούν σε μακροσκοπικές ιδιότητες του συστήματος, όπως η θερμοκρασία, η πίεση και η ολική ενέργεια (κινητική + δυναμική). Η στατιστική μηχανική λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ του ατομικού επιπέδου και της θερμοδυναμικής περιγραφής, επιτρέποντας την εξαγωγή μέσω των τιμών και τη μελέτη της συμπεριφοράς του συστήματος σε ισορροπία [15].

2.2. Χρησιμότητα και Εφαρμογές των Προσομοιώσεων

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής εφαρμόζονται ευρέως στη βιολογία και τη φαρμακευτική, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή, τη λειτουργία και τη δυναμική των βιολογικών μορίων. Χρησιμοποιούνται για τη μελέτη μηχανισμών πρωτεϊνικής δράσης, την κατανόηση παθολογικών φαινομένων, όπως η πρωτεϊνική συσσώρευση σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καθώς και για την υποστήριξη του σχεδιασμού φαρμάκων μέσω ανάλυσης της αλληλεπίδρασης φαρμάκου-στόχου. Επιπλέον, βοηθούν στην τροποποίηση πρωτεϊνών για νέες εφαρμογές, στη βελτίωση πειραματικών δεδομένων, όπως αυτά της κρυσταλλογραφίας και στην αξιολόγηση των επιπτώσεων μεταλλάξεων στη δομή και λειτουργία των μορίων αυτών [16,17].

Οι προσομοιώσεις αποτελούν πλέον βασικό εργαλείο για τη μελέτη της δομής και της δυναμικής πεπτιδίων και πρωτεϊνών, επιτρέποντας την παρακολούθηση της κίνησης σε ατομικό επίπεδο. Η βελτίωση των δυναμικών πεδίων και η αύξηση της υπολογιστικής ισχύος έχουν ενισχύσει σημαντικά την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα αυτών των μεθόδων, επιτρέποντας την καλύτερη κατανόηση των βιολογικών διεργασιών και των μοριακών μηχανισμών [18].

3. Μεθοδολογία

3.1. Προετοιμασία του Συστήματος για Προσομοιώσεις

Για τη μελέτη της πρωτεΐνης Ror χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GROMACS, ένα γρήγορο και ευέλικτο εργαλείο μοριακής δυναμικής, που επιτρέπει την προσομοίωση των κινήσεων βιομορίων σε ατομικό επίπεδο. Κυρίως προορίζεται για βιολογικά μόρια, αλλά χρησιμοποιείται και σε μη βιολογικά συστήματα, λόγω της υψηλής υπολογιστικής του απόδοσης [19].

Πριν την εκτέλεση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, κρίθηκε απαραίτητη η προσεκτική προετοιμασία του συστήματος. Το δυναμικό πεδίο που χρησιμοποιήσαμε είναι το AMBER99SB*-ILDN, το οποίο είναι η πιο βελτιωμένη

έκδοση του AMBER99SB με πιο ακριβείς παραμέτρους για πλευρικές στροφές συγκεκριμένων αμινοξέων, προσφέροντας έτσι πιο ρεαλιστική προσομοίωση πρωτεϊνικών δομών και καλύτερη απόδοση σε μοριακές δυναμικές μελέτες [20]. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπολογιστικά με τη χρήση του GROMACS σε περιβάλλον Linux, εξασφαλίζοντας φυσιολογικές και αξιόπιστες συνθήκες προσομοίωσης.

Ως αρχική δομή χρησιμοποιήσαμε την προαναφερθείσα μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης Ror με τη μετάλλαξη A31P. Η πρωτεΐνη τοποθετήθηκε σε ένα τρισδιάστατο εικονικό κουτί (simulation box), το οποίο ορίζει τον χώρο στον οποίο εκτελείται η προσομοίωση. Αυτό το κουτί εξασφαλίζει ότι η προσομοίωση επαναλαμβάνεται χωρίς τεχνητά όρια, ώστε να αποτυπώνει σωστά το φυσικό περιβάλλον της πρωτεΐνης. Για την προσομοίωση του νερού χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο TIP3P, το οποίο παρέχει μια αξιόπιστη και ρεαλιστική απεικόνιση της δυναμικής συμπεριφοράς του νερού και των αλληλεπιδράσεών του με τις πρωτεΐνες [21,22].

Συγχρόνως, προκειμένου να επιτευχθεί η ηλεκτρική ουδετερότητα του συστήματος προσθέσαμε ιόντα νατρίου (Na^+) και χλωρίου (Cl^-), ώστε να εξουδετερωθεί το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ενεργειακή ελαχιστοποίηση, με σκοπό την αφαίρεση ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων και γεωμετρικών παραμορφώσεων, ώστε να δημιουργηθεί μια σταθερότερη αρχική κατάσταση [21,22].

Η διαδικασία συνεχίστηκε με δύο στάδια εξισορρόπησης για να προετοιμαστεί κατάλληλα το σύστημα. Στο πρώτο στάδιο (NVT ensemble), το σύστημα διατηρήθηκε σε σταθερό όγκο και θερμοκρασία, επιτρέποντας την ομοιόμορφη κατανομή της θερμικής ενέργειας και την σταθεροποίησή του στη θερμοκρασία στόχο. Στο δεύτερο στάδιο (NPT ensemble), το σύστημα διατηρήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία και πίεση, με το εικονικό κουτί να προσαρμόζεται, έτσι ώστε να επιτευχθεί η σωστή πυκνότητα του διαλύματος, προσομοιάζοντας καλύτερα τις πραγματικές συνθήκες [21,22].

Με τα παραπάνω βήματα διαμορφώθηκε ένα θερμοδυναμικά ισορροπημένο και υπολογιστικά σταθερό περιβάλλον, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως σημείο εκκίνησης

για όλες τις προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας.

3.2. Πειραματικό μέρος: Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Το πειραματικό μέρος της εργασίας επικεντρώθηκε στην εκτέλεση πολυάριθμων μοριακών προσομοιώσεων της πρωτεΐνης Rop, προκειμένου να διερευνηθεί το υποθετικό ερώτημα της εργασίας, και συγκεκριμένα αν η μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης με τη μετάλλαξη A31P αποδιατάσσεται πλήρως ή αναδιπλώνεται ξανά προς τη φυσική της δομή. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν συνολικά 90 προσομοιώσεις: 60 προσομοιώσεις σε θερμοκρασία 320 K και 30 προσομοιώσεις σε θερμοκρασία 340 K.

Η επιλογή των δύο θερμοκρασιών αποσκοπεί στην εκτεταμένη ανάλυση της δυναμικής συμπεριφοράς της πρωτεΐνης και την παρακολούθηση της δομής της υπό διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες που μπορεί να επηρεάσουν τον μηχανισμό αναδίπλωσης ή αποδιάταξης. Η εκτέλεση πολλαπλών προσομοιώσεων σε κάθε θερμοκρασία εξασφάλισε τη συλλογή στατιστικά αξιόπιστων δεδομένων. Τα δεδομένα αυτά αποτέλεσαν τη βάση για την εξαγωγή και ανάλυση των αποτελεσμάτων, με στόχο τη διατύπωση έγκυρων και αξιόπιστων συμπερασμάτων για το υποθετικό ερώτημα της εργασίας.

4. Αποτελέσματα

4.1. Root Mean Square Deviation (RMSD)

Το RMSD (Ρίζα Μέσης Τετραγωνικής Απόκλισης) αποτελεί ένα σημαντικό μέτρο που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των διαφορών μεταξύ δύο τρισδιάστατων δομών πρωτεϊνών, μετά από βέλτιστη ευθυγράμμιση των ατόμων τους. Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, το RMSD χρησιμοποιείται για να παρακολουθούμε πώς μεταβάλλεται η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης με την

πάροδο του χρόνου, συγκρίνοντας κάθε χρονικό σημείο με την αρχική της μορφή. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούμε να εκτιμήσουμε αν η δομή παραμένει σταθερή, αν υφίσταται μικρές διακυμάνσεις ή αν αλλάζει σημαντικά λόγω αποδιάταξης. Χαμηλές τιμές RMSD (π.χ. 0.8-1.0 Å) υποδεικνύουν ότι η δομή παραμένει σταθερή και παρόμοια με την αρχική, ενώ υψηλότερες τιμές συνήθως αντανακλούν σημαντικές αλλαγές, όπως αποδίπλωση της δομής [23,24].

4.2. “Non-Interesting” Προσομοιώσεις (320K)

Τα διαγράμματα RMSD ως συνάρτηση του χρόνου που ακολουθούν, προέκυψαν από την ανάλυση των προσομοιώσεων και παρουσιάζουν την εξέλιξη της αναδίπλωσης και αποδίπλωσης της υποθετικής πρωτεΐνης Ror σε κάθε περίπτωση. Για τη δημιουργία τους χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα plot, ένα απλό και αποτελεσματικό εργαλείο σχεδίασης, που επιτρέπει τη γρήγορη παραγωγή διαγραμμάτων μέσω εντολών σε περιβάλλον Linux [25]. Στη συνέχεια, επεξεργαστήκαμε τα δεδομένα από τις προσομοιώσεις με τη βοήθεια του xmgr, ένα πρόγραμμα που διευκολύνει τη δημιουργία και την επεξεργασία γραφημάτων με απλό και ευέλικτο τρόπο.

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει συνοπτικά τις 60 προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 320 K, καταγράφοντας για καθεμία τον αριθμό της, τη θερμοκρασία και τη διάρκεια.

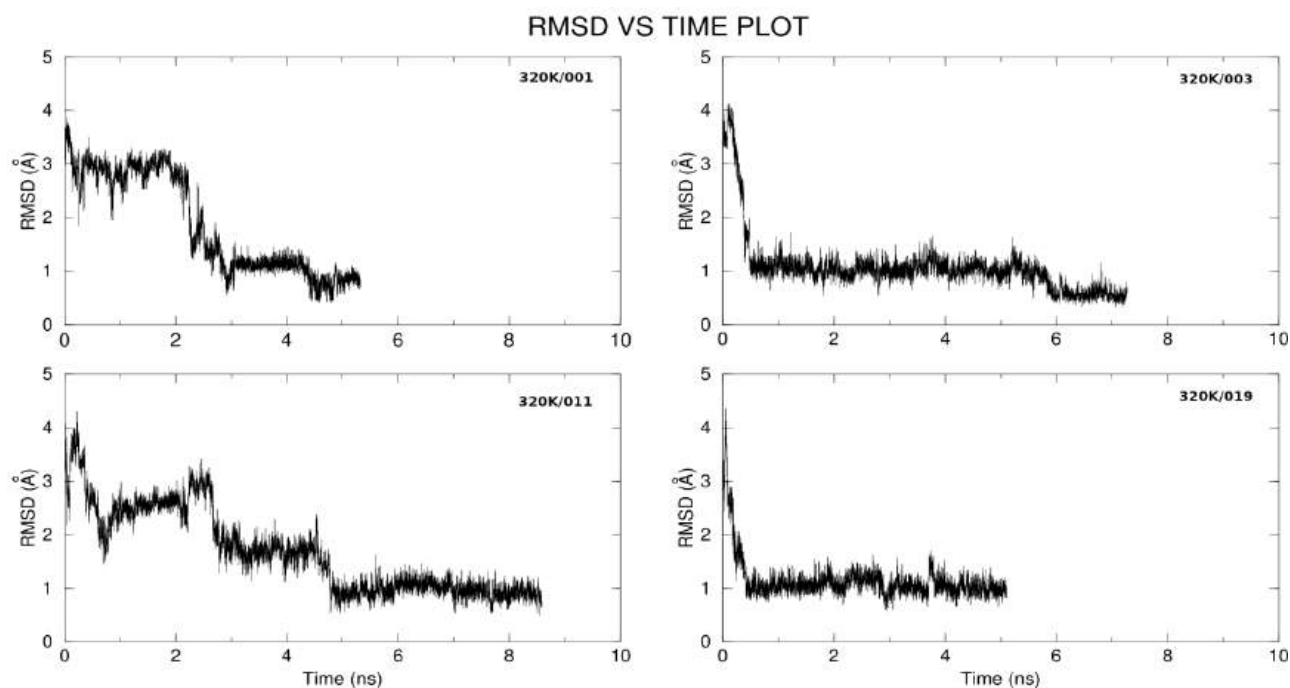
Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των 60 προσομοιώσεων σε θερμοκρασία 320 K. Για κάθε προσομοίωση αναγράφονται ο αριθμός της, η θερμοκρασία και η συνολική διάρκειά της.

Αριθμός Προσομοιώσεων	Θερμοκρασία (K)	Χρόνος (ns)
RUN 001	320	5.32
RUN 002	320	30.02
RUN 003	320	7.26
RUN 004	320	2000.02
RUN 005	320	17.26
RUN 006	320	537.90
RUN 007	320	70.01

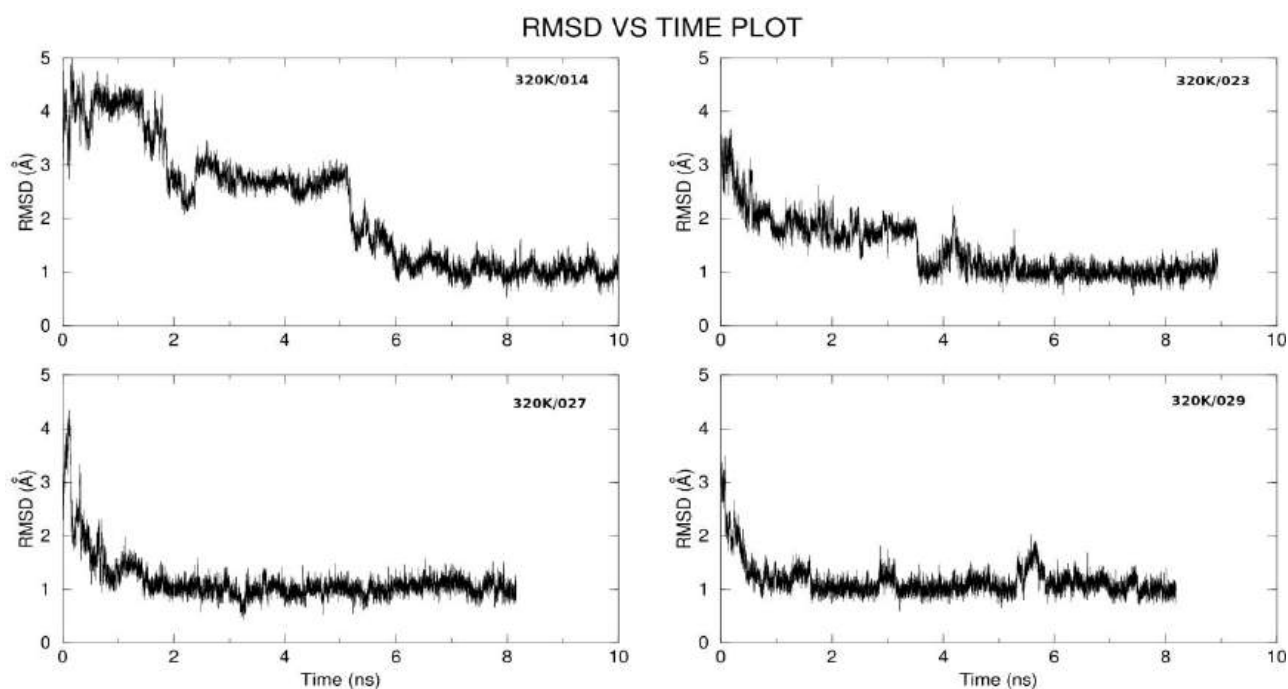
RUN 008	320	56.76
RUN 009	320	75.83
RUN 010	320	44.96
RUN 011	320	8.58
RUN 012	320	1836.66
RUN 013	320	49.13
RUN 014	320	10.01
RUN 015	320	13.92
RUN 016	320	27.59
RUN 017	320	16.89
RUN 018	320	11.69
RUN 019	320	5.09
RUN 020	320	22.37
RUN 021	320	22.93
RUN 022	320	14.02
RUN 023	320	8.93
RUN 024	320	16.54
RUN 025	320	17.81
RUN 026	320	89.14
RUN 027	320	8.15
RUN 028	320	15.67
RUN 029	320	8.19
RUN 030	320	23.62
RUN 031	320	12.53
RUN 032	320	57.98
RUN 033	320	22.35
RUN 034	320	10.41
RUN 035	320	95.17
RUN 036	320	10.96
RUN 037	320	26.79
RUN 038	320	23.13
RUN 039	320	51.37
RUN 040	320	7.44
RUN 041	320	63.12
RUN 042	320	68.12
RUN 043	320	61.92
RUN 044	320	6.62
RUN 045	320	3.64
RUN 046	320	18.20
RUN 047	320	144.80
RUN 048	320	4.03
RUN 049	320	3.49
RUN 050	320	4.02
RUN 051	320	3.06
RUN 052	320	6.86
RUN 053	320	4.22
RUN 054	320	2.88
RUN 055	320	9.95

RUN 056	320	3.31
RUN 057	320	52.61
RUN 058	320	4.80
RUN 059	320	9.85
RUN 060	320	2.36

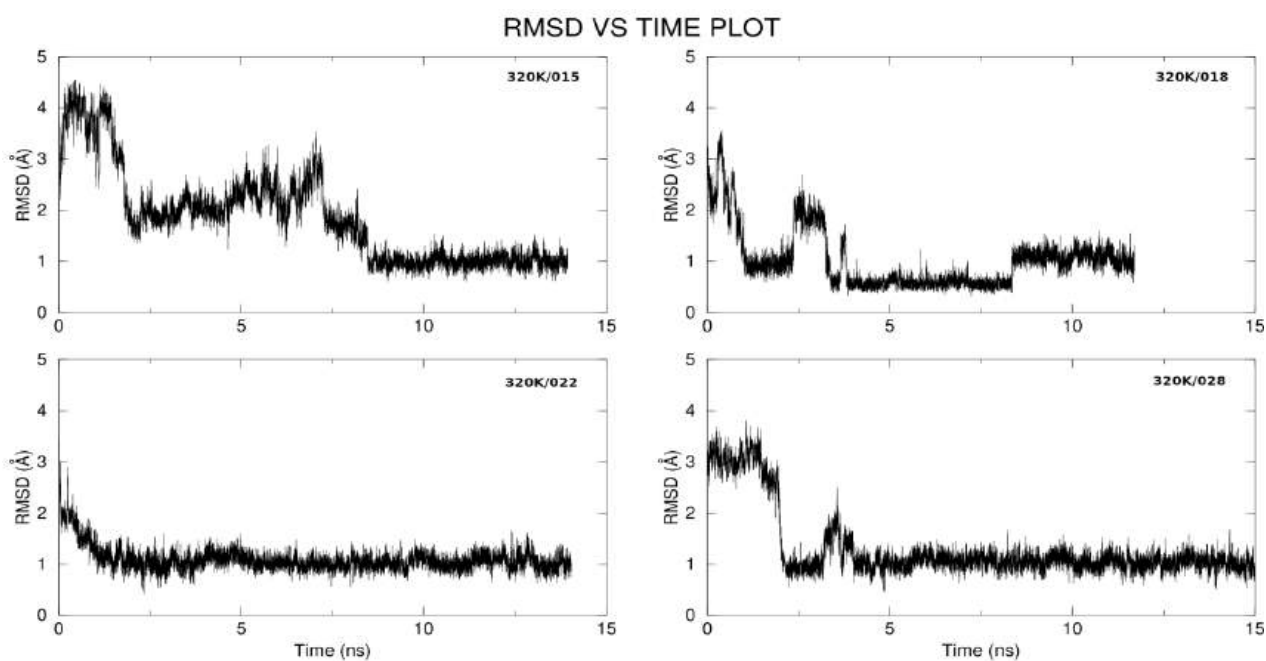
Παρακάτω παρουσιάζονται επιλεγμένα διαγράμματα RMSD από τις προσομοιώσεις στους 320 K, στα οποία παρατηρείται ταχεία μείωση του RMSD στο εύρος 0.8-1.0 Å. Οι εικόνες έχουν διαμορφωθεί έτσι ώστε κάθε μία να περιλαμβάνει τέσσερις προσομοιώσεις, με την αντίστοιχη θερμοκρασία και τον αριθμό της κάθε προσομοίωσης να αναγράφονται στην επάνω δεξιά γωνία κάθε γραφήματος. Η επιλογή και η ομαδοποίηση όλων των διαγραμμάτων έγινε με βάση τη χρονική στιγμή ολοκλήρωσης της κάθε προσομοίωσης, ώστε να συγκρίνονται μεταξύ τους περιπτώσεις με παρόμοια διάρκεια. Αξιοσημείωτο είναι ότι η διάρκεια των προσομοιώσεων ποικίλλει σημαντικά: ορισμένες έχουν εκταθεί σε πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (~2000 nanoseconds - ns), ενώ άλλες ολοκληρώνονται σε μόλις 2 ή 5 ns. Αυτή η ποικιλία στη χρονική κλίμακα επιτρέπει την παρακολούθηση τόσο της άμεσης όσο και της μακροπρόθεσμης σταθεροποίησης της δομής, προσφέροντας πληρέστερη εικόνα για τη δυναμική της αναδίπλωσης.



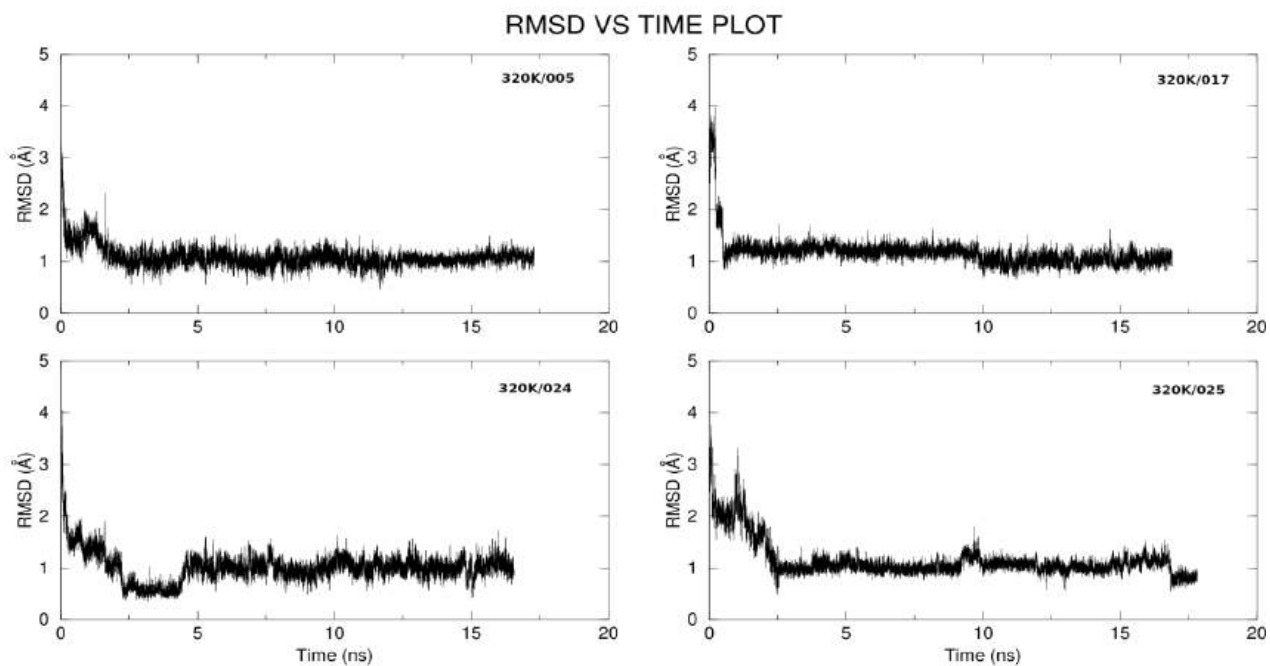
Εικόνα 5: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (001, 003, 011, 019) στην ίδια θερμοκρασία.



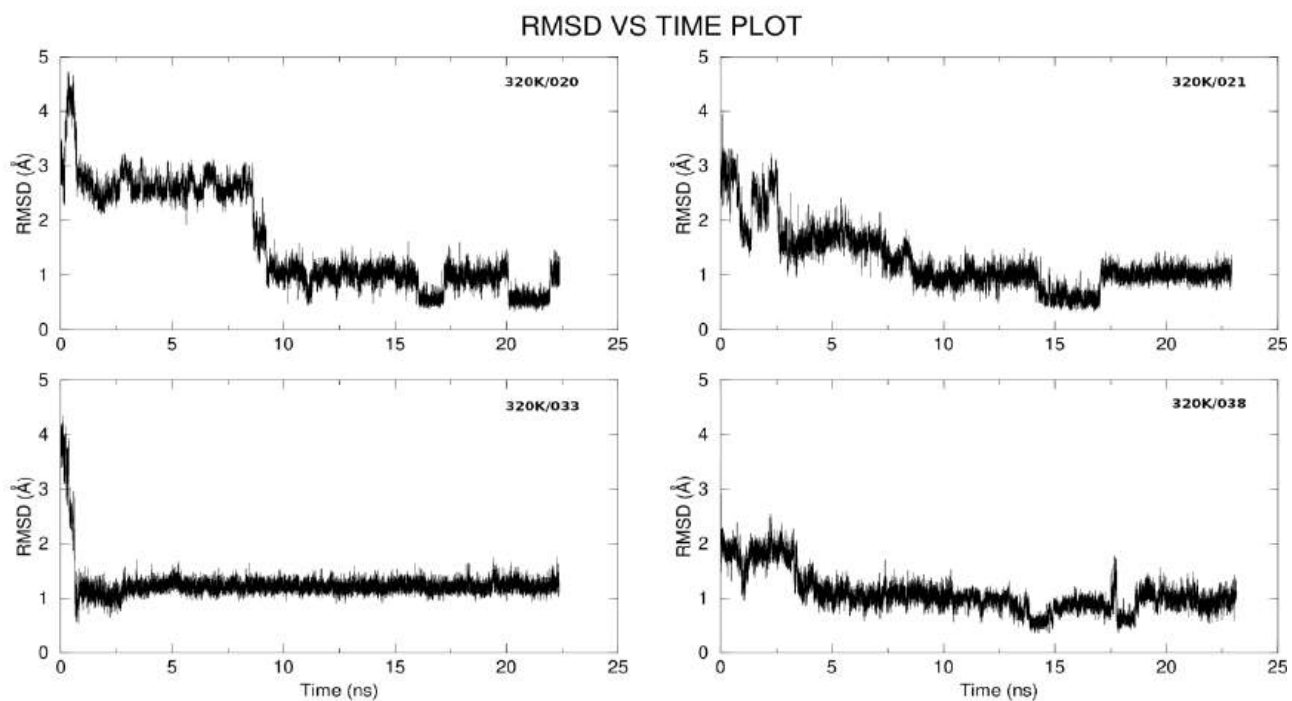
Εικόνα 6: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (014, 023, 027, 029) στην ίδια θερμοκρασία.



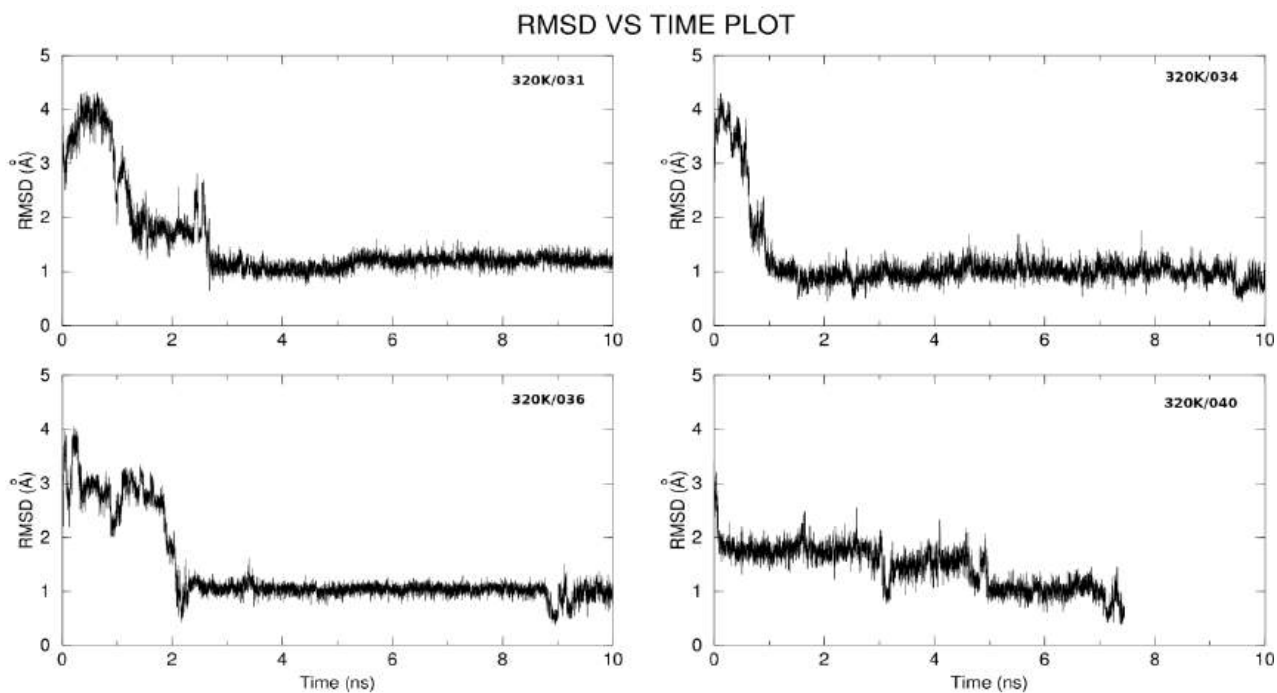
Εικόνα 7: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (015, 018, 022, 028) στην ίδια θερμοκρασία.



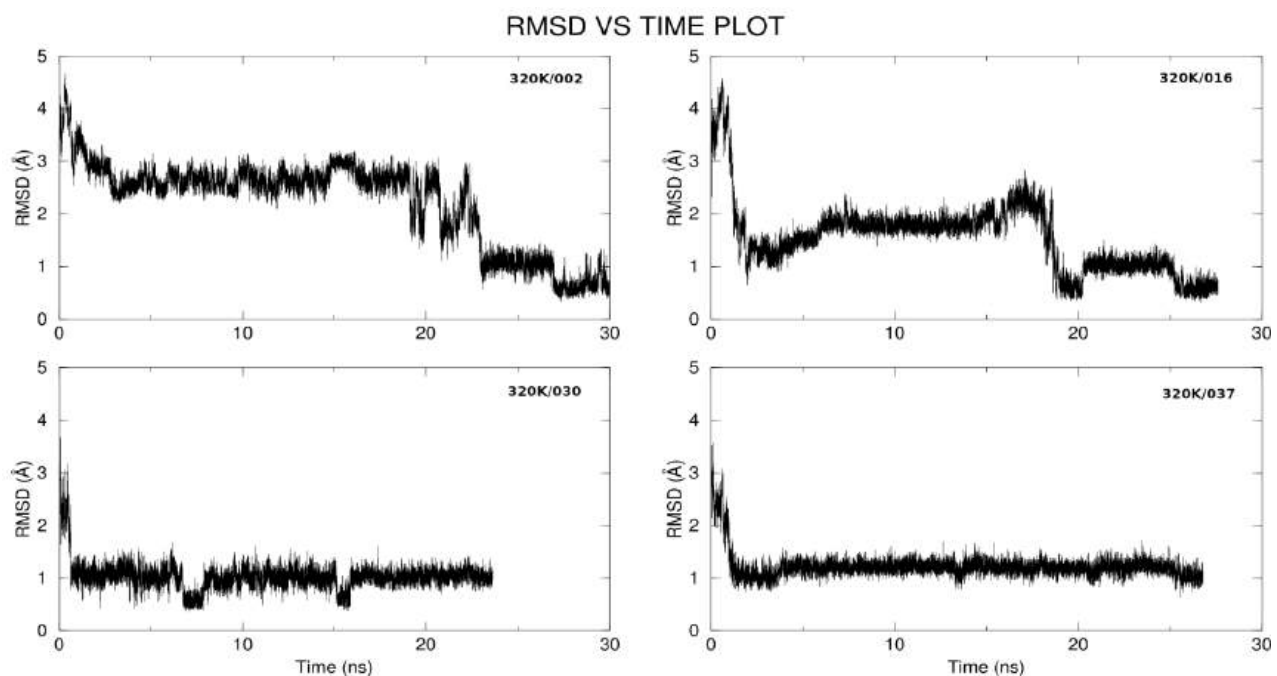
Εικόνα 8: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (005, 017, 024, 025) στην ίδια θερμοκρασία.



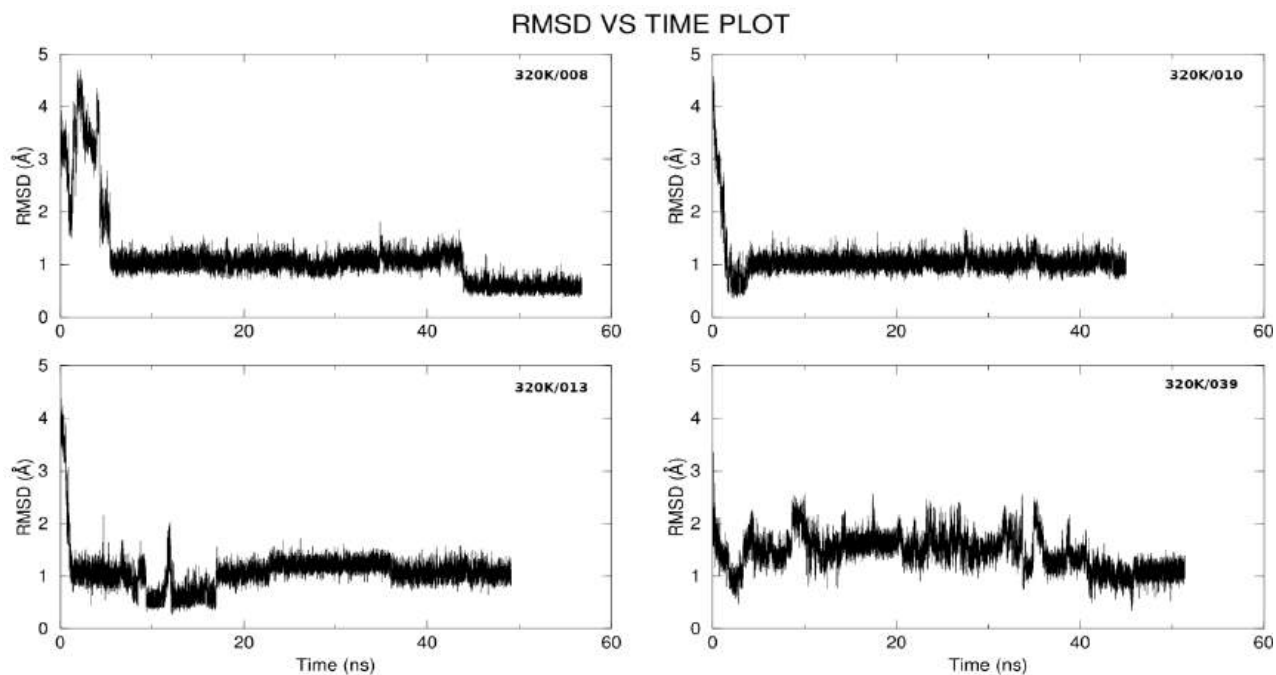
Εικόνα 9: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (020, 021, 033, 038) στην ίδια θερμοκρασία.



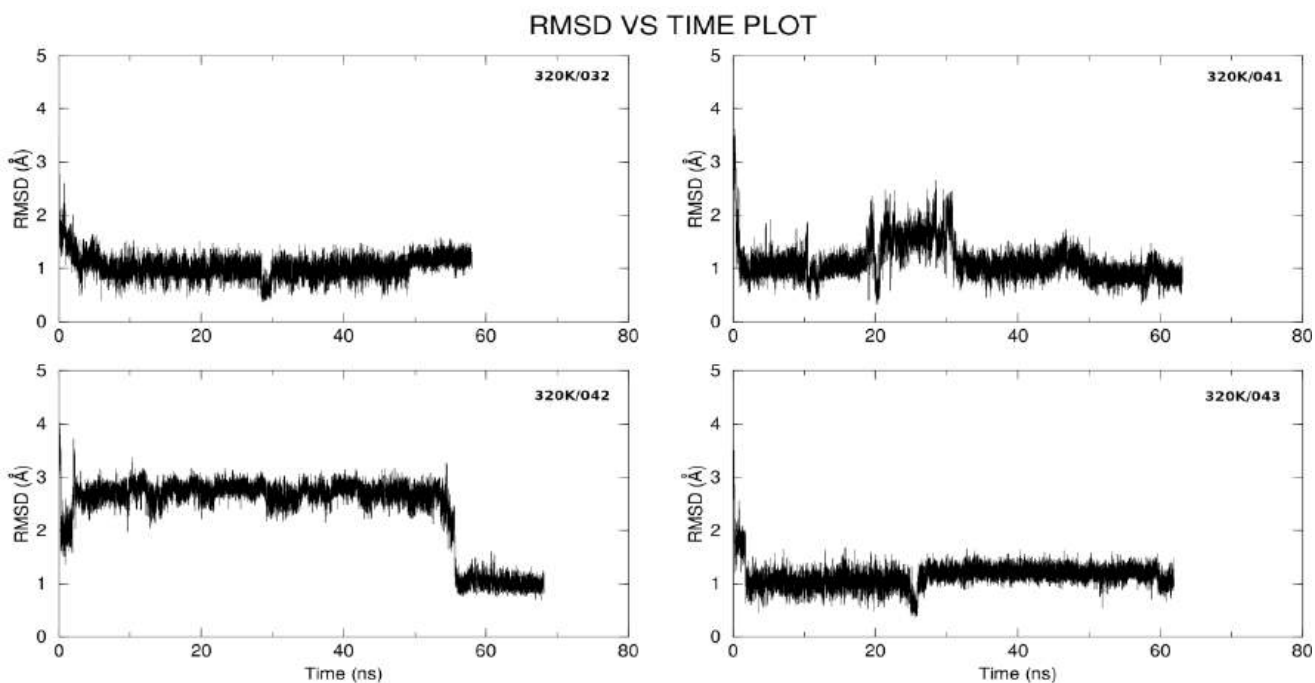
Εικόνα 10: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (031, 034, 036, 040) στην ίδια θερμοκρασία.



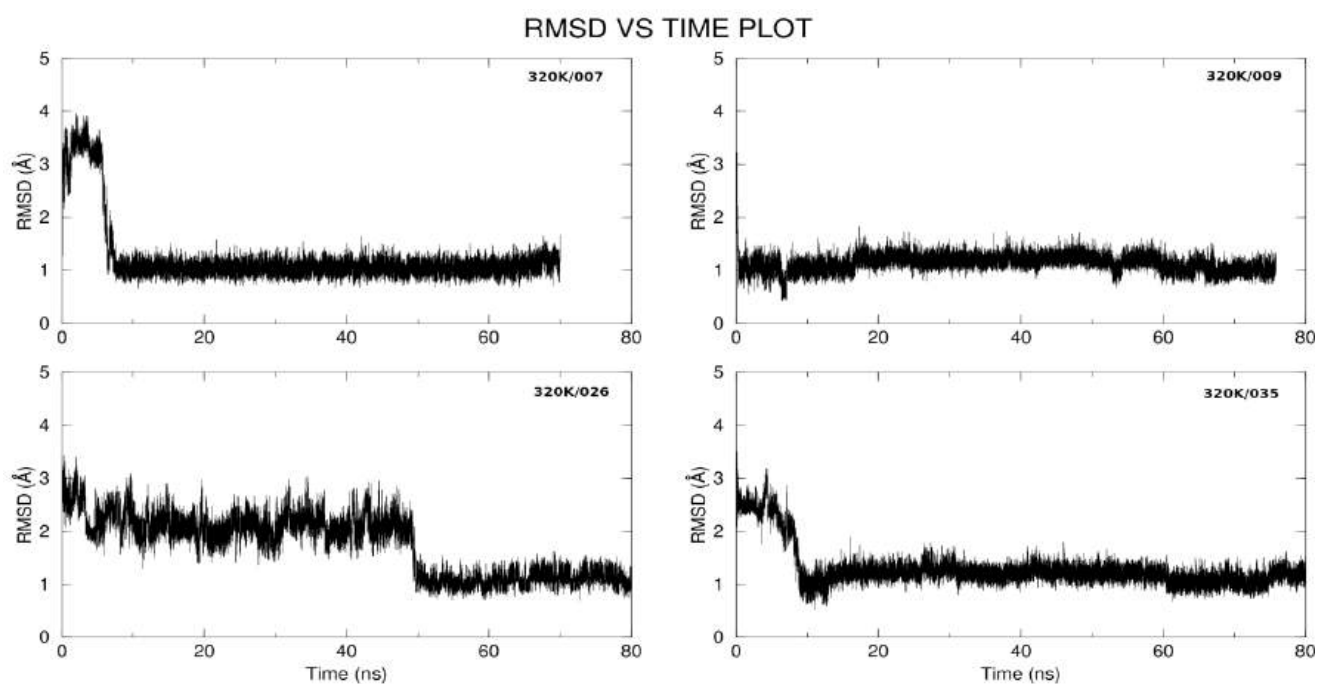
Εικόνα 11: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (002, 016, 030, 037) στην ίδια θερμοκρασία.



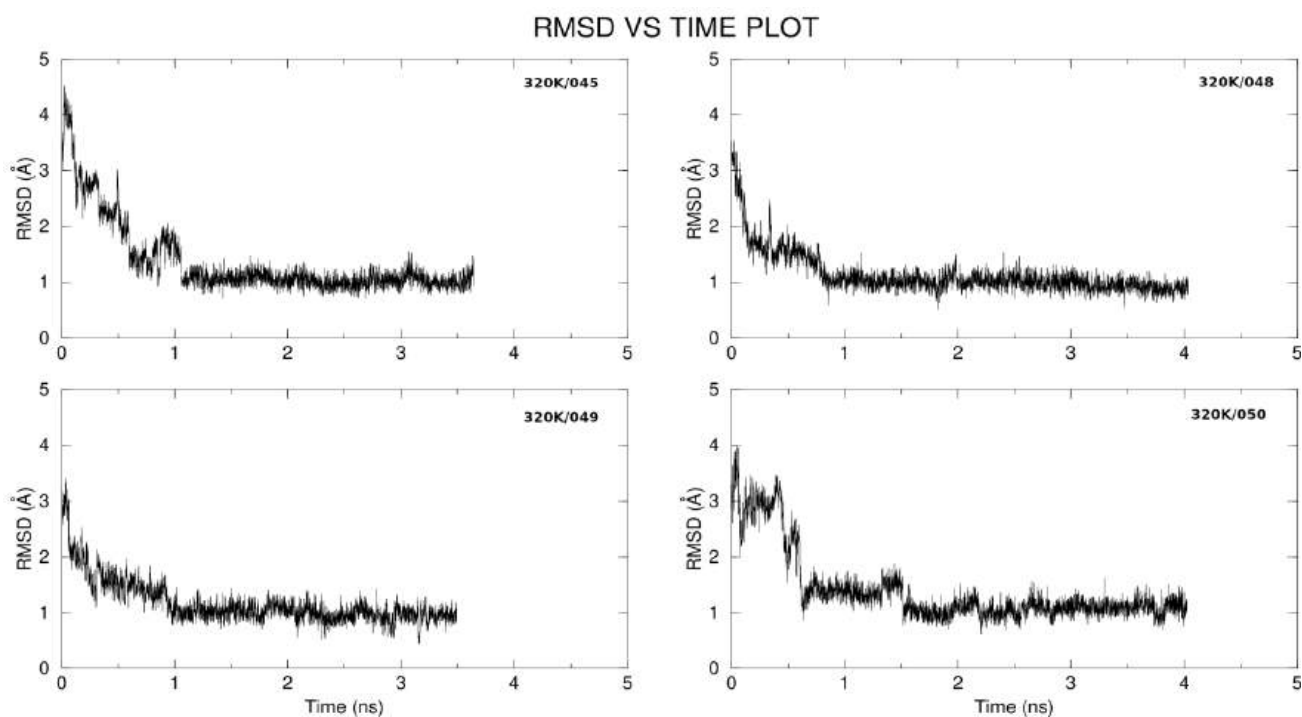
Εικόνα 12: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (008, 010, 013, 039) στην ίδια θερμοκρασία.



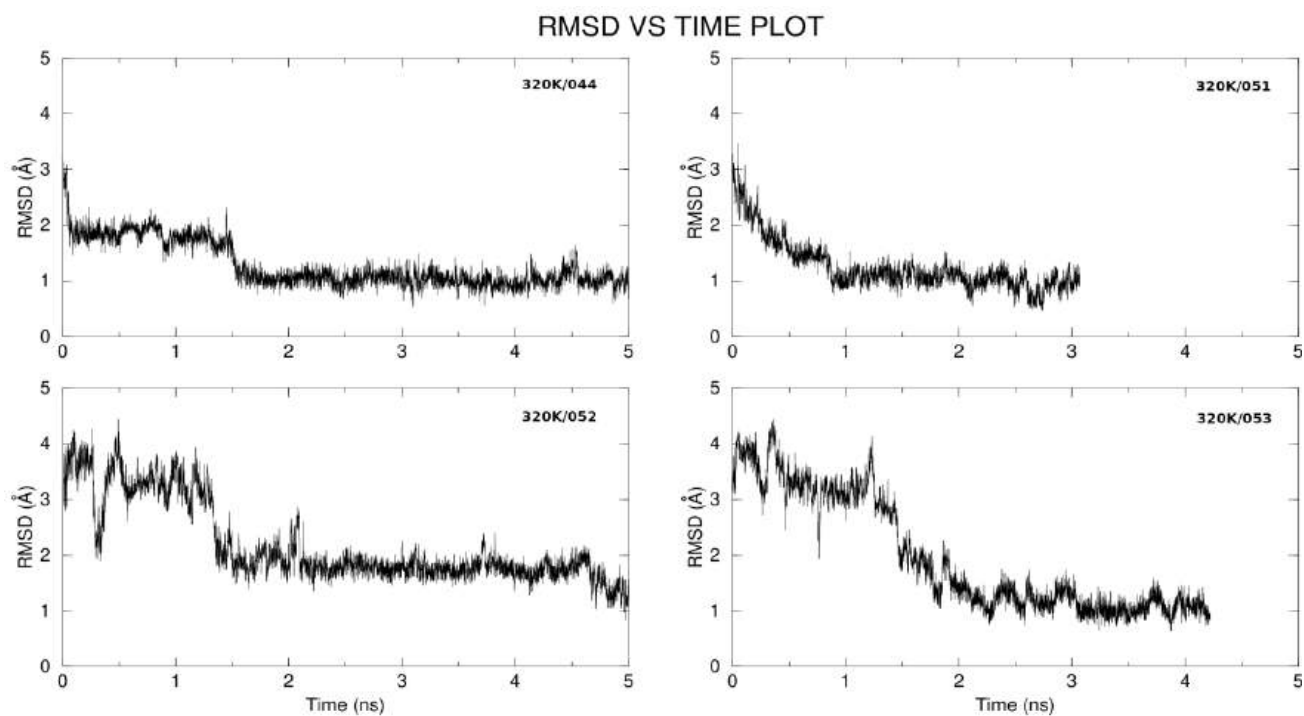
Εικόνα 13: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (032, 041, 042, 043) στην ίδια θερμοκρασία.



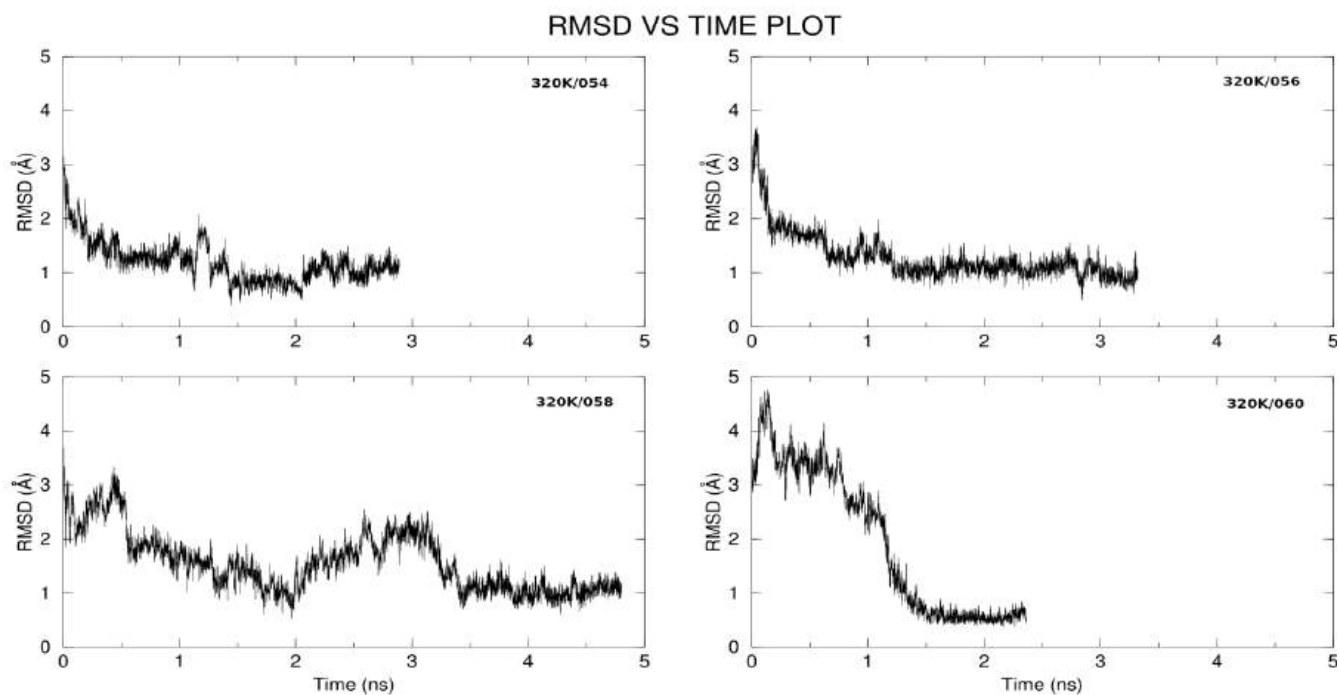
Εικόνα 14: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (007, 009, 026, 035) στην ίδια θερμοκρασία.



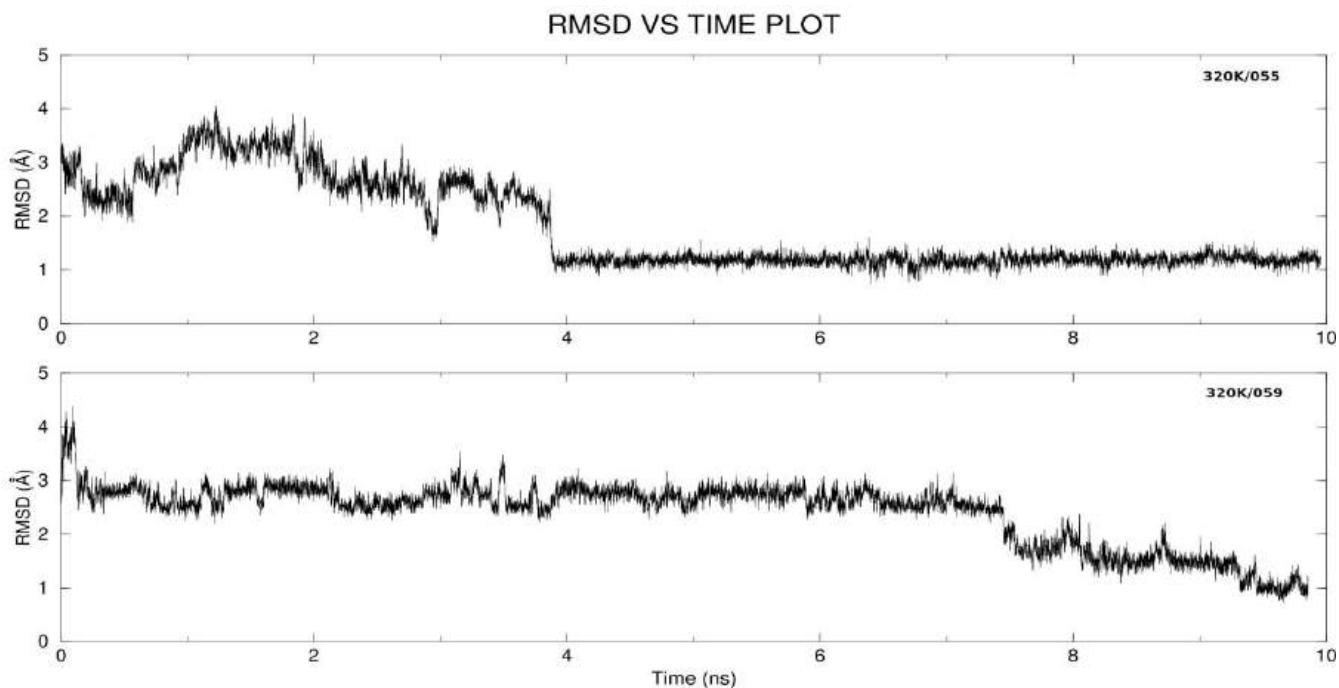
Εικόνα 15: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (045, 048, 049, 050) στην ίδια θερμοκρασία.



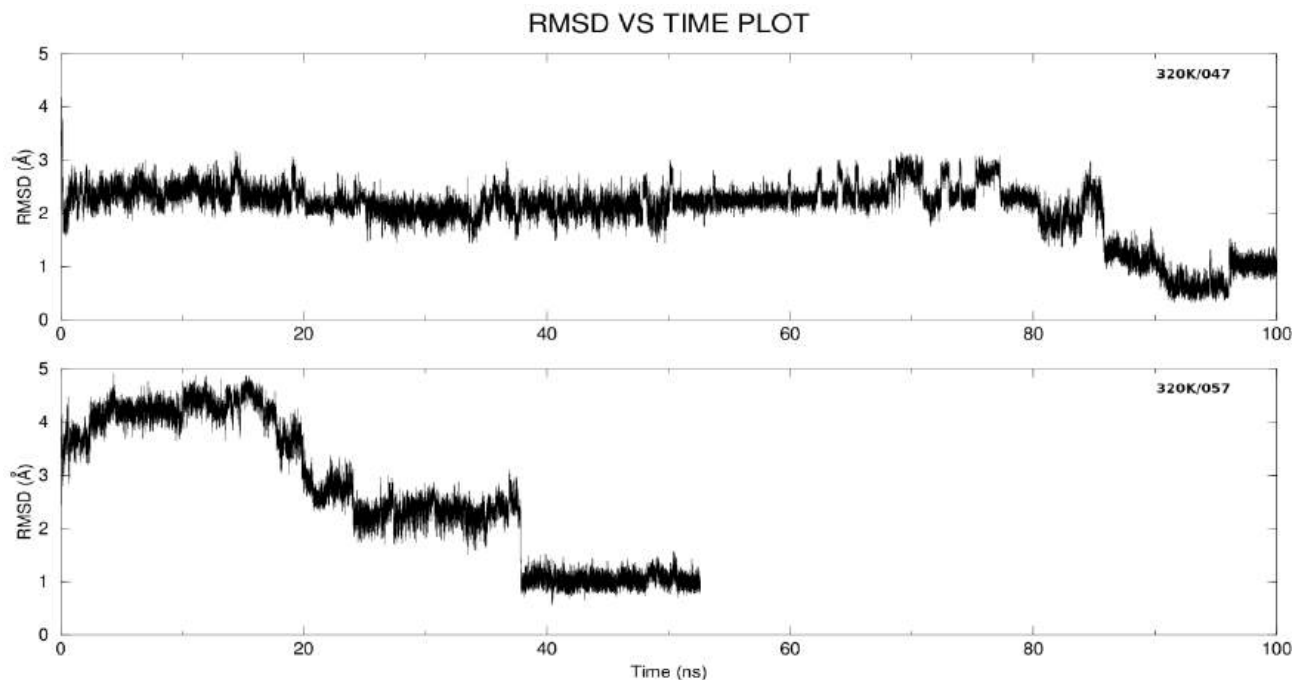
Εικόνα 16: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (044, 051, 052, 053) στην ίδια θερμοκρασία.



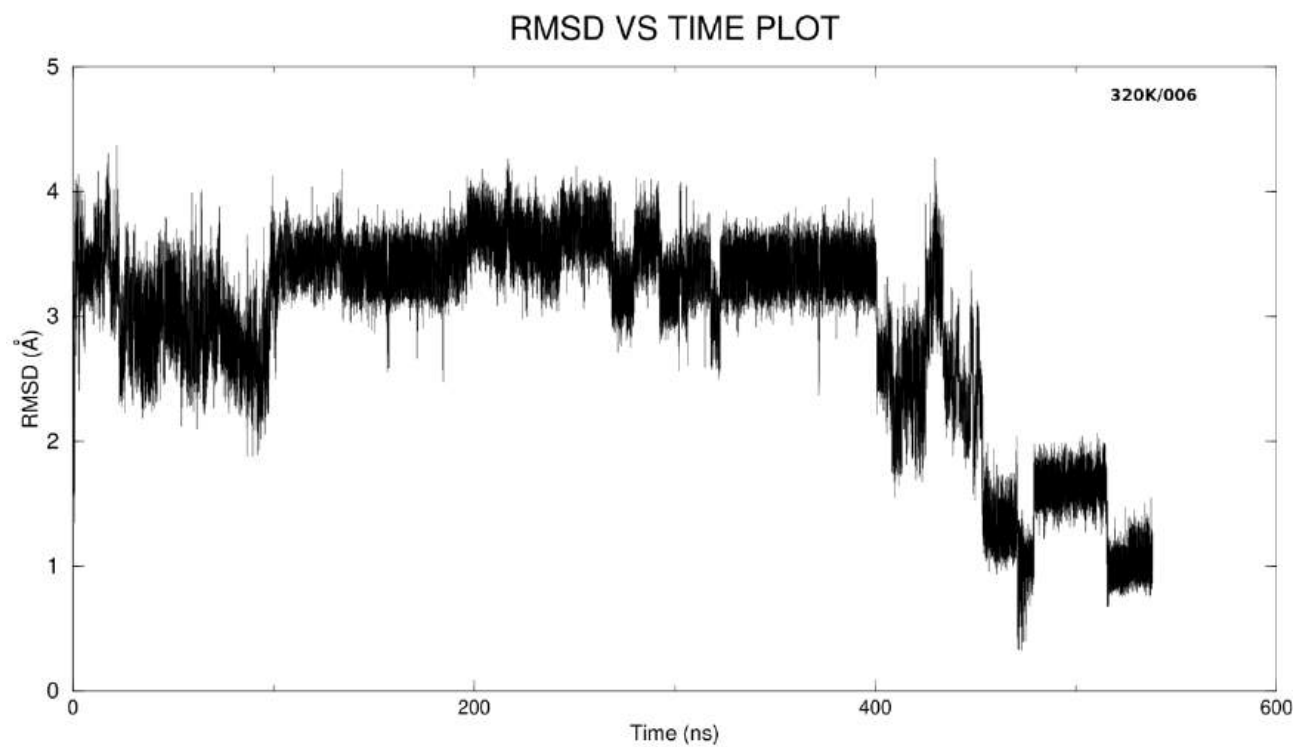
Εικόνα 17: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (054, 056, 058, 060) στην ίδια θερμοκρασία.



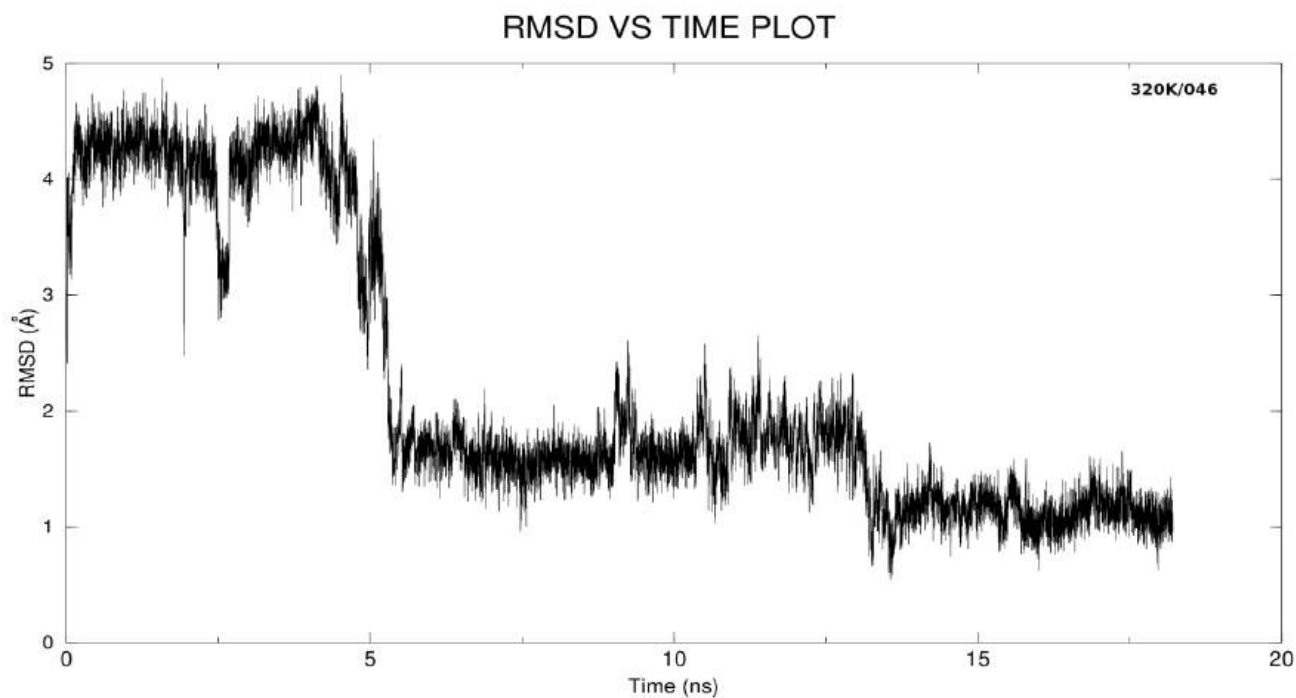
Εικόνα 18: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για δύο προσομοιώσεις (055, 059) στην ίδια θερμοκρασία.



Εικόνα 19: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για δύο προσομοιώσεις (047, 057) στην ίδια θερμοκρασία.



Εικόνα 20: Διάγραμμα RMSD ως προς τον χρόνο για μία προσομοίωση (006) σε θερμοκρασία 320K.



Εικόνα 21: Διάγραμμα RMSD ως προς τον χρόνο για μία προσομοίωση (046) σε θερμοκρασία 320K.

Καθώς η πλειονότητα των προσομοιώσεων παρουσιάζει παρόμοιο μοτίβο εξέλιξης του RMSD, επιλέχθηκαν ενδεικτικά παραδείγματα που αναδεικνύουν τις δύο κυριότερες μορφές συμπεριφοράς της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων.

Στις εικόνες 8, 12 και 15, όλες οι προσομοιώσεις παρουσιάζουν χαρακτηριστική και σταθερή πτώση του RMSD ήδη από τα πρώτα στάδια της προσομοίωσης. Η ταχεία αυτή μείωση υποδηλώνει ότι η Rop αναδιπλώνεται γρήγορα, επανερχόμενη στην σταθερή και φυσιολογική κατάστασή της, με τιμές RMSD που σταθεροποιούνται κοντά στα 0.8 Å. Η συμπεριφορά αυτή μαρτυρά ενδεχομένως την ύπαρξη ευνοϊκών ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων που προάγουν την αναδίπλωση, παρά την αρχική μερικώς ξεδιπλωμένη διαμόρφωση λόγω της μετάλλαξης.

Αντίθετα, στις εικόνες 9, 18 και 19 παρατηρούνται περιπτώσεις ελαφρώς καθυστερημένης επαναδίπλωσης. Στις προσομοιώσεις των εικόνων 9 και 18, το RMSD παραμένει σε σχετικά υψηλές τιμές (>2 Å) κατά τα πρώτα 2-4 ns, προτού σημειωθεί σταδιακή πτώση. Στην εικόνα 19, η καθυστέρηση είναι πιο έντονη: στην προσομοίωση 047 το RMSD μειώνεται σημαντικά μόλις μετά τα ~80 ns, ενώ στην προσομοίωση 057 η σταθεροποίηση παρατηρείται γύρω στα ~35 ns. Ακόμη πιο χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της εικόνας 20, όπου απεικονίζεται η προσομοίωση 006. Εκεί, το RMSD παραμένει σε σχετικά υψηλές τιμές καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (~500 ns), χωρίς να παρουσιάζεται σαφής τάση σταθεροποίησης. Η συμπεριφορά αυτή υποδηλώνει ότι, παρόλο που η Rop ξεκινά από μια μερικώς ξεδιπλωμένη διαμόρφωση, σε ορισμένες περιπτώσεις η επαναδίπλωση συνοδεύεται από ενδιάμεσα, λιγότερο σταθερά στάδια που επιβραδύνουν τη μετάβαση προς τη φυσιολογική της δομή.

Τέλος, στην εικόνα 21 απεικονίζεται αποκλειστικά η προσομοίωση 046, στην οποία το RMSD φτάνει σε τιμές κοντά στα 5 Å, που είναι η δεύτερη μεγαλύτερη τιμή που παρατηρήθηκε σε όλες τις προσομοιώσεις. Η μεγαλύτερη τιμή εμφανίζεται στην προσομοίωση 057 (εικόνα 19), η οποία επίσης παρουσιάζει έντονη απόκλιση από τη φυσιολογική δομή της Rop λόγω σημαντικής αποδιάταξης. Οι περιπτώσεις αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και θα αναλυθούν εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα.

Συνοψίζοντας, από τα παραπάνω διαγράμματα RMSD διακρίνεται ότι στην αρχή της κάθε προσομοίωσης οι τιμές RMSD είναι σχετικά υψηλές (~2-4 Å), αντανakλώντας την μερικώς ξεδιπλωμένη κατάσταση της πρωτεΐνης Ror, η οποία οφείλεται στην παρουσία της μετάλλαξης A31P που επιδρά στη φυσιολογική δομική της σταθερότητα. Καθώς προχωράνε οι προσομοιώσεις, το RMSD μειώνεται σταδιακά και σταθεροποιείται στο εύρος 0.8-1.0 Å, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη δεν προχωρά σε περαιτέρω αποδιάταξη, αλλά αντιθέτως αναδιπλώνεται προς την φυσιολογική δομή της.

4.3. “Non-Interesting” Προσομοιώσεις (340K)

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των 30 προσομοιώσεων που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 340 K, με στόχο τη διερεύνηση της θερμοδυναμικής συμπεριφοράς της πρωτεΐνης Ror σε συνθήκες υψηλότερης θερμοκρασίας συγκριτικά με τις προηγούμενες προσομοιώσεις στους 320 K. Όπως και προηγουμένως, καταγράφεται η εξέλιξη του RMSD σε συνάρτηση με τον χρόνο, προκειμένου να αποτυπωθεί η δυναμική της αναδίπλωσης ή αποδιάταξης για κάθε περίπτωση. Η επιλογή των 340 K επιτρέπει την αξιολόγηση της σταθερότητας της Ror όταν αυξάνεται η θερμική ενέργεια, γεγονός που μπορεί να αναδείξει ενδεχόμενες διαφοροποιήσεις στη συμπεριφορά της.

Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τα βασικά χαρακτηριστικά των προσομοιώσεων, περιλαμβάνει τον αριθμό ταυτοποίησης, τη θερμοκρασία και τη διάρκεια καθεμίας, αποτελώντας τη βάση για την ερμηνεία των RMSD διαγραμμάτων που ακολουθούν.

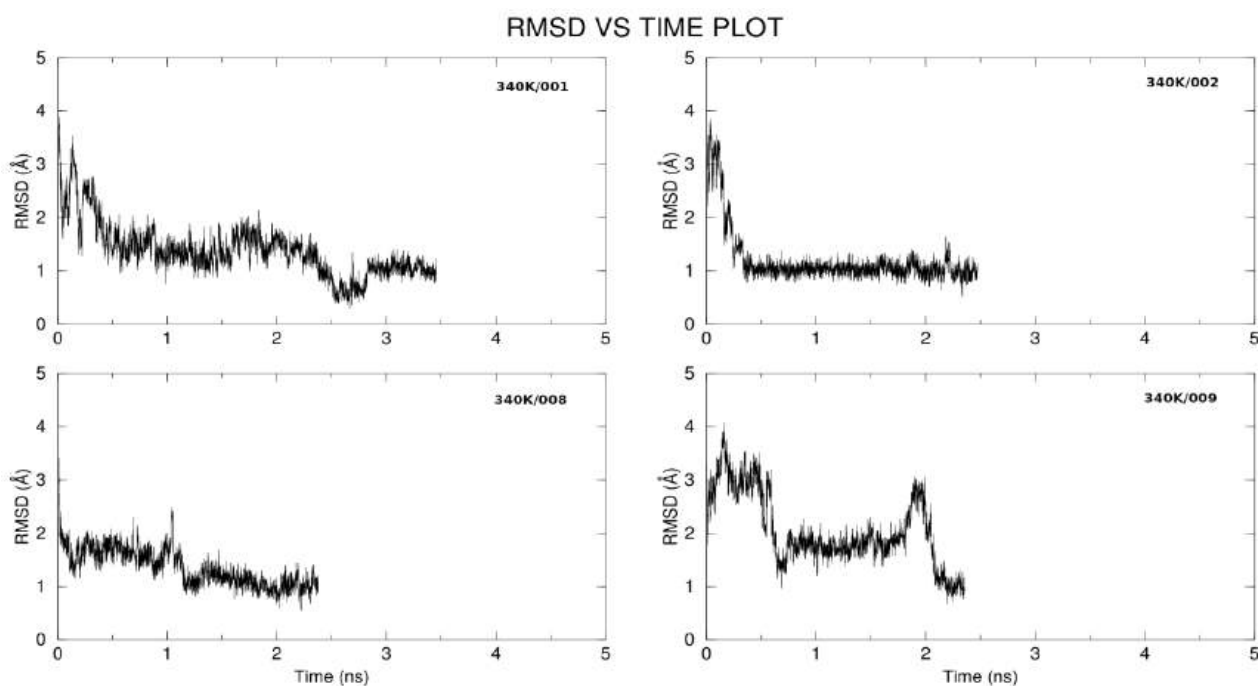
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των 30 προσομοιώσεων σε θερμοκρασία 340 K. Για κάθε προσομοίωση αναγράφονται ο αριθμός της, η θερμοκρασία και η συνολική διάρκειά της.

Αριθμός Προσομοιώσεων	Θερμοκρασία (K)	Χρόνος (ns)
RUN 001	340	3.45
RUN 002	340	2.46
RUN 003	340	5.93
RUN 004	340	10.13
RUN 005	340	141.45

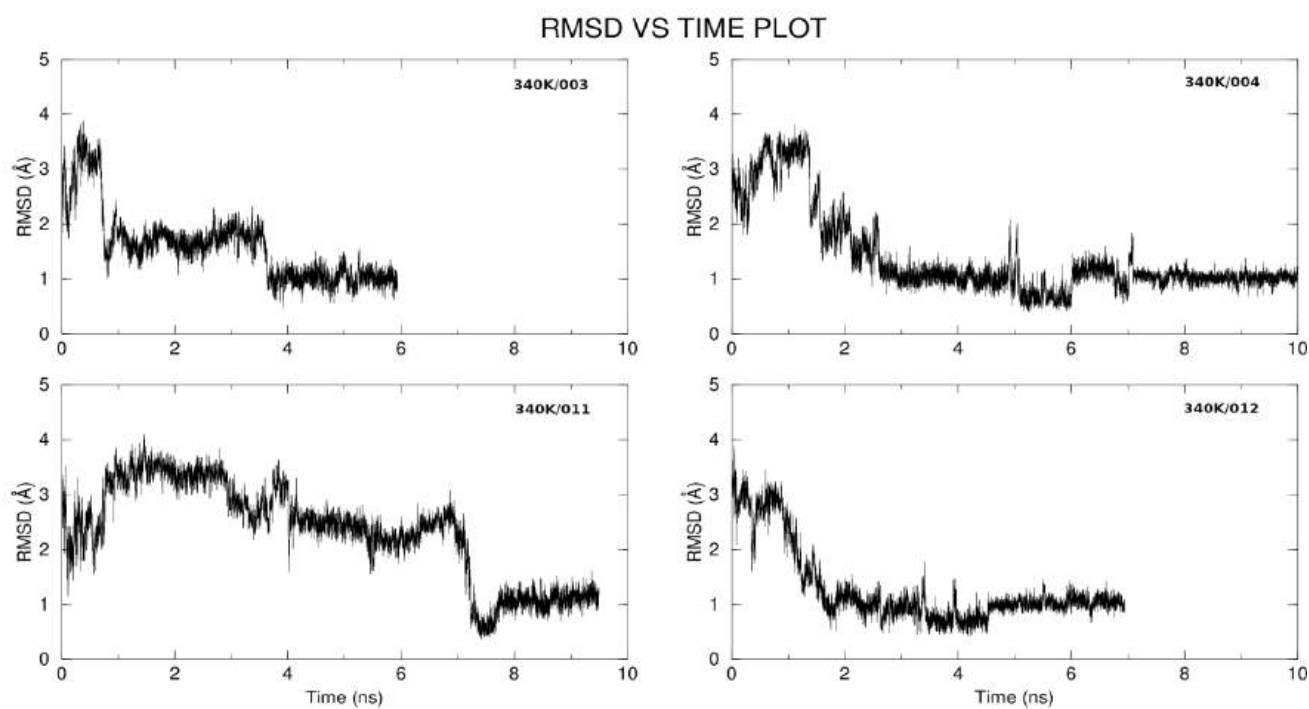
RUN 006	340	212.43
RUN 007	340	31.96
RUN 008	340	2.37
RUN 009	340	2.35
RUN 010	340	4.69
RUN 011	340	9.49
RUN 012	340	6.93
RUN 013	340	28.57
RUN 014	340	1.81
RUN 015	340	3.15
RUN 016	340	3.05
RUN 017	340	0.68
RUN 018	340	0.91
RUN 019	340	3.88
RUN 020	340	2.19
RUN 021	340	4.75
RUN 022	340	4.71
RUN 023	340	6.14
RUN 024	340	2.86
RUN 025	340	1.94
RUN 026	340	5.26
RUN 027	340	2.45
RUN 028	340	26.91
RUN 029	340	3.14
RUN 030	340	20.26

Αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τις προσομοιώσεις σε θερμοκρασία 340 K. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις παρατηρείται χαρακτηριστικά άμεση και σταθερή μείωση του RMSD ήδη από τα πρώτα στάδια της προσομοίωσης, χωρίς ενδείξεις περαιτέρω αποδιάταξης της πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι, ακόμη και υπό συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας, η Rop έχει την ικανότητα να επαναδιπλώνεται γρήγορα προς τη φυσιολογική της δομή, παρά την παρουσία της μετάλλαξης A31P.

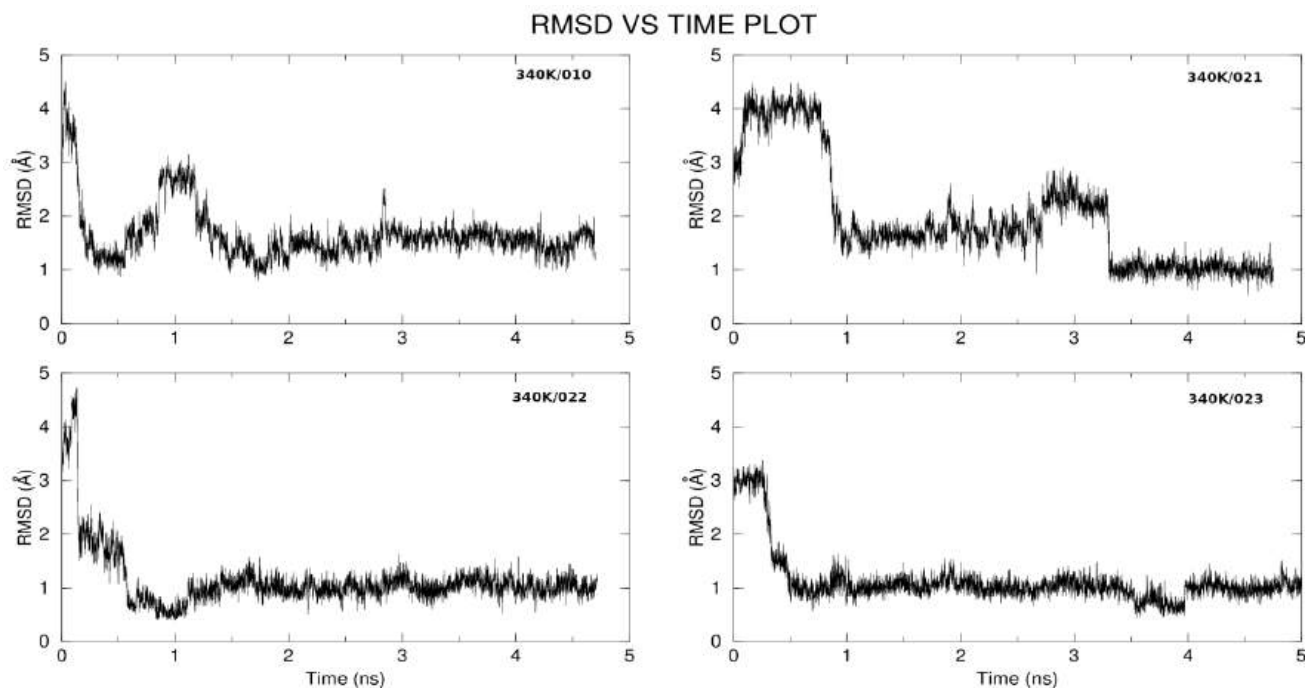
Τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζουν το σύνολο των 30 προσομοιώσεων που πραγματοποιήθηκαν στους 340 K, οργανωμένα με βάση τη χρονική διάρκεια ολοκλήρωσης κάθε προσομοίωσης, διευκολύνοντας έτσι τη συγκριτική αξιολόγηση της δυναμικής της επαναδίπλωσης.



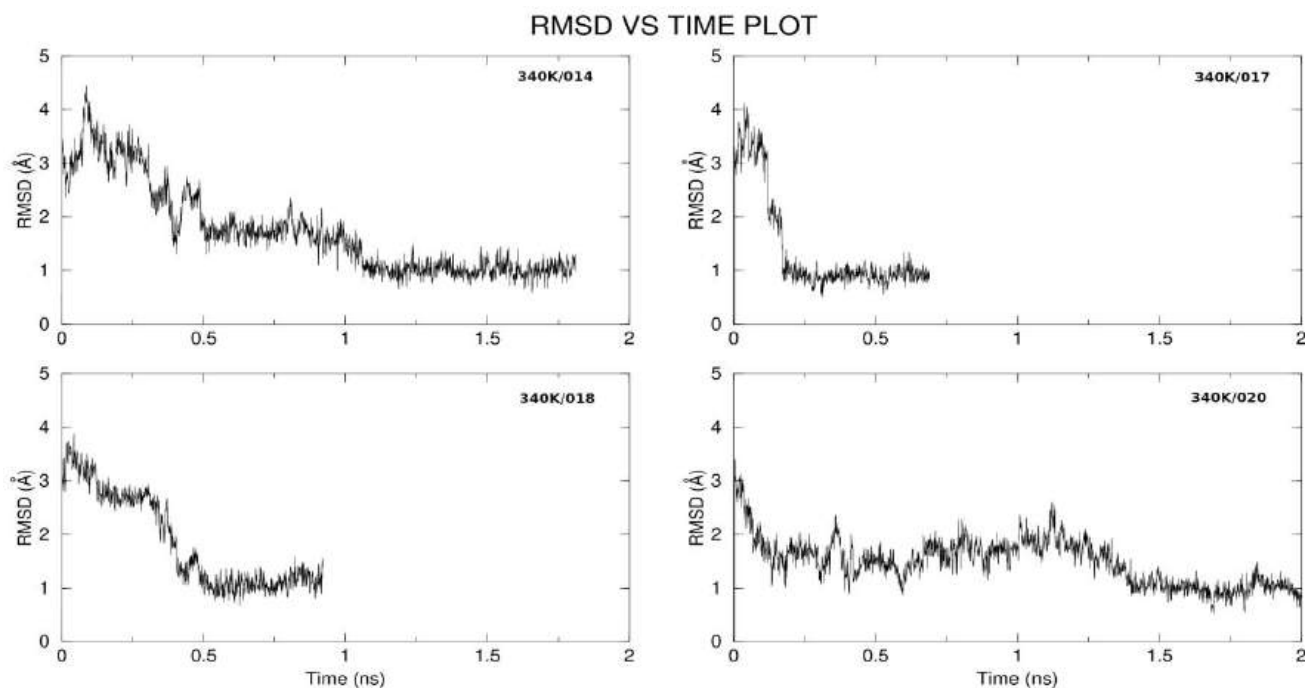
Εικόνα 22: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (001, 002, 008, 009) στην ίδια θερμοκρασία.



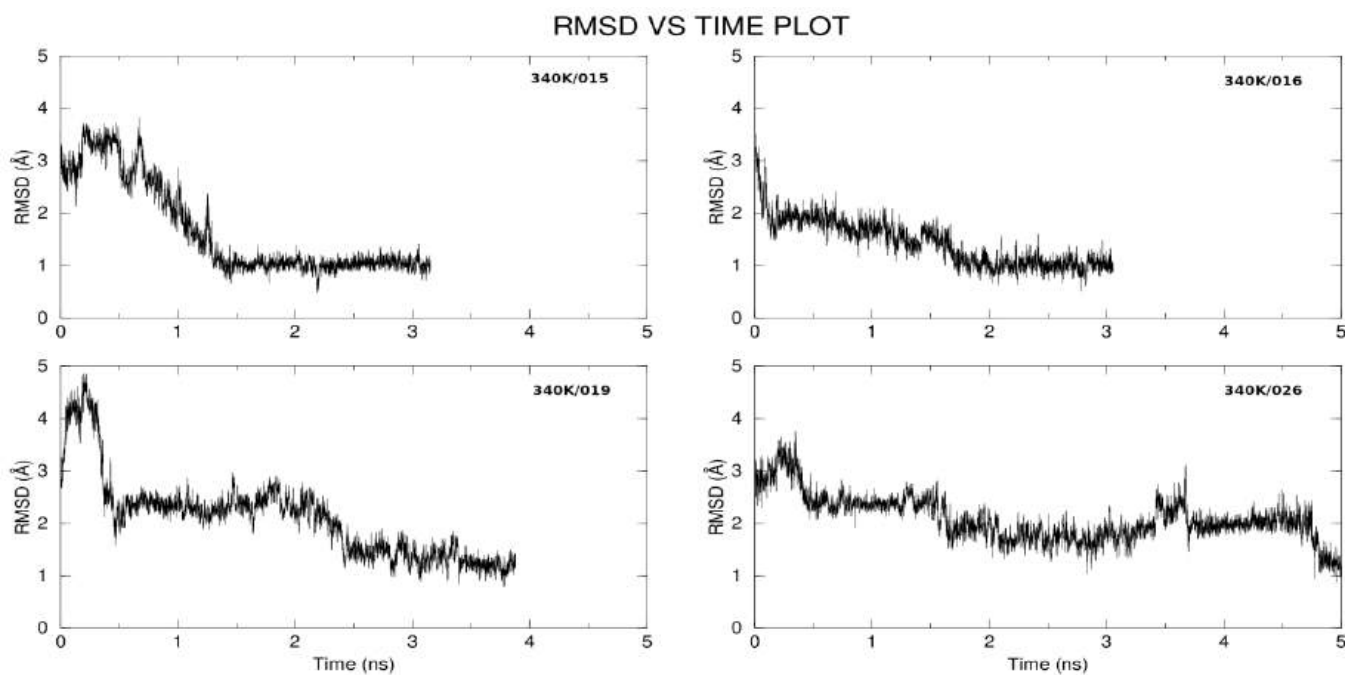
Εικόνα 23: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (003, 004, 011, 012) στην ίδια θερμοκρασία.



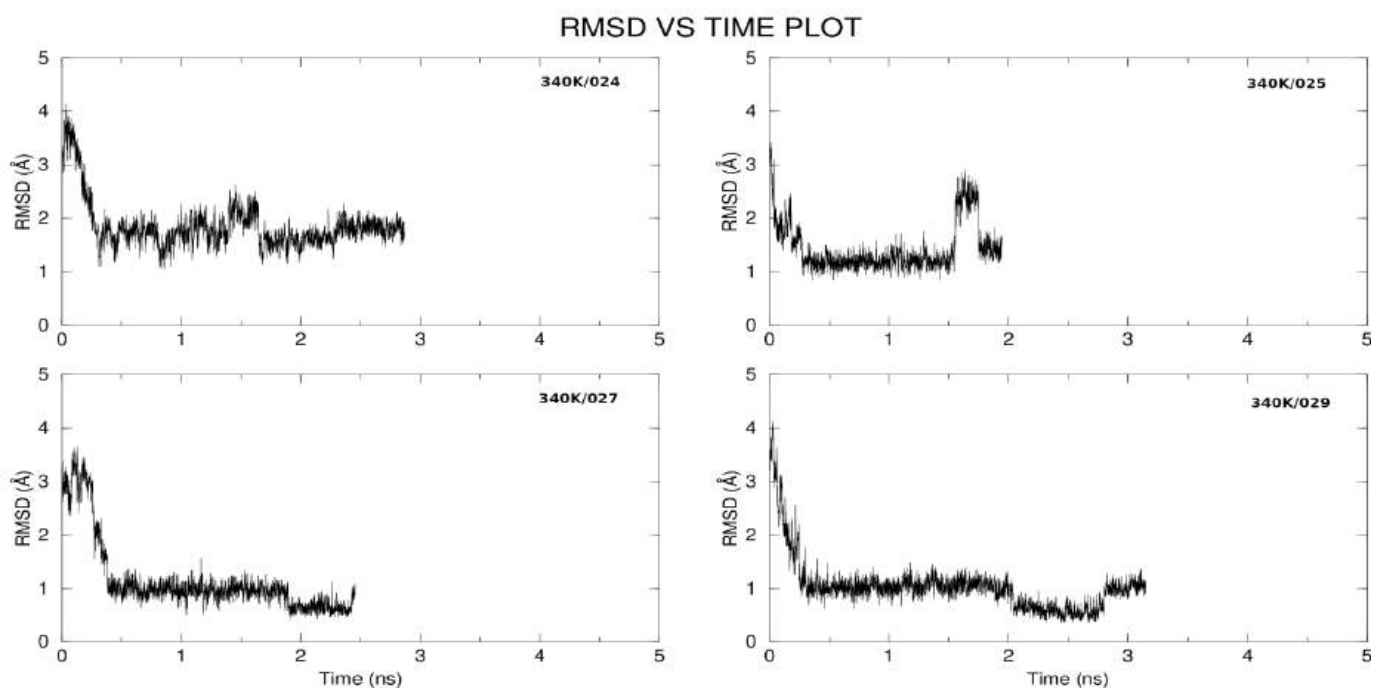
Εικόνα 24: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (010, 021, 022, 023) στην ίδια θερμοκρασία.



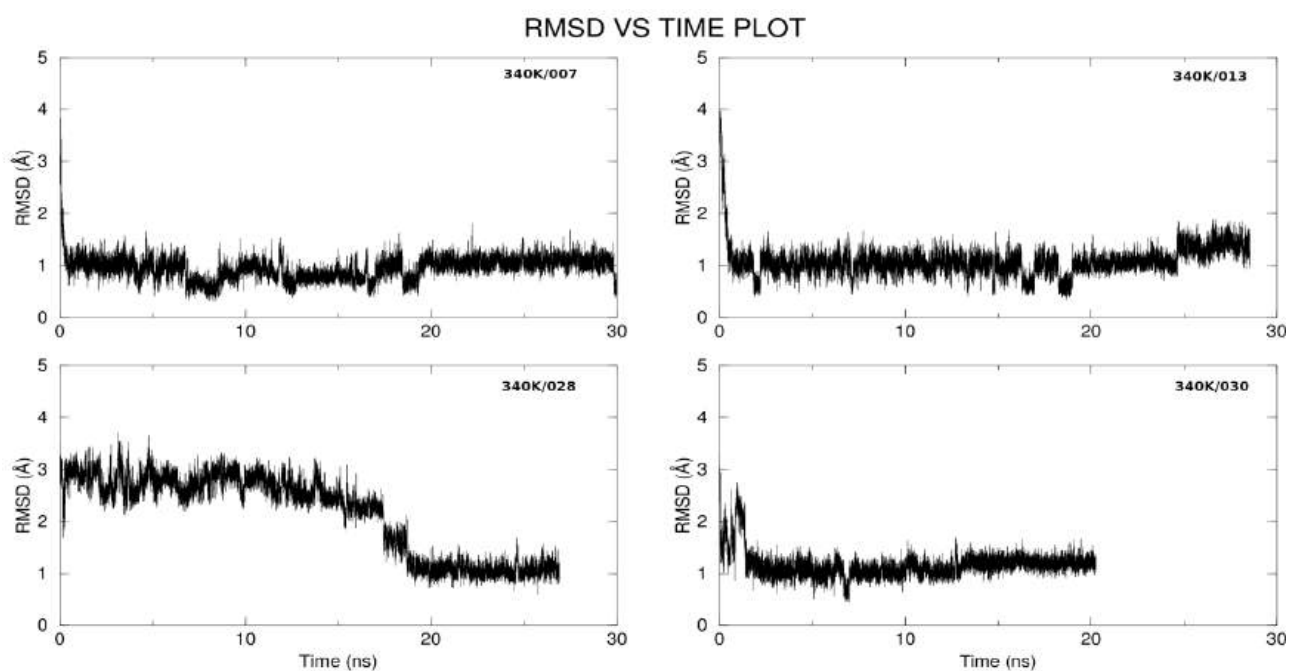
Εικόνα 25: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (014, 017, 018, 020) στην ίδια θερμοκρασία.



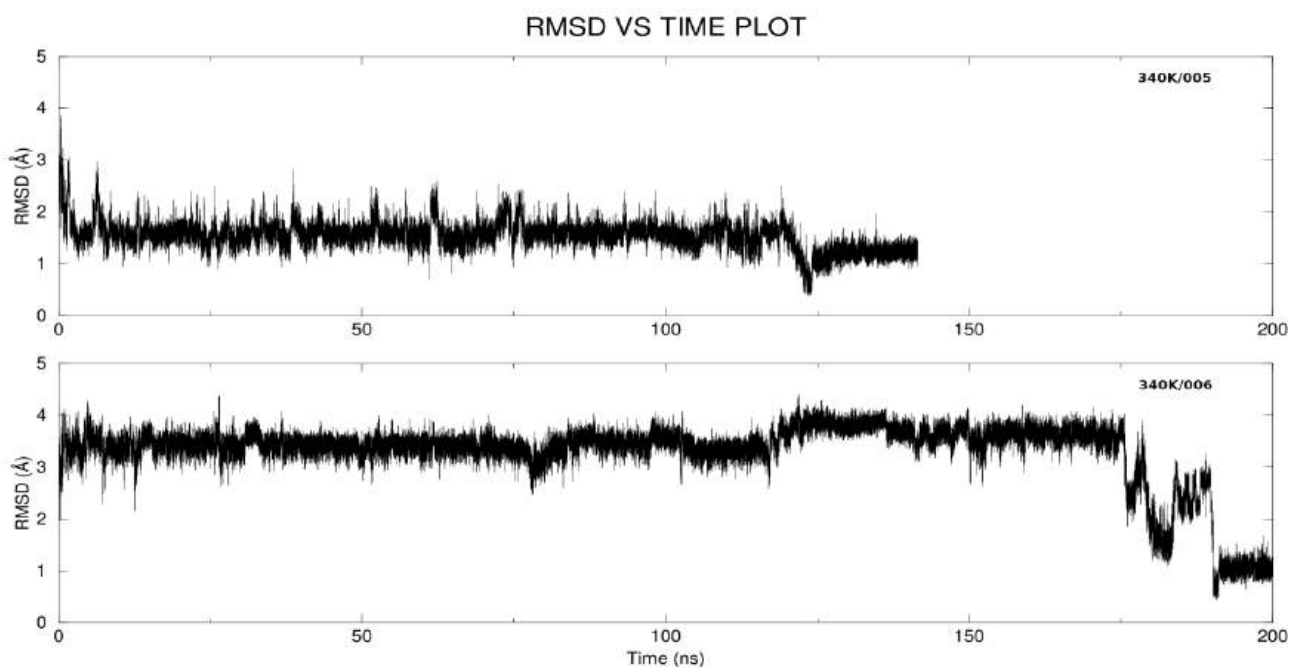
Εικόνα 26: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (015, 016, 019, 026) στην ίδια θερμοκρασία.



Εικόνα 27: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (024, 025, 027, 029) στην ίδια θερμοκρασία.



Εικόνα 28: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για τέσσερις προσομοιώσεις (007, 013, 028, 030) στην ίδια θερμοκρασία.



Εικόνα 29: Διαγράμματα RMSD ως προς τον χρόνο για δύο προσομοιώσεις (005, 006) στην ίδια θερμοκρασία.

Οι προσομοιώσεις στους 340 K ανέδειξαν εντονότερη θερμική επίδραση στη δυναμική της αναδίπλωσης της Ror, συγκριτικά με εκείνες στους 320 K. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται απότομη πτώση του RMSD εντός των πρώτων 1-2 ns, φαινόμενο που υποδηλώνει ταχεία επαναδιάταξη της δομής από την αρχική μερικώς ξεδιπλωμένη κατάσταση. Ενδεικτικά, στις εικόνες 22 και 25, η τιμή του RMSD στις προσομοιώσεις μειώνεται απότομα και σταθεροποιείται γρήγορα κάτω από το 1 Å.

Παρά τη γρήγορη αυτή προσαρμογή, οι καμπύλες RMSD παρουσιάζουν έντονες διακυμάνσεις και αυξημένο θόρυβο, κάτι που αντανακλά τη μεγαλύτερη κινητικότητα και ευκαμψία της πρωτεΐνης υπό υψηλότερες θερμικές συνθήκες. Σε ορισμένες προσομοιώσεις, όπως στις 005, 006 (εικόνα 29) και 011 (εικόνα 23), η πλήρης σταθεροποίηση καθυστερεί σημαντικά, φτάνοντας ακόμη και τα 150 ns, στοιχείο που μαρτυρά την πιθανή διέλευση της πρωτεΐνης από ενδιάμεσες, λιγότερο σταθερές διαμορφώσεις προτού αποκτήσει τη φυσιολογική της δομή.

Σε μερικές προσομοιώσεις, όπως οι 025 (εικόνα 27) και 026 (εικόνα 26), το RMSD παρουσιάζει αρχικά σταθεροποίηση κοντά στο 1 Å, σχηματίζοντας ένα πλατώ. Ωστόσο, μετά από αυτή τη φάση, παρατηρούνται διακυμάνσεις και μικρά σκαμπανεβάσματα στις τιμές του RMSD. Αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη παραμένει δομικά ευκίνητη και δεν έχει αποκτήσει πλήρη σταθερότητα.

Η παρατηρούμενη αυτή συμπεριφορά ενδεχομένως να σχετίζεται άμεσα με το γεγονός ότι η θερμοκρασία των 340 K είναι πολύ κοντά στην πειραματικά προσδιορισμένη θερμοκρασία τήξης (T_m) της φυσιολογικής Ror, που είναι περίπου 68,7 °C [26]. Σε αυτό το θερμικό περιβάλλον, η πρωτεΐνη βρίσκεται κοντά στο όριο της σταθερότητάς της και τείνει να εναλλάσσεται πιο εύκολα ανάμεσα σε διπλωμένες και ξεδιπλωμένες καταστάσεις. Έτσι, ενώ η υψηλότερη θερμοκρασία βοηθά την πρωτεΐνη να αναδιπλωθεί γρήγορα, ταυτόχρονα αυξάνει την πιθανότητα να παγιδευτεί σε ενδιάμεσες και λιγότερο σταθερές μορφές. Εντέλει, η αναδίπλωση επιταχύνεται, αλλά η σταθερότητα της δομής μειώνεται, καθώς η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μια λεπτή ισορροπία μεταξύ της αυξημένης θερμικής κινητικότητας και της φυσικής της σταθερότητας κοντά στο T_m .

4.4. “Interesting” Προσομοιώσεις

Η παρούσα ενότητα αφορά δύο από τις πιο χρονοβόρες προσομοιώσεις του συνόλου, τις 320K/004 και 320K/012, οι οποίες διήρκησαν ιδιαίτερα πολύ. Η επιλογή να παρουσιαστούν ξεχωριστά οφείλεται τόσο στη διάρκεια εκτέλεσης όσο και στη σταδιακή εμφάνιση δομικών μεταβολών, που απαιτούν λεπτομερή ανάλυση. Οι δύο προσομοιώσεις παρουσιάζονται σε διακριτές υποενότητες, ώστε να αποδοθούν με σαφήνεια τα επιμέρους χαρακτηριστικά και οι ιδιαιτερότητες της καθεμιάς.

Οι δομές που παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες δημιουργήθηκαν με το λογισμικό PyMOL, ένα εργαλείο οπτικοποίησης μοριακών δομών που χρησιμοποιείται ευρέως στη δομική βιολογία. Επιτρέπει την αναπαράσταση και ανάλυση πρωτεϊνικών μορίων, καθώς και τη δημιουργία υψηλής ποιότητας εικόνων [27].

Ο πίνακας 3 παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά των δομών που παρατηρήθηκαν σε προσομοιώσεις με μεγάλη διάρκεια. Για κάθε δομή αναφέρονται ο αριθμός της προσομοίωσης, η θερμοκρασία, η τιμή RMSD και ο χρόνος λήψης της δομής.

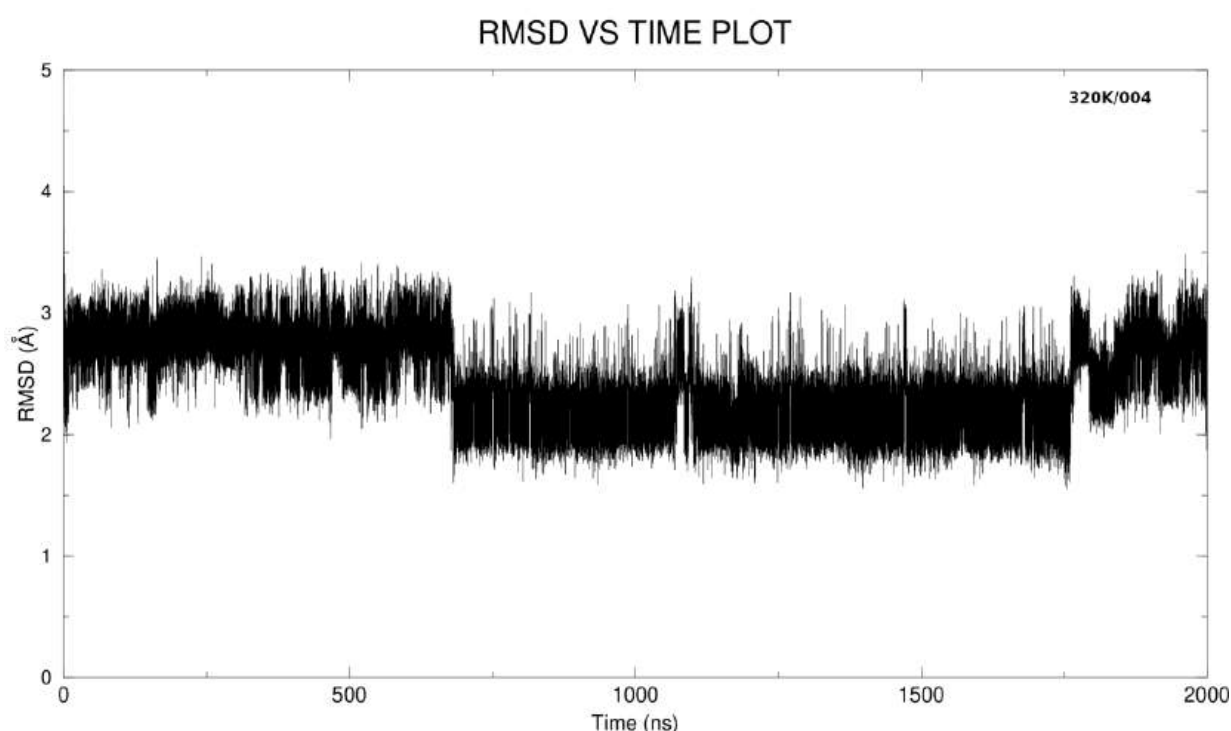
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των δομών από προσομοιώσεις με μεγάλη διάρκεια.

Για κάθε δομή αναφέρονται ο αριθμός της προσομοίωσης, η θερμοκρασία, η τιμή RMSD και ο χρόνος λήψης της δομής.

Αριθμός Προσομοιώσεων	Θερμοκρασία (K)	RMSD (Å)	Χρόνος (ns)
RUN 004	320	3.23	974.83
RUN 012	320	3.70	221.54

4.4.1. Προσομοίωση 320K/004

Η προσομοίωση 320K/004 ήταν η πρώτη που ξεκίνησε από το σύνολο των προσομοιώσεων μεγάλης διάρκειας και, λόγω της έκτασής της, ήταν και η τελευταία που ολοκληρώθηκε. Η μεγάλη διάρκεια της προσομοίωσης επέτρεψε την παρακολούθηση της δομικής εξέλιξης της πρωτεΐνης σε βάθος χρόνου, αποτυπώνοντας με ακρίβεια τις σταδιακές αλλαγές στη διαμόρφωσή της. Το διάγραμμα RMSD που ακολουθεί στην *εικόνα 30* καταγράφει την εξέλιξη της δομής καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, η οποία διακόπηκε στο χρόνο των 2000 ns.

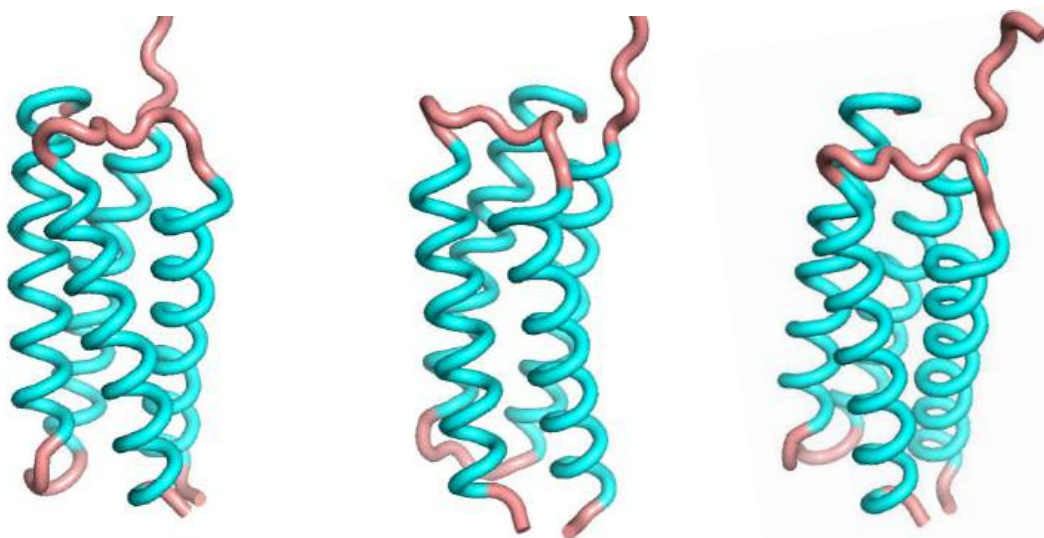


Εικόνα 30: Διάγραμμα RMSD ως προς τον χρόνο για μία προσομοίωση (004) σε θερμοκρασία 320K.

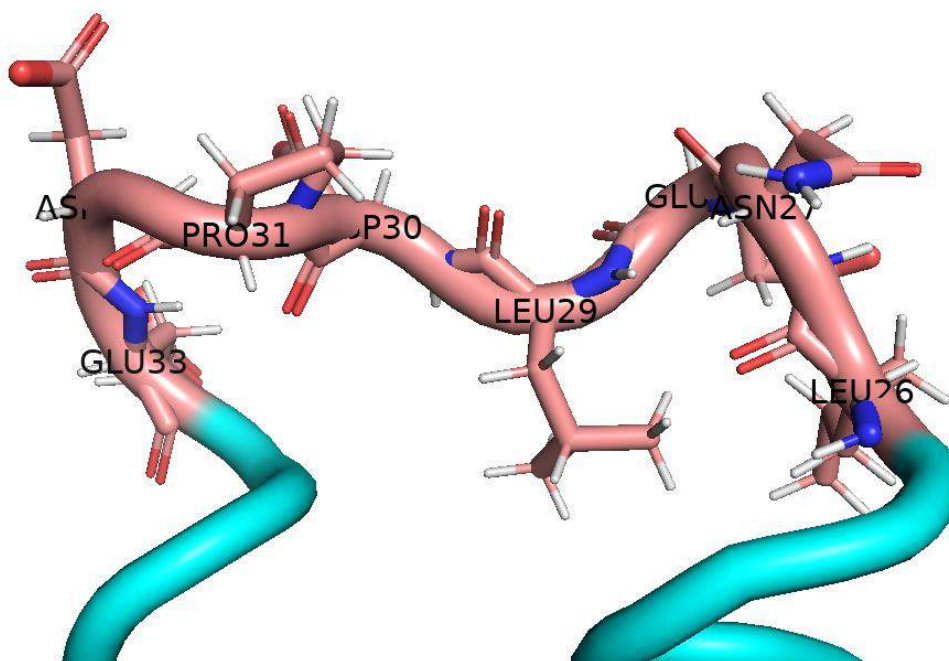
Στο παραπάνω διάγραμμα, η τιμή του RMSD παραμένει κοντά στα 3 Å για το μεγαλύτερο μέρος της προσομοίωσης, κάτι που μαρτυρά ότι το σύστημα έχει παγιδευτεί σε μία ενδιάμεση διαμόρφωση και δεν επαναδιπλώνεται στην αρχική φυσιολογική κατάσταση της πρωτεΐνης Rop, η οποία θα αντιστοιχούσε σε RMSD περίπου 0.8-1.0 Å. Η προσομοίωση επεκτάθηκε χρονικά μέχρι τα 2000 ns, ωστόσο δεν υπήρξε ένδειξη για περαιτέρω μείωση του RMSD και γι' αυτό τον λόγο η

προσομοίωση διακόπηκε. Η σταθερότητα του RMSD γύρω από τα 3 Å υποδεικνύει ότι το σύστημα έχει σταθεροποιηθεί σε μία διαμόρφωση που πιθανόν αντιστοιχεί σε ενδιάμεσο στάδιο της αναδίπλωσης. Η απουσία σημαντικών μεταβάσεων προς πιο συμπαγείς ή πιο εκτεταμένες καταστάσεις ενισχύει την εκτίμηση ότι το σύστημα έχει «κολλήσει» σε μια συγκεκριμένη διαμορφωτική κατάσταση, χωρίς να μπορεί να επιστρέψει στην πλήρως διπλωμένη του μορφή.

Στην *εικόνα 31* παρουσιάζονται τρεις διαφορετικές όψεις της ίδιας δομής της πρωτεΐνης Rop, όπως προέκυψε από την προσομοίωση 320K/004, στη χρονική στιγμή κατά την οποία η τιμή RMSD έφτασε τα 3.20 Å, ενώ στην *εικόνα 32* απεικονίζονται τα κατάλοιπα λευκίνη 26 (LEU26) έως γλουταμινικό όξυ 33 (GLU33) της Α αλυσίδας με αναπαράσταση τύπου stick, τα οποία αντιστοιχούν στον αποδιαταγμένο βρόχο της δομής.



Εικόνα 31: Απεικόνιση τριών διαφορετικών όψεων της ίδιας δομής της πρωτεΐνης Rop από την προσομοίωση 320K/004, στη χρονική στιγμή όπου καταγράφηκε η τιμή RMSD στα 3.20 Å. Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ οι βρόχοι και τα τελικά άκρα με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.

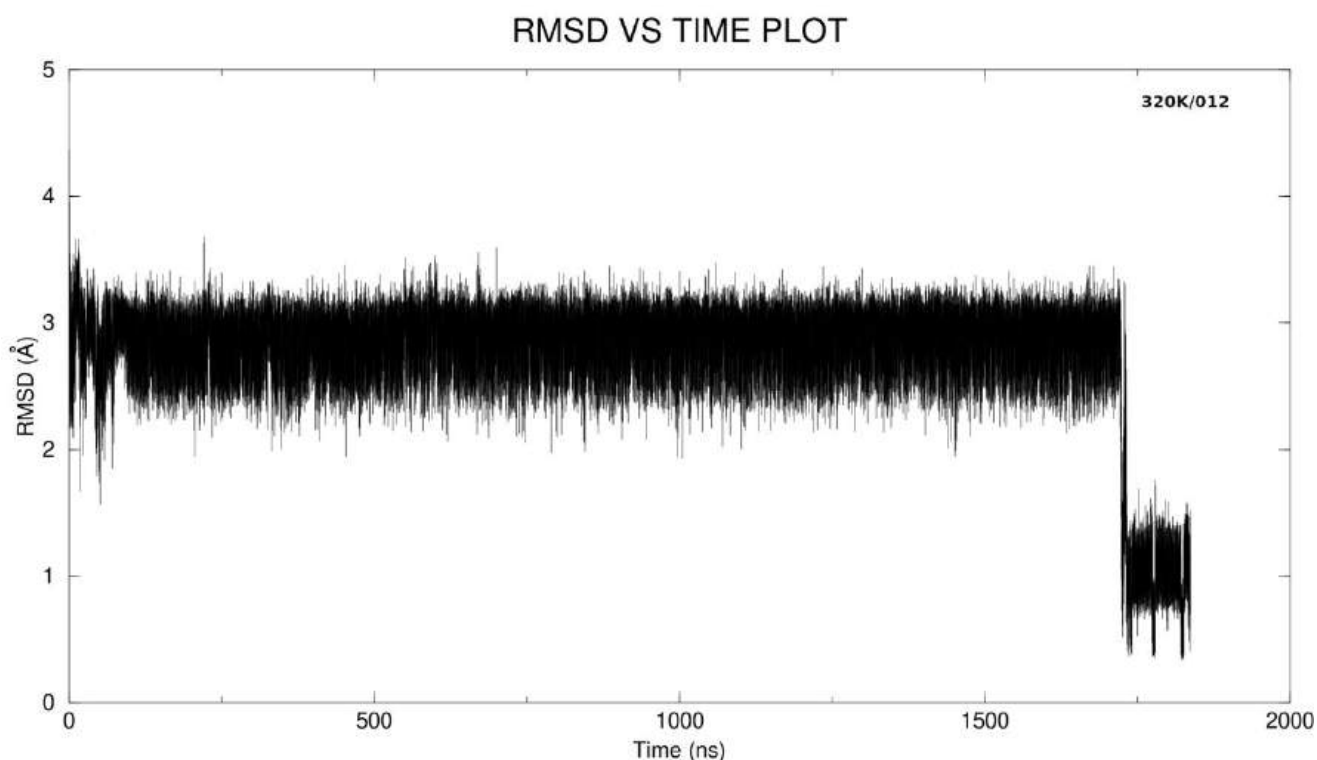


Εικόνα 32: Απεικόνιση των οκτώ καταλοίπων (LEU26-GLU33) του αποδιαταγμένου βρόχου της αλυσίδας A της πρωτεΐνης Ror, όπως εμφανίζονται με την αναπαράσταση τύπου stick. Για κάθε κατάλοιπο εμφανίζονται το όνομα και η θέση του στη σειρά της πρωτεΐνης. Τα άτομα οξυγόνου απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, τα άτομα υδρογόνου με άσπρο και τα άτομα αζώτου με μπλε. Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ ο βρόχος με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.

Από τις παραπάνω εικόνες, διακρίνεται μια μικρής έκτασης αποδιάταξη του βρόχου της A αλυσίδας, ο οποίος εκτείνεται από το κατάλοιπο LEU26 έως το GLU33. Συγκεκριμένα, στην εικόνα 32 παρατηρείται μια ήπια διαταραχή στη δομή του βρόχου σε σχέση με την αρχική διαμόρφωση της προσομοίωσης. Παρ' όλα αυτά, η συνολική δομή της πρωτεΐνης παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, χωρίς σημαντικές διαμορφωτικές αποκλίσεις. Ο βρόχος διατηρεί τη θέση του και υιοθετεί τη διαμόρφωση εκείνη που απεικονίζεται στην εικόνα 31, με μόνο ήπιες τοπικές μεταβολές.

4.4.2. Προσομοίωση 320K/012

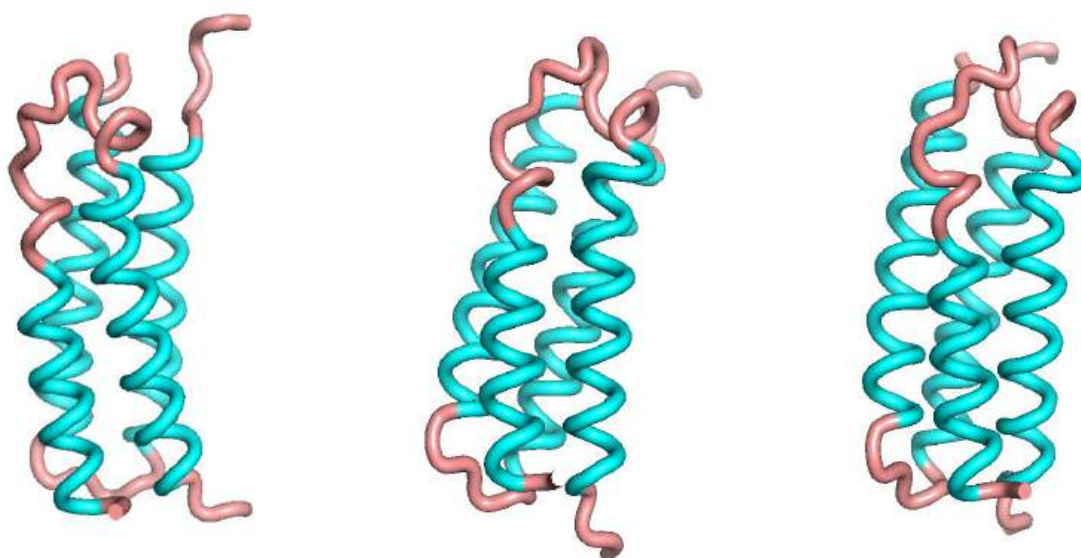
Όσον αφορά την προσομοίωση 320K/012, παρακάτω στην εικόνα 33 παρουσιάζεται το διάγραμμα RMSD σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η προσομοίωση αυτή ολοκληρώθηκε με συνολική διάρκεια περίπου 1800 ns και αποτελεί μία από τις πιο εκτενείς χρονικά προσομοιώσεις της παρούσας μελέτης. Η μεγάλη διάρκειά της, μας επέτρεψε την παρακολούθηση δομικών μεταβολών σε βάθος χρόνου.



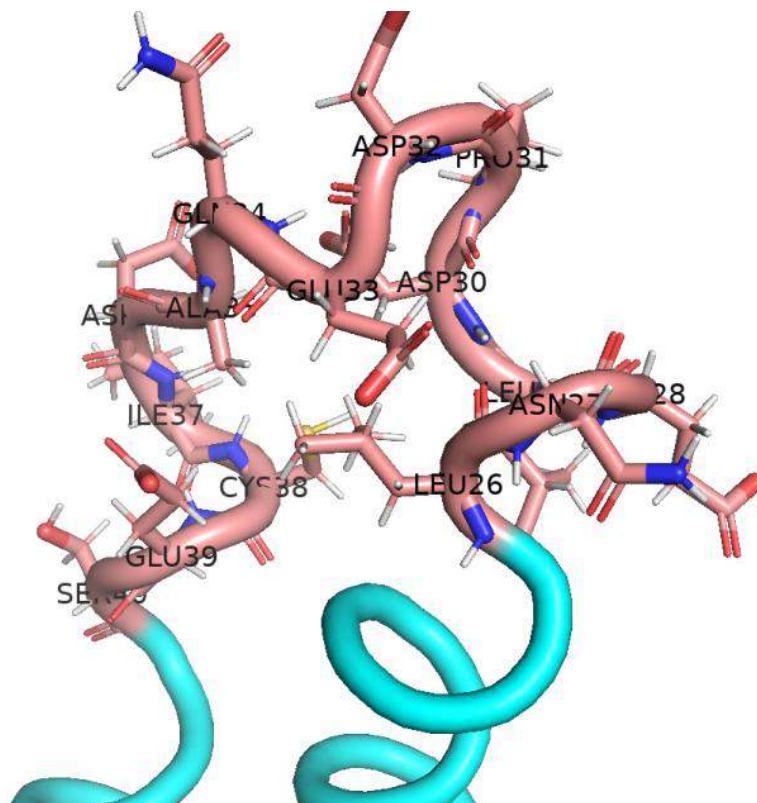
Εικόνα 33: Διάγραμμα RMSD ως προς τον χρόνο για μία προσομοίωση (012) σε θερμοκρασία 320K.

Σύμφωνα με το διάγραμμα, σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, παρατηρείται μια σχετική σταθεροποίηση του RMSD γύρω στα 3 Å όπως και στην προαναφερθείσα προσομοίωση, γεγονός που υποδηλώνει μια μακροχρόνια παραμονή της πρωτεΐνης σε μία συγκεκριμένη δομική κατάσταση. Ωστόσο, προς το τέλος της προσομοίωσης καταγράφεται μια έντονη πτώση του RMSD κάτω από τα 1 Å, η οποία αντιστοιχεί στην επαναδίπλωση της πρωτεΐνης Ror στην αρχική της φυσιολογική διαμόρφωση.

Στην *εικόνα 34* απεικονίζονται τρεις διαφορετικές όψεις μιας χαρακτηριστικής δομής που απομονώθηκε από την προσομοίωση στο χρονικό σημείο, όπου το RMSD έφτασε τα 3.7 Å. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στο βρόχο της αλυσίδας A με τα κατάλοιπα λευκίνη 26 (LEU26) έως και σερίνη 40 (SER40), ο οποίος αναπαρίσταται με απεικόνιση τύπου stick, ώστε να αναδειχθεί η τοπική αποδιάταξη της περιοχής (*εικόνα 35*).

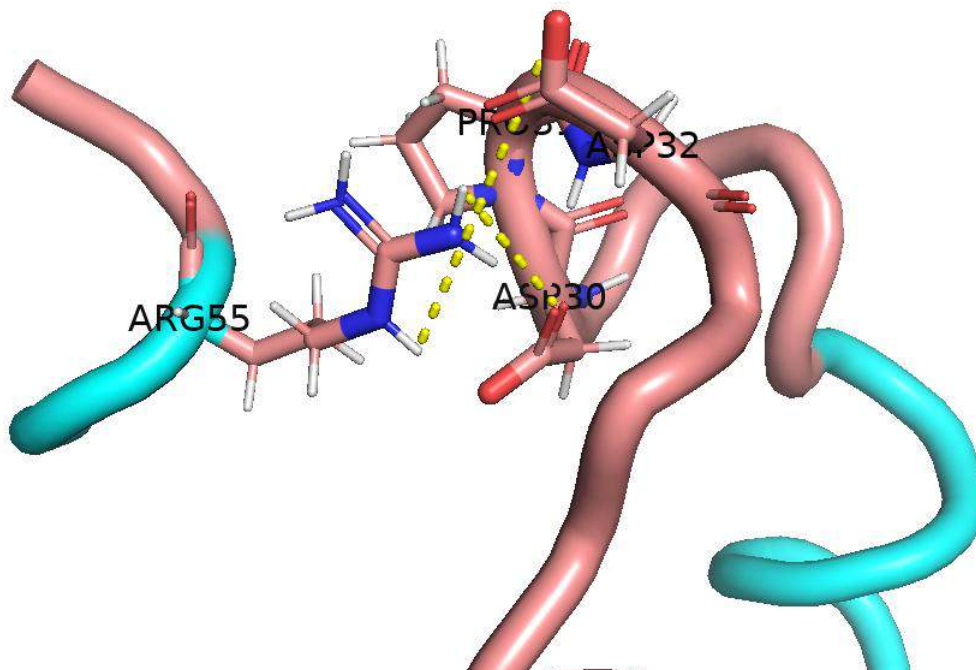


.Εικόνα 34: Απεικόνιση τριών διαφορετικών όψεων της ίδιας δομής της πρωτεΐνης Rop από την προσομοίωση 320K/012, στη χρονική στιγμή όπου καταγράφηκε η τιμή RMSD στα 3.70 Å . Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ οι βρόχοι και τα τελικά άκρα με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.



Εικόνα 35: Απεικόνιση των δεκαπέντε κατάλοιπων (LEU26-SER40) του αποδιαταγμένου βρόχου της αλυσίδας Α της πρωτεΐνης Ror, όπως εμφανίζονται με την αναπαράσταση τύπου stick. Για κάθε κατάλοιπο εμφανίζονται το όνομα και η θέση του στη σειρά της πρωτεΐνης. Τα άτομα οξυγόνου απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, τα άτομα υδρογόνου με άσπρο και τα άτομα αζώτου με μπλε. Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ ο βρόχος με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.

Είναι εμφανής, από τις παραπάνω εικόνες, η περαιτέρω αποδιάταξη της πρωτεΐνης σε σχέση με την αρχική μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή, με κύρια μεταβολή την έντονη αποδιάταξη του βρόχου της αλυσίδας Α. Ο βρόχος, ο οποίος εκτείνεται από το κατάλοιπο λευκίνη 26 έως τη σερίνη 40, παρουσιάζει αυξημένη ευκαμψία και απόκλιση από την αρχική μερικώς ξεδιπλωμένη διαμόρφωσή του, τα οποία αποτελούν ένδειξη τοπικής αποσταθεροποίησης κατά την εξέλιξη της προσομοίωσης.



Εικόνα 36: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της ARG55 της αλυσίδας B με τα κατάλοιπα ASP30 και ASP32 της αλυσίδας A. Τα αμινοξέα παρουσιάζονται με αναπαράσταση stick, ώστε να αναδεικνύονται οι πλευρικές τους ομάδες. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των πλευρικών ομάδων αποτυπώνονται ως διακεκομμένες κίτρινες γραμμές. Για κάθε κατάλοιπο εμφανίζονται το όνομα και η θέση του στη σειρά της πρωτεΐνης. Τα άτομα οξυγόνου απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, τα άτομα υδρογόνου με άσπρο και τα άτομα αζώτου με μπλε. Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ ο βρόχος με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.

Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, η πρωτεΐνη υιοθέτησε μια σταθερή δομή η οποία διατηρήθηκε σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της χρονικής εξέλιξης του συστήματος (εικόνα 34). Μια από τις κύριες αιτίες αυτής της σταθεροποίησης φαίνεται να είναι η ισχυρή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ της πλευρικής ομάδας της αργινίνης 55 της αλυσίδας B και των αρνητικά φορτισμένων πλευρικών ομάδων των καταλοίπων ασπαρτικού οξέος 30 και 32 της αλυσίδας A. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ αυτών των καταλοίπων, όπως διακρίνονται στην εικόνα 36 με διακεκομμένες κίτρινες γραμμές, παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση αυτής της σταθερής διαμόρφωσης, λειτουργώντας ως «άγκυρα» που συγκρατεί τις δύο αλυσίδες σε σταθερή σχετική θέση.

Τέλος, η προλίνη, όπως φαίνεται στην απεικόνιση, έχει παγιδευτεί στην εξωτερική πλευρά της πρωτεΐνης, εμποδίζοντας τη διαμόρφωση μιας πιο «κλειστής» δομής. Λόγω της άκαμπτης κυκλικής της δομής, περιορίζει την ευκαμψία της περιοχής του βρόχου και λειτουργεί ως εμπόδιο, συμβάλλοντας στη διατήρηση της «ανοιχτής» διαμόρφωσης και στη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Arg55 και των Asp30/32.

4.5. Δομές με Υψηλό RMSD

Σε αυτή την ενότητα εξετάζονται δομές από τρεις προσομοιώσεις (320K/008, 320K/046, 320K/057) που παρουσίασαν σχετικά υψηλές τιμές RMSD σε σχέση με την αρχική μερικώς ξεδιπλωμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης Rop. Παρότι η αρχική δομή ξεκινάει με μέτριο RMSD, οι δομές που αναλύονται εδώ εμφανίζουν ακόμα μεγαλύτερες αποκλίσεις, υποδεικνύοντας σημαντικές μεταβολές στη δομική τους συμπεριφορά.

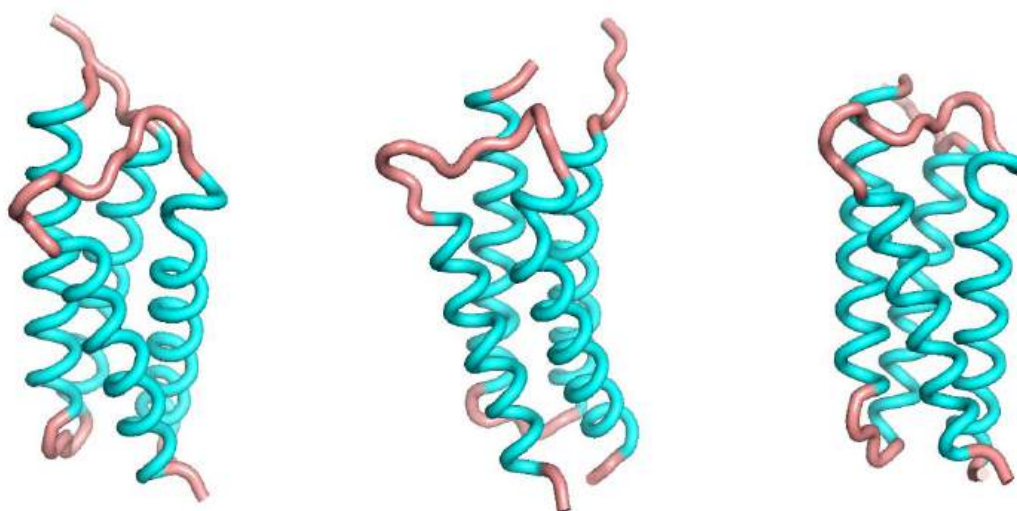
Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας με τα βασικά χαρακτηριστικά των δομών που αναλύονται σε αυτή την ενότητα. Ο πίνακας περιλαμβάνει τον αριθμό ταυτοποίησης της προσομοίωσης, τη θερμοκρασία στην οποία εκτελέστηκε, την τιμή RMSD της αντίστοιχης δομής, καθώς και τον χρόνο κατά τον οποίο λήφθηκε η δομή από την προσομοίωση.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των δομών με υψηλό RMSD από τις προσομοιώσεις. Για κάθε δομή αναφέρονται ο αριθμός της προσομοίωσης, η θερμοκρασία, η τιμή RMSD και ο χρόνος λήψης της δομής.

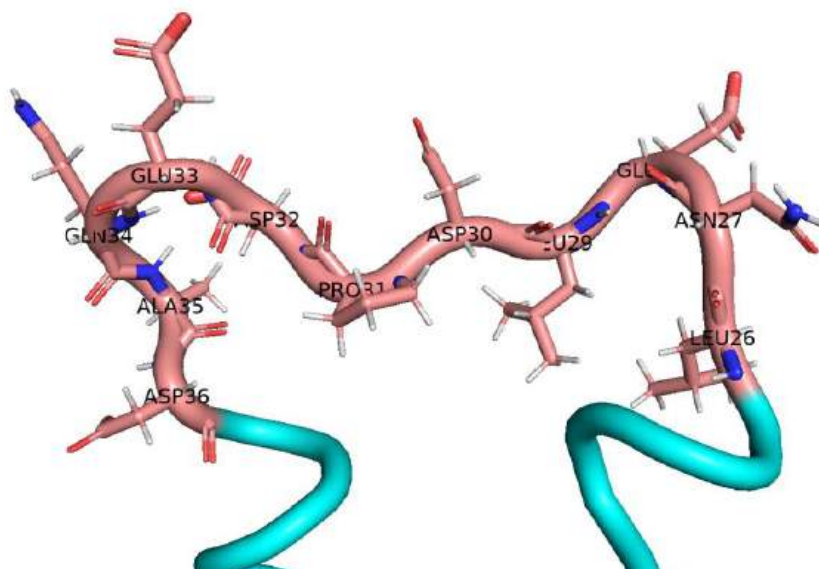
Αριθμός Προσομοιώσεων	Θερμοκρασία (K)	RMSD (Å)	Χρόνος (ns)
RUN 008	320	4.70	2.17
RUN 046	320	4.90	4.52
RUN 057	320	4.91	4.36

4.5.1. Προσομοίωση 320K/008

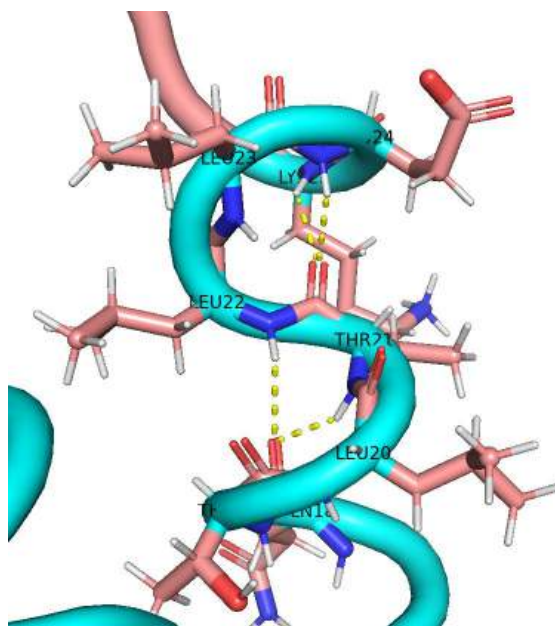
Η δομή που παρουσιάζεται παρακάτω προέρχεται από την προσομοίωση 320K/008 στη χρονική στιγμή, όπου το RMSD φτάνει περίπου τα 4.70 Å. Αν και η απόκλιση από την αρχική μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης (εικόνα 4) δεν είναι εξαιρετικά μεγάλη, οι τοπικές αλλαγές στη δομή γίνονται σαφώς ορατές στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 37: Απεικόνιση τριών διαφορετικών όψεων της ίδιας δομής της πρωτεΐνης Rop από την προσομοίωση 320K/008, στη χρονική στιγμή όπου καταγράφηκε η μέγιστη τιμή RMSD (4.70 Å). Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ οι βρόχοι και τα τελικά άκρα με ροζ.. Δημιουργία: PyMOL.



Εικόνα 38: Απεικόνιση των έντεκα καταλοίπων (LEU26-ASP36) του αποδιαταγμένου βρόχου της αλυσίδας Α της πρωτεΐνης Ror, όπως εμφανίζονται με την αναπαράσταση τύπου stick. Για κάθε κατάλοιπο εμφανίζονται το όνομα και η θέση του στη σειρά της πρωτεΐνης. Τα άτομα οξυγόνου απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, τα άτομα υδρογόνου με άσπρο και τα άτομα αζώτου με μπλε. Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ ο βρόχος με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.



Εικόνα 39: Απεικόνιση των καταλοίπων GLN18-LYS25 της αλυσίδας Α της πρωτεΐνης Ror, πριν από τον αποδιαταγμένο βρόχο, όπου διακρίνονται δεσμοί υδρογόνου (κίτρινες διακεκομμένες γραμμές) μεταξύ επιλεγμένων καταλοίπων. Τα αμινοξέα παρουσιάζονται με αναπαράσταση τύπου stick, με εμφανή το όνομα και τη θέση τους. Τα άτομα οξυγόνου απεικονίζονται με κόκκινο, τα υδρογόνα με άσπρο και τα άτομα αζώτου με μπλε χρώμα. Η έλικα απεικονίζεται με κυανό χρώμα, ενώ ο βρόχος με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.

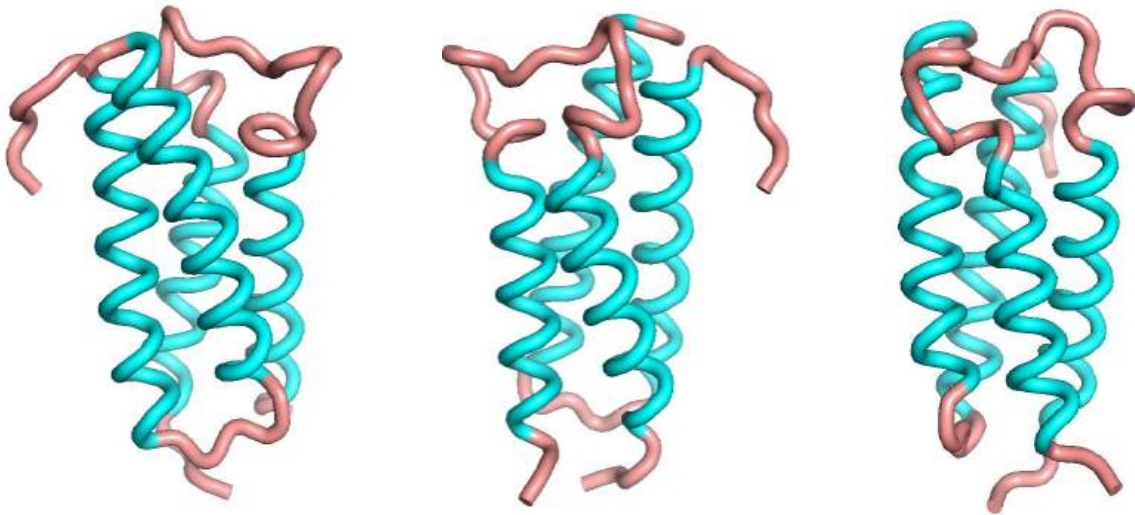
Η κυριότερη τοπική δομική μεταβολή εντοπίζεται στο βρόχο της αλυσίδας A της πρωτεΐνης Ror, ο οποίος έχει υποστεί ελαφρώς μεγαλύτερη αποδιάταξη σε σχέση με την αρχική μερικώς ξεδιπλωμένη διαμόρφωση από την οποία ξεκίνησε η προσομοίωση. Συγκριτικά με αυτή την αρχική κατάσταση, στη δομή της *εικόνας 37*, διακρίνεται εντονότερη διατάραξη του βρόχου και περαιτέρω απώλεια της τοπικής δευτεροταγούς δομής. Για περαιτέρω ανάλυση, στην *εικόνα 38* απεικονίζονται απομονωμένα τα έντεκα κατάλοιπα του συγκεκριμένου βρόχου (LEU26–ASP36), επιτρέποντας την αναγνώριση της περιοχής που έχει υποστεί τη μεγαλύτερη αποδίπλωση.

Παράλληλα, στην *εικόνα 39* απεικονίζονται τα κατάλοιπα γλουταμίνη (GLN18) έως και λυσίνη (LYS25) της αλυσίδας A, δηλαδή η περιοχή που βρίσκεται ακριβώς πριν τον αποδιαταγμένο βρόχο. Σε αυτό το τμήμα παρατηρείται η πιθανή δημιουργία μιας μικρής έλικας τύπου 3_{10} , η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία δεσμών υδρογόνου μεταξύ καταλοίπων i και $i + 3$, και στην προκειμένη περίπτωση η αλληλεπίδραση γίνεται μεταξύ των θρεονίνη 21 (THR21) και γλουταμινικό 24 (GLU24). Οι δεσμοί αυτοί απεικονίζονται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές και αποτελούν ένδειξη προσωρινής τοπικής σταθεροποίησης της συγκεκριμένης δευτεροταγούς δομής.

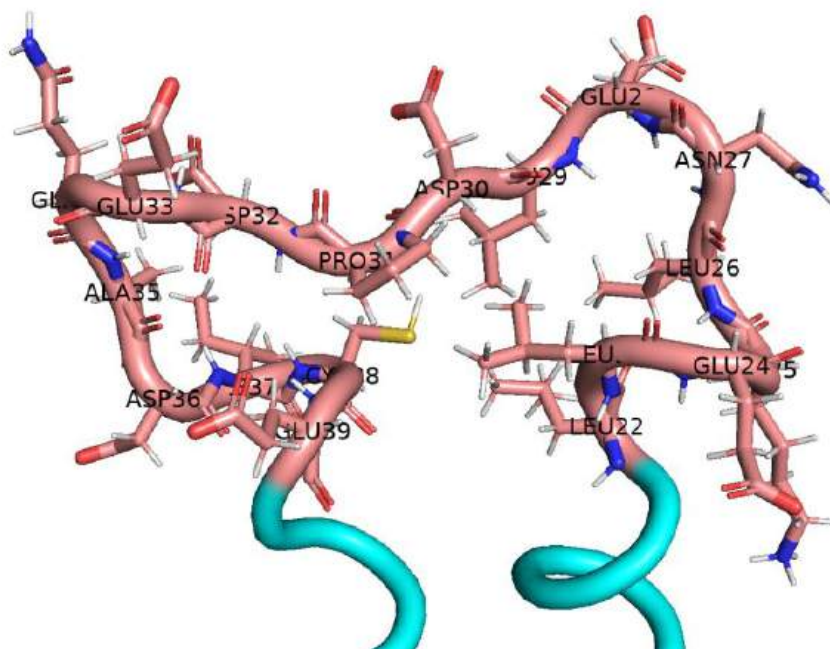
Παρά την τοπική αποδιάταξη που παρατηρείται στο βρόχο, η συνολική συμπεριφορά της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης υποδεικνύει μια τάση επαναφοράς προς τη φυσιολογική σταθερή δομή της Ror. Συγκεκριμένα, το RMSD που καταγράφηκε στην προσομοίωση 320K/008, αν και φτάνει προσωρινά την τιμή των 4.70 Å, μειώνεται ταχύτατα και σταθεροποιείται στην περιοχή των 0.8-1.0 Å, όπως φαίνεται στην *εικόνα 12*. Παρόλο που η αρχική διαμόρφωση ήταν μερικώς ξεδιπλωμένη, δεν παρατηρείται περεταίρω αποδιάταξη εντός του χρονικού πλαισίου της προσομοίωσης. Αντιθέτως, η πρωτεΐνη φαίνεται να επανακτά τη φυσιολογική της δομή, υποδεικνύοντας υψηλό βαθμό δομικής σταθερότητας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το πλήρες ξεδίπλωμα αποτελεί μια αργή και στοχαστική διαδικασία, η οποία απαιτεί σημαντικά μεγαλύτερους χρόνους για να εκδηλωθεί.

4.5.2. Προσομοίωση 320K/046

Στη συνέχεια εξετάζεται η συμπεριφορά της πρωτεΐνης κατά την προσομοίωση 320K/046. Στο πλαίσιο αυτό, παρουσιάζεται παρακάτω μία χαρακτηριστική δομή της προσομοίωσης τη χρονική στιγμή, όπου το RMSD αγγίζει την τιμή των 4.90 Å, η οποία είναι η μεγαλύτερη απόκλιση που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη προσομοίωση. Για την καλύτερη κατανόηση των τοπικών μεταβολών, η δομή απεικονίζεται από τρεις διαφορετικές οπτικές γωνίες.



Εικόνα 40: Απεικόνιση τριών διαφορετικών όψεων της ίδιας δομής της πρωτεΐνης Rop από την προσομοίωση 320K/046, στη χρονική στιγμή όπου καταγράφηκε η μέγιστη τιμή RMSD (4.90 Å). Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ οι βρόχοι και τα τελικά άκρα με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.



Εικόνα 41: Απεικόνιση των δεκαεπτά κατάλοιπων (LEU22-GLU39) του αποδιαταγμένου βρόχου της αλυσίδας A της πρωτεΐνης Ror, όπως εμφανίζονται με την αναπαράσταση τύπου stick. Για κάθε κατάλοιπο εμφανίζονται το όνομα και η θέση του στη σειρά της πρωτεΐνης. Τα άτομα οξυγόνου απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, τα άτομα υδρογόνου με άσπρο, τα άτομα αζώτου με μπλε και τα άτομα θείου με κίτρινο. Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ ο βρόχος με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.

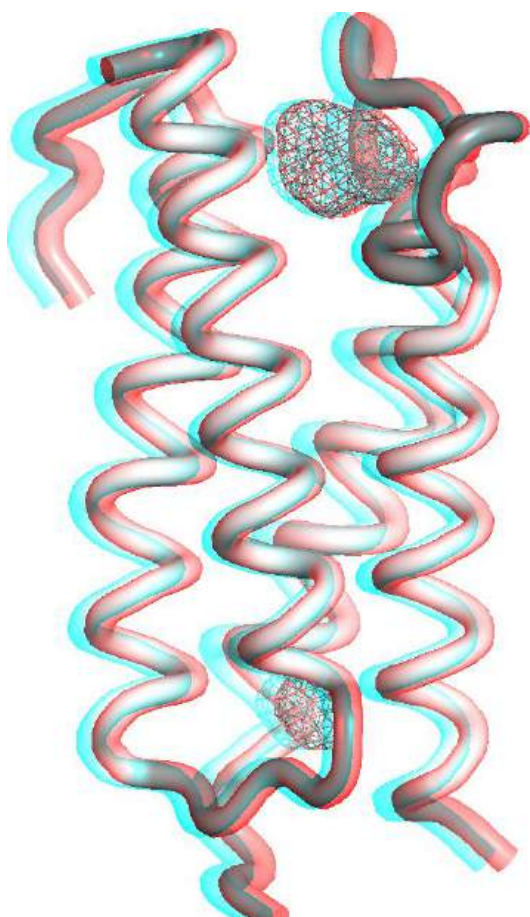
Η τοπική αποδιάταξη που παρατηρείται στην προσομοίωση 320K/046 είναι ακόμα πιο έντονη σε σύγκριση με την αντίστοιχη της 320K/008. Συγκεκριμένα, ο βρόχος της αλυσίδας A παρουσιάζει μεγαλύτερη αποδίπλωση, επεκτεινόμενη σε δεκαεπτά κατάλοιπα, από τη λευκίνη 22 (LEU22) έως και τη γλουταμινικό 39 (GLU39). Στην εικόνα 40, απεικονίζονται τρεις διαφορετικές όψεις της δομής με το μέγιστο RMSD (4.90 Å), όπου η έκταση και η σαφήνεια της αποδιάταξης του βρόχου γίνονται ξεκάθαρα αντιληπτές.

Στην εικόνα 41, παρουσιάζονται απομονωμένα τα 17 κατάλοιπα του αποδιαταγμένου βρόχου, με απεικόνιση τύπου stick και επισήμανση του ονόματος και της θέσης κάθε αμινοξέος, ώστε να διευκολύνεται η παρατήρηση της ακολουθίας και της τοπικής δομικής αλλαγής.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, όπως παρατηρήθηκε και στην προηγούμενη προσομοίωση, παρά την εκτεταμένη τοπική αποδιάταξη που παρατηρείται σε αυτή την προσομοίωση, η τιμή του RMSD μειώνεται απότομα

αμέσως μετά την κορύφωσή της στα 4.90 Å. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 21, το RMSD σταθεροποιείται σχετικά σύντομα (~ 5 ns) σε τιμές της τάξης των 0.8-1.0 Å. Το φαινόμενο αυτό υποδεικνύει ότι, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες προσομοίωσης, η πρωτεΐνη δεν προχωρά εύκολα προς πλήρη αποδιοργάνωση, αλλά αντίθετα παρουσιάζει τάση διατήρησης της αρχικής φυσιολογικής της δομής.

Στην εικόνα 42 παρουσιάζεται μια αναγλυφική αναπαράσταση (anaglyph stereo) της δομής της πρωτεΐνης από την προσομοίωση 320K/046 σε χρονικό σημείο όπου το RMSD φτάνει τη μέγιστη τιμή του. Η συγκεκριμένη απεικόνιση είναι κατάλληλη για παρατήρηση με γυαλιά 3D (κόκκινο-κυανό), επιτρέποντας την τρισδιάστατη οπτική αντίληψη της δομής [28]. Στο εσωτερικό της πρωτεΐνης διακρίνονται χαρακτηριστικές κοιλότητες (άνω και κάτω δεξιά), γνωστές

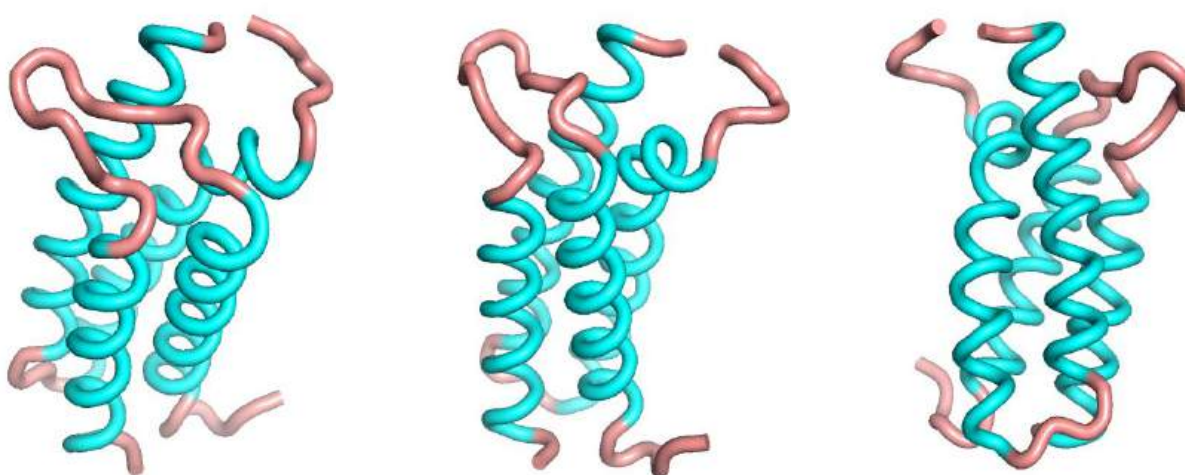


ως cavities, οι οποίες αποτελούν ενδεικτικό αποτέλεσμα της έντονης αποδιάταξης που έχει υποστεί. Οι κοιλότητες αυτές πιθανότατα έχουν καταληφθεί από μόρια διαλύτη (π.χ. νερού), γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη έχει χάσει μέρος της συμπαγούς φυσιολογικής της αρχιτεκτονικής και έχει επιτρέψει την είσοδο του διαλύτη στο εσωτερικό και συγκεκριμένα στις περιοχές του βρόχου. Οι κοιλότητες αυτές δεν είναι απλώς ενδείξεις αποδιάταξης, αλλά συχνά συνδέονται με τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης και τη δυνατότητά της να αλληλεπιδρά με άλλα μόρια [29]. Το φαινόμενο αυτό αντικατοπτρίζει τη δομική αστάθεια της πρωτεΐνης υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες της προσομοίωσης.

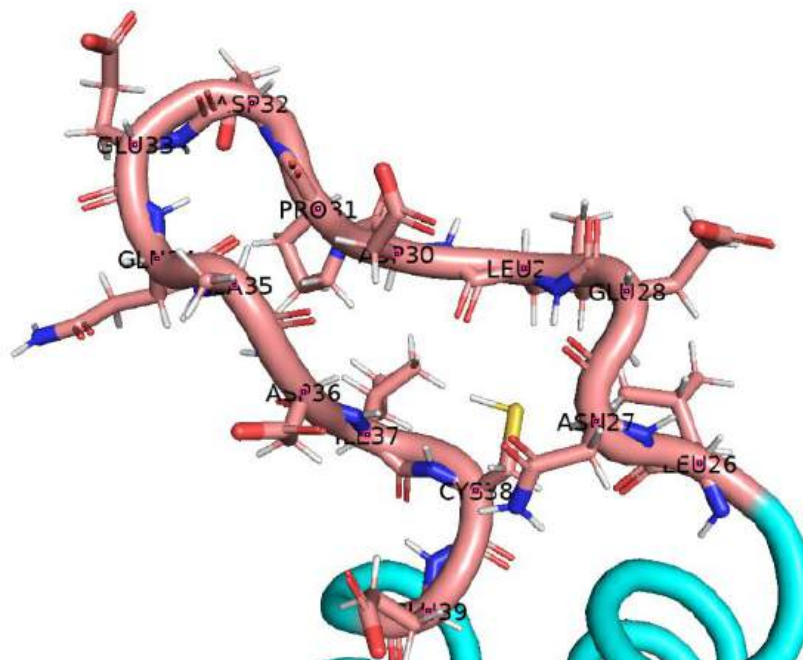
Εικόνα 42: Αναγλυφική απεικόνιση (anaglyph stereo) της δομής της πρωτεΐνης από την προσομοίωση 320K/046 σε χρονικό σημείο μέγιστου RMSD (4.90 Å). Η εικόνα είναι σχεδιασμένη ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί με 3D γυαλιά (τύπου κόκκινο-κυανό). Στο εσωτερικό της δομής διακρίνονται χαρακτηριστικές κοιλότητες (άνω και κάτω δεξιά), ενδεικτικές της έντονης αποδιάταξης που έχει υποστεί η πρωτεΐνη. Δημιουργία: PyMOL.

4.5.3. Προσομοίωση 320K/057

Κατά την τρίτη και τελευταία προσομοίωση (320K/057), καταγράφηκε η υψηλότερη τιμή RMSD από όλες τις προσομοιώσεις, φτάνοντας τα 4.91 Å. Η πρωτεϊνική διαμόρφωση που αντιστοιχεί σε αυτή τη χρονική στιγμή παρουσιάζεται παρακάτω και απεικονίζεται από τρεις διαφορετικές οπτικές γωνίες, ώστε να αναδειχθούν καλύτερα οι τοπικές δομικές μεταβολές.



Εικόνα 43: Απεικόνιση τριών διαφορετικών όψεων της ίδιας δομής της πρωτεΐνης Rop από την προσομοίωση 320K/057, στη χρονική στιγμή όπου καταγράφηκε η μέγιστη τιμή RMSD (4.91 Å). Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ οι βρόχοι και τα τελικά άκρα με ροζ. Δημιουργία: PyMOL.



Εικόνα 44: Απεικόνιση των δεκατεσσάρων κατάλοιπων (LEU26-GLU39) του αποδιαταγμένου βρόχου της αλυσίδας Α της πρωτεΐνης Ror, όπως εμφανίζονται με την αναπαράσταση τύπου *stick* (προσομοίωση 320K/057). Για κάθε κατάλοιπο εμφανίζονται το όνομα και η θέση του στη σειρά της πρωτεΐνης. Τα άτομα οξυγόνου απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, τα άτομα υδρογόνου με άσπρο, τα άτομα αζώτου με μπλε και τα άτομα θείου με κίτρινο. Οι έλικες απεικονίζονται με κινανό χρώμα, ενώ ο βρόχος με ροζ.

Δημιουργία: PyMOL.

Σύμφωνα με την εικόνα 43, παρατηρείται ότι η αποδιάταξη της πρωτεΐνης στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πιο εκτεταμένη σε σύγκριση με τη δομή από την οποία ξεκίνησε η προσομοίωση. Ο αποδιαταγμένος βρόχος που σχηματίζεται αποτελείται από 14 κατάλοιπα, από τη LEU26 έως και τη GLU39 (εικόνα 44), αριθμός μικρότερος από τον αντίστοιχο βρόχο της προσομοίωσης 046, όπου η αποδιάταξη εκτείνεται σε 17 κατάλοιπα, από τη LEU22 έως τη GLU39. Η διαφορά αυτή υποδηλώνει ότι, αν και και στις δύο περιπτώσεις σημειώνεται έντονη αποδιάταξη, το εύρος της δομικής διαταραχής είναι ελαφρώς περιορισμένο στη συγκεκριμένη προσομοίωση σε σχέση με την 046. Ωστόσο, οι τιμές RMSD είναι σχεδόν ίδιες (4.91 Å για την 057 και 4.90 Å για την 046), γεγονός που δείχνει ότι η συνολική απόκλιση από την αρχική μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή είναι παρόμοια και στις δύο δομές που απεικονίζονται παραπάνω.

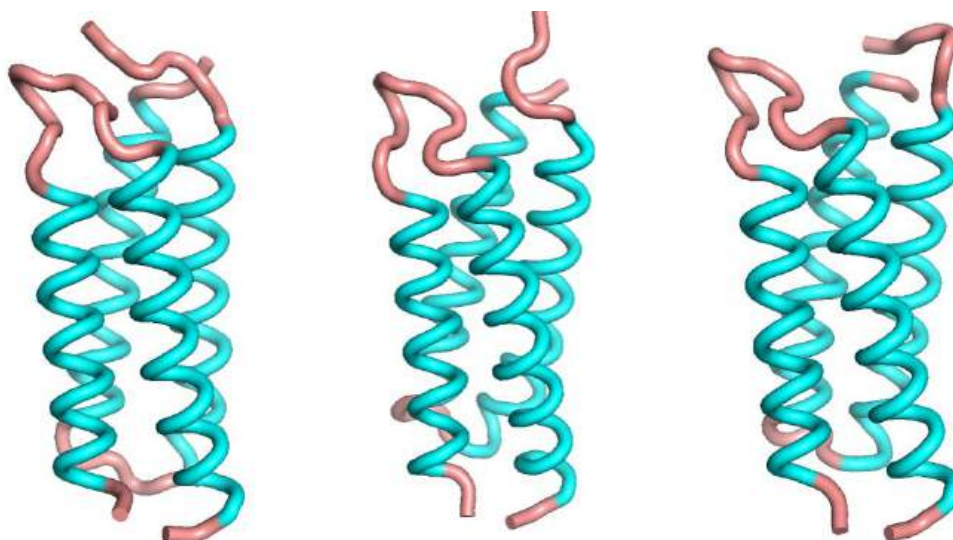
4.6. Ανάλυση της Προσομοίωσης 340K/006

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζεται η προσομοίωση μοριακής δυναμικής με αριθμό ταυτοποίησης 340K/006, η οποία έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα (εικόνα 29). Η συγκεκριμένη προσομοίωση επιλέχθηκε προς περαιτέρω ανάλυση, καθώς κατά τη διάρκειά της παρατηρήθηκαν ενδιαφέρουσες διαμορφωτικές μεταβολές και χαρακτηριστικές δομές, οι οποίες υποδηλώνουν δυναμική συμπεριφορά ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος. Η ανάλυση επικεντρώνεται στη μελέτη των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, με έμφαση στην Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών στις Διέδρες Γωνίες (Dihedral Principal Component Analysis - dPCA) και στη Δευτεροταγή Δομή (Secondary Structure).

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας στον οποίο καταγράφονται ο αριθμός ταυτοποίησης της προσομοίωσης, η μέγιστη τιμή RMSD και η χρονική στιγμή λήψης της αντίστοιχης διαμόρφωσης της πρωτεΐνης. Στην εικόνα 45, απεικονίζονται οι τρεις δομές με τις υψηλότερες τιμές RMSD που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Οι τιμές RMSD αντιστοιχούν με τη σειρά εμφάνισής τους στον πίνακα, από αριστερά προς τα δεξιά στην εικόνα.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των δομών με τις υψηλότερες τιμές RMSD από την προσομοίωση 340K/006. Για κάθε διαμόρφωση αναφέρονται ο αριθμός ταυτοποίησης της προσομοίωσης, η τιμή RMSD και η χρονική στιγμή λήψης της δομής.

Αριθμός Ταυτοποίησης	RMSD (Å)	Χρόνος (ns)
340K/006	4.38	26.79
340K/006	4.34	122.16
340K/006	4.12	170.77



Εικόνα 45: Απεικόνιση τριών διαφορετικών δομών της πρωτεΐνης Ror από την προσομοίωση 340K/006, οι οποίες αντιστοιχούν στις υψηλότερες τιμές RMSD που καταγράφηκαν: 4.38 Å, 4.34 Å και 4.12 Å αντίστοιχα (από αριστερά προς τα δεξιά). Οι έλικες απεικονίζονται με κυανό χρώμα, ενώ οι βρόχοι και τα τελικά άκρα με ροζ.
Δημιουργία: PyMOL.

Παρατηρώντας τις τρεις διαμορφώσεις της πρωτεΐνης που απεικονίζονται στην εικόνα 45, διακρίνεται εμφανώς η αποδιοργάνωση του βρόχου της αλυσίδας A, ο οποίος βρίσκεται στην πρόσθια πλευρά της δομής. Ο συγκεκριμένος βρόχος φαίνεται να έχει χάσει τη φυσιολογική του διάταξη και να καταλαμβάνει ακανόνιστη, μη σταθερή θέση. Λόγω αυτής της έντονης τοπικής μεταβολής, η περιοχή αυτή εξετάστηκε πιο αναλυτικά με τη βοήθεια εξειδικευμένων υπολογιστικών εργαλείων.

Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος grcarma, ενός αυτοματοποιημένου εργαλείου ανάλυσης προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Το grcarma βασίζεται στο πρόγραμμα carma και παρέχει ένα φιλικό προς τον χρήστη γραφικό περιβάλλον που επιτρέπει την εύκολη και αξιόπιστη εκτέλεση σύνθετων αναλύσεων [30],[31]. Και για τις δύο αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητοι υπολογισμοί: για ολόκληρη τη δομή, για τη στροφή της αλυσίδας A και για τη στροφή της αλυσίδας B, σε όλες τις περιπτώσεις εξαιρώντας τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα. Για την οπτικοποίηση και ανάλυση των τρισδιάστατων δομών που προέκυψαν από τις αναλύσεις, χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα PyMOL και RasMol. Το RasMol είναι ένα πρόγραμμα μοριακής απεικόνισης γνωστό

για την απλότητα και την αποδοτικότητά του στην οπτικοποίηση και ανάλυση βιομοριακών δομών [32].

4.6.1. Dihedral PCA

Το Dihedral PCA (dPCA) είναι μια τεχνική ανάλυσης που εξετάζει τις διέδρες γωνίες των μορίων κατά τη διάρκεια μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής. Μετατρέπει τις πολύπλοκες κινήσεις της δομής σε λίγες βασικές συνιστώσες (principal components), οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις πιο σημαντικές αλλαγές στη χωρική διάταξη του μορίου. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την αυτόματη αναγνώριση και ομαδοποίηση (clustering) των βασικών δομικών καταστάσεων που επαναλαμβάνονται κατά την προσομοίωση, διευκολύνοντας έτσι την κατανόηση των κύριων δομικών μεταβολών [30].

Το dPCA παράγει διαγράμματα που απεικονίζουν τις σχέσεις μεταξύ των πρώτων τριών κύριων συνιστωσών (PC1 vs PC2, PC1 vs PC3 και PC2 vs PC3), επιτρέποντας την οπτική αναγνώριση και τον διαχωρισμό διαφορετικών δομικών καταστάσεων (clusters) που εμφανίζονται κατά την προσομοίωση. Από την ανάλυση αυτή προκύπτουν αντιπροσωπευτικές δομές (representative structures) για κάθε cluster, οι οποίες συνοψίζουν τα βασικά χαρακτηριστικά της κάθε δομικής ομάδας. Τέλος, δημιουργούνται υπερθέσεις (superpositions) πολλών επιλεγμένων frames, οι οποίες δείχνουν πώς αλλάζει και πόσο ευέλικτη είναι η δομή μέσα σε κάθε cluster.

4.6.2. Secondary Structure

Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής με το gcrarna βασίζεται στην αυτόματη ταυτοποίηση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής (όπως α -έλικες, β -φύλλα κ.ά.) σε κάθε στιγμιότυπο (frame) της προσομοίωσης. Αυτό γίνεται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα STRIDE, το οποίο αναλύει την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών και κατηγοριοποιεί κάθε αμινοξύ ανάλογα με τον αντίστοιχο τύπο δευτεροταγούς δομής [33].

Το grcarma απεικονίζει με χρώματα τις μεταβολές της δευτεροταγούς δομής σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, επιτρέποντας την παρακολούθηση της εξέλιξης των δομικών στοιχείων με το χρόνο. Παράλληλα, παράγει γραφήματα WebLogo που παρουσιάζουν τη συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών δευτεροταγών στοιχείων σε κάθε θέση της αλληλουχίας κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης [34]. Έτσι, το grcarma προσφέρει μια ολοκληρωμένη οπτική απεικόνιση της δυναμικής της δευτεροταγούς δομής, διευκολύνοντας την ανάλυση της σταθερότητας και των δομικών αλλαγών που παρατηρούνται στο μόριο.

4.6.3. Dihedral PCA: Ολόκληρη Δομή

Αρχικά, για την εκτέλεση της ανάλυσης dihedral PCA σε ολόκληρη τη δομή αλλά και στις στροφές ξεχωριστά, εντοπίστηκαν τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα των δύο αλυσίδων με τη βοήθεια της λειτουργίας Extract PDB(s) του προγράμματος grcarma, η οποία επιτρέπει την εξαγωγή ατομικών συντεταγμένων (PDB αρχεία) από την τροχιά της προσομοίωσης [30]. Συγκεκριμένα, για την αλυσίδα A, τα άκρα αντιστοιχούν στα κατάλοιπα 1-3 (N-τελικό) και 55-57 (C-τελικό), ενώ για την αλυσίδα B στα κατάλοιπα 1-7 και 55-57, αντίστοιχα. Αυτά τα τμήματα εξαιρέθηκαν από την ανάλυση, καθώς εμφανίζουν υψηλή κινητικότητα και δεν αντιπροσωπεύουν τη σταθερή δομή της πρωτεΐνης.

Από την ανάλυση dPCA προέκυψαν εννέα διακριτά clusters, τα οποία αντιστοιχούν σε επαναλαμβανόμενες δομικές καταστάσεις της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Κάθε cluster περιλαμβάνει έναν αριθμό frames από την τροχιά, που αντιπροσωπεύουν στιγμιότυπα της δομής με παρόμοια χωρική διάταξη και δομή. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τον αριθμό των frames που αντιστοιχούν σε κάθε cluster, καθώς και τον συνολικό αριθμό των frames της προσομοίωσης (212.431), εκ των οποίων τα 130.179 κατανεμήθηκαν στα 9 clusters. Ο αριθμός των frames ποικίλλει μεταξύ των clusters, διότι ενδεχομένως κάποιες δομικές καταστάσεις να είναι πιο σταθερές ή πιο συχνές και έτσι να περιλαμβάνουν περισσότερα frames, ενώ κάποιες άλλες να είναι πιο σπάνιες.

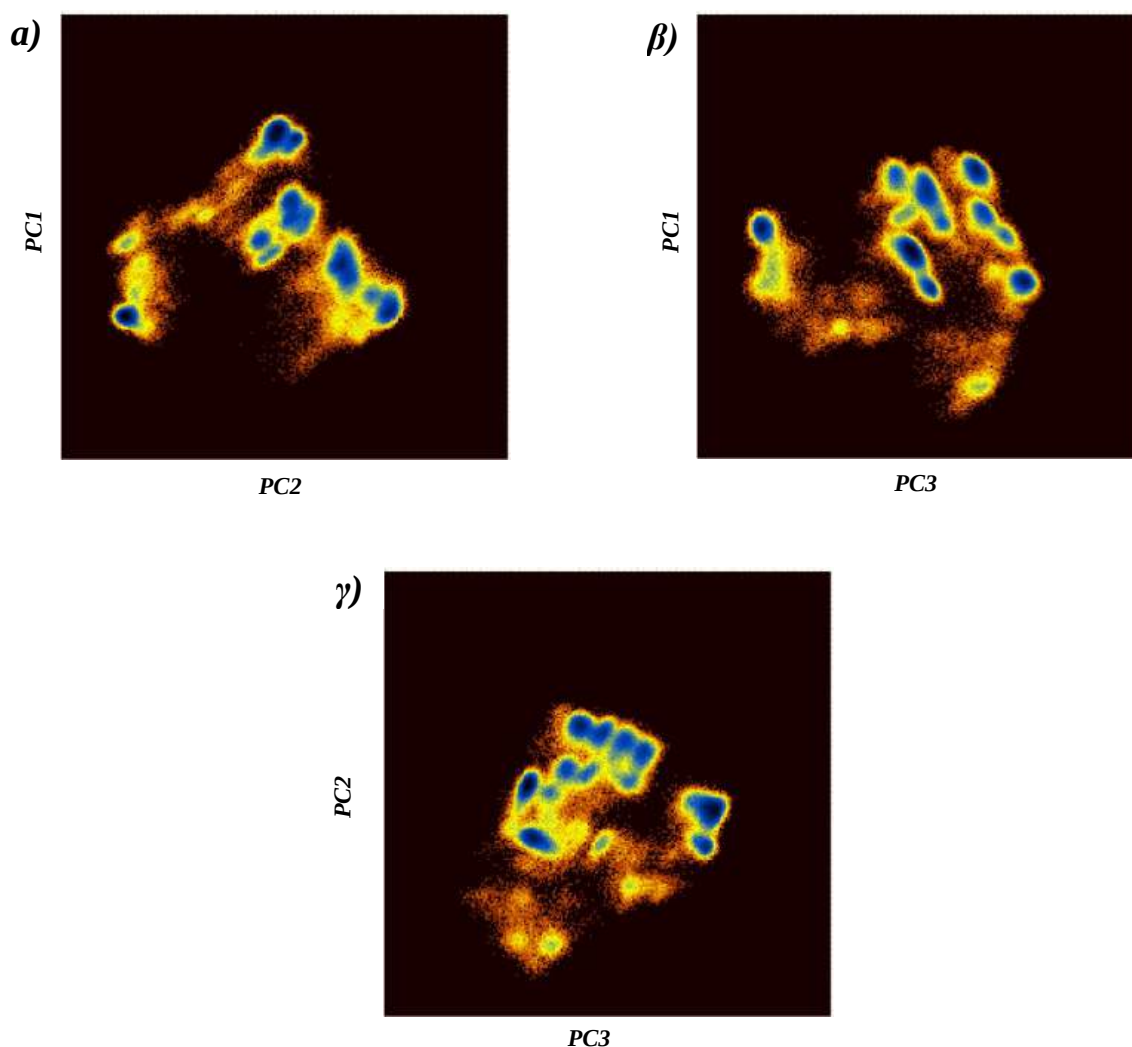
Πίνακας 6: Κατανομή των frames της προσομοίωσης 340K/006 στα 9 clusters που προέκυψαν από την ανάλυση dihedral PCA. Για κάθε cluster αναγράφεται ο αριθμός των frames που το αποτελούν, καθώς και ο συνολικός αριθμός frames που συμμετείχαν στην κατάτμηση. Υπολογισμός: grcarma

Αριθμός Cluster	Αριθμός Frames
Cluster 1	41.496
Cluster 2	18.652
Cluster 3	16.831
Cluster 4	16.628
Cluster 5	20.481
Cluster 6	7.074
Cluster 7	5.391
Cluster 8	1.751
Cluster 9	1.875
Συνολικός Αριθμός Frames σε Clusters	130.179
Συνολικός Αριθμός Frames	212.431

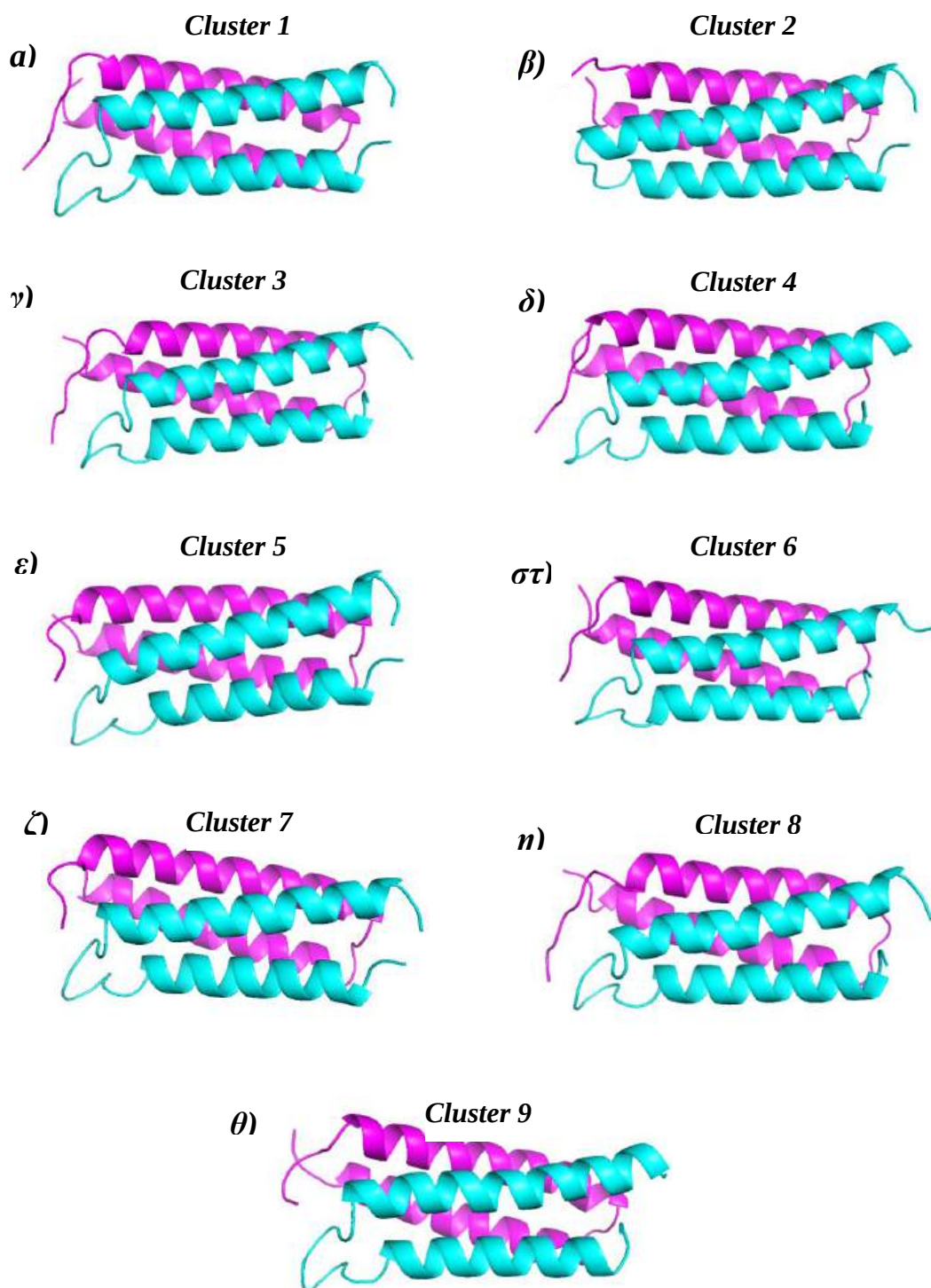
Στην *εικόνα 46* απεικονίζονται τα τοπία πυκνότητας για τις κύριες συνιστώσες α) PC1 vs PC2, β) PC1 vs PC3 και γ) PC2 vs PC3, όπως προκύπτουν από την ανάλυση dPCA. Είναι εμφανείς οι μπλε κορυφές που αντιστοιχούν στα 9 clusters της ανάλυσης. Οι μπλε περιοχές δείχνουν πολλά παρόμοια frames, ενώ οι κίτρινες/πορτοκαλί περιοχές δείχνουν λιγότερα και πιο διαφορετικά frames. Παρά την ύπαρξη πολλών οπτικών κορυφών, αρκετές ανήκουν στο ίδιο cluster, καθώς η προβολή σε δύο διαστάσεις διασπά την πραγματική συνοχή που υπάρχει στον πολυδιάστατο χώρο. Έτσι, εμφανίζονται περισσότερα clusters σε σχέση με όσα προκύπτουν από την πραγματική ομαδοποίηση.

Η *εικόνα 47* παρουσιάζει τις αντιπροσωπευτικές δομές για κάθε ένα από τα 9 clusters που προέκυψαν από την ανάλυση. Κάθε δομή δείχνει τα βασικά χαρακτηριστικά των δομών του αντίστοιχου cluster και λειτουργεί ως ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της μορφής που κυριαρχεί στην ομάδα. Με αυτόν τον τρόπο, αναδεικνύονται οι βασικές ιδιότητες που διαφοροποιούν τα clusters μεταξύ τους, διευκολύνοντας την αξιολόγηση τους.

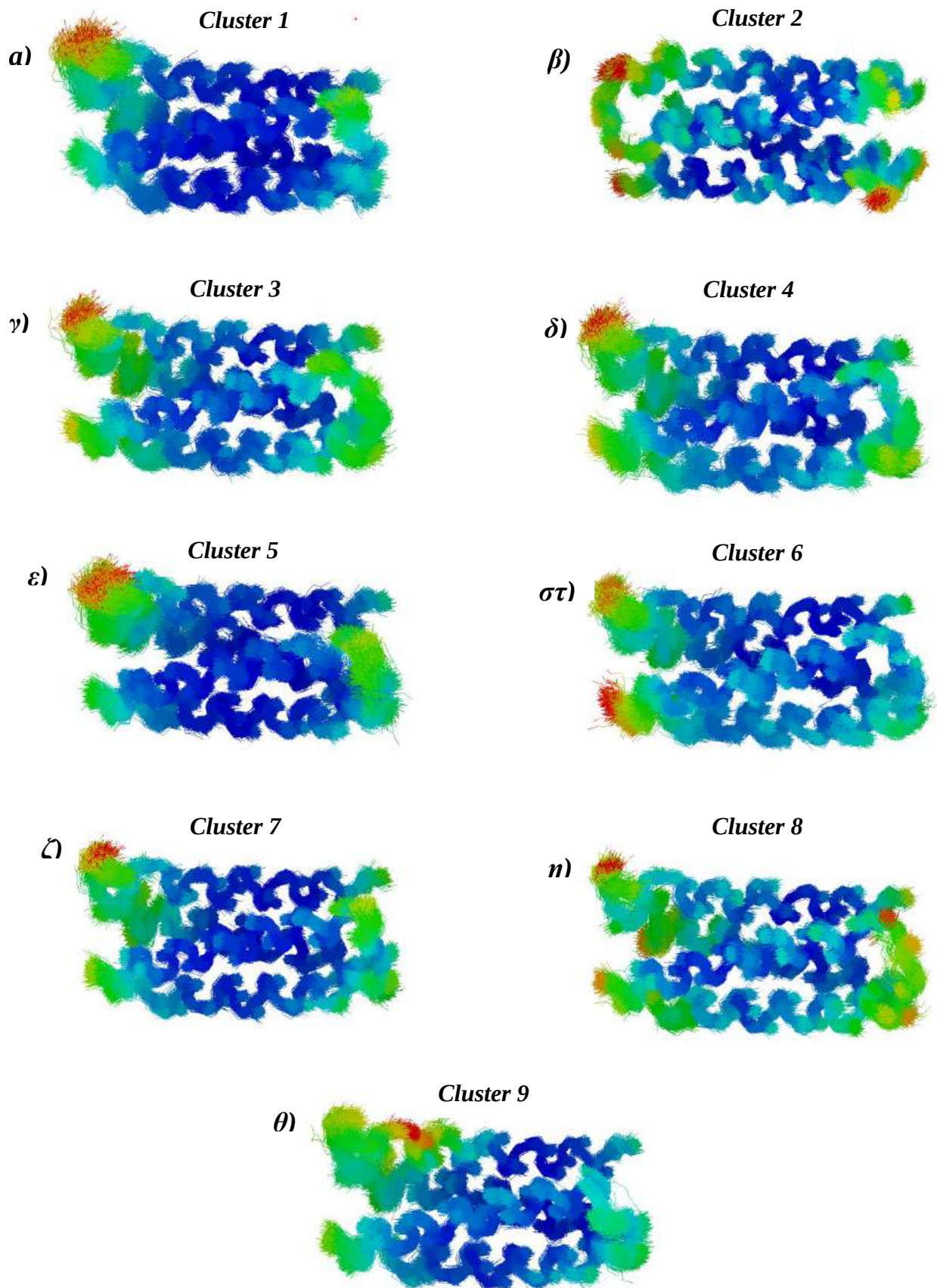
Από τις 9 δομές παρατηρείται κινητικότητα κυρίως στις περιοχές των N- και C-άκρων και στους βρόχους, γεγονός που υποδηλώνει μεγαλύτερη ευελιξία σε αυτά τα τμήματα. Για παράδειγμα, συγκρίνοντας τις δομές των clusters β και η, διακρίνεται σαφής διαφορά στη διαμόρφωση των βρόχων και στα άκρα της B αλυσίδας.



Εικόνα 46: Τοπία πυκνότητας που δείχνουν την κατανομή των *frames* της προσομοίωσης μετά από ανάλυση *dPCA* για ολόκληρη τη δομή. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (*backbone*) της υποθετικής δομής της *Ror* με την μετάλλαξη *A31P*, με εξαίρεση τις ουρές. Οι μπλε περιοχές αντιστοιχούν στα 9 clusters. α) Τοπίο *PC1* vs *PC2*, β) Τοπίο *PC1* vs *PC3*, γ) Τοπίο *PC2* vs *PC3*. Υπολογισμός: *grcarma*



Εικόνα 47: Αναπαράσταση των αντιπροσωπευτικών δομών των 9 clusters που δημιουργήθηκαν από το dihedral PCA για ολόκληρη τη δομή μέσω του προγράμματος grcarma. Η Α αλυσίδα της πρωτεΐνης Rop είναι χρωματισμένη με κυανό, ενώ η Β αλυσίδα με ματζέντα. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (backbone) της υποθετικής δομής της Rop με την μετάλλαξη A31P, με εξαίρεση τις ουρές. Παρουσιάζονται οι δομές που εκπροσωπούν τα clusters: α) cluster 1, β) cluster 2, γ) cluster 3, δ) cluster 4, ε) cluster 5, στ) cluster 6, ζ) cluster 7, η) cluster 8, θ) cluster 9. Δημιουργία: PyMOL.



Εικόνα 48: Αναπαράσταση δομών υπέρθεσης (superposition structures) των 9 clusters που δημιουργήθηκαν από το dihedral PCA για ολόκληρη τη δομή. Η χρωματική κωδικοποίηση δείχνει την κινητικότητα, από μπλε (χαμηλή) έως κόκκινο (υψηλή). Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (backbone) της υποθετικής

δομής της Ror με την μετάλλαξη A31P, με εξαίρεση τις ουρές. Παρουσιάζονται οι δομές που εκπροσωπούν τα clusters: α) cluster 1, β) cluster 2, γ) cluster 3, δ) cluster 4, ε) cluster 5, στ) cluster 6, ζ) cluster 7, η) cluster 8, θ) cluster 9. Υπολογισμός: grcarma. Δημιουργία: RasMol.

Στην εικόνα 48 παρουσιάζονται οι 9 δομές υπέρθεσης που προέκυψαν από την ομαδοποίηση. Κάθε δομή αντιστοιχεί σε ένα από τα 9 clusters και είναι κωδικοποιημένη με διαφορετικό χρώμα, το οποίο έχει οριστεί στο RasMol χρησιμοποιώντας την επιλογή temperature coloring. Με αυτόν τον τρόπο, τα ψυχρά χρώματα (μπλε, πράσινο) αντιστοιχούν σε περιοχές χαμηλής κινητικότητας, ενώ τα θερμά χρώματα (κίτρινο, κόκκινο) δείχνουν περιοχές με υψηλή κινητικότητα. Παρατηρείται ότι οι περιοχές που αντιστοιχούν στους βρόγχους, καθώς και τα N- και C-τελικά άκρα της δομής, εμφανίζουν έντονα θερμά χρώματα (εικόνα 48β), υποδεικνύοντας αυξημένη κινητικότητα σε αυτές τις θέσεις σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τμήματα της δομής.

4.6.4. Dihedral PCA: Στροφή A αλυσίδας

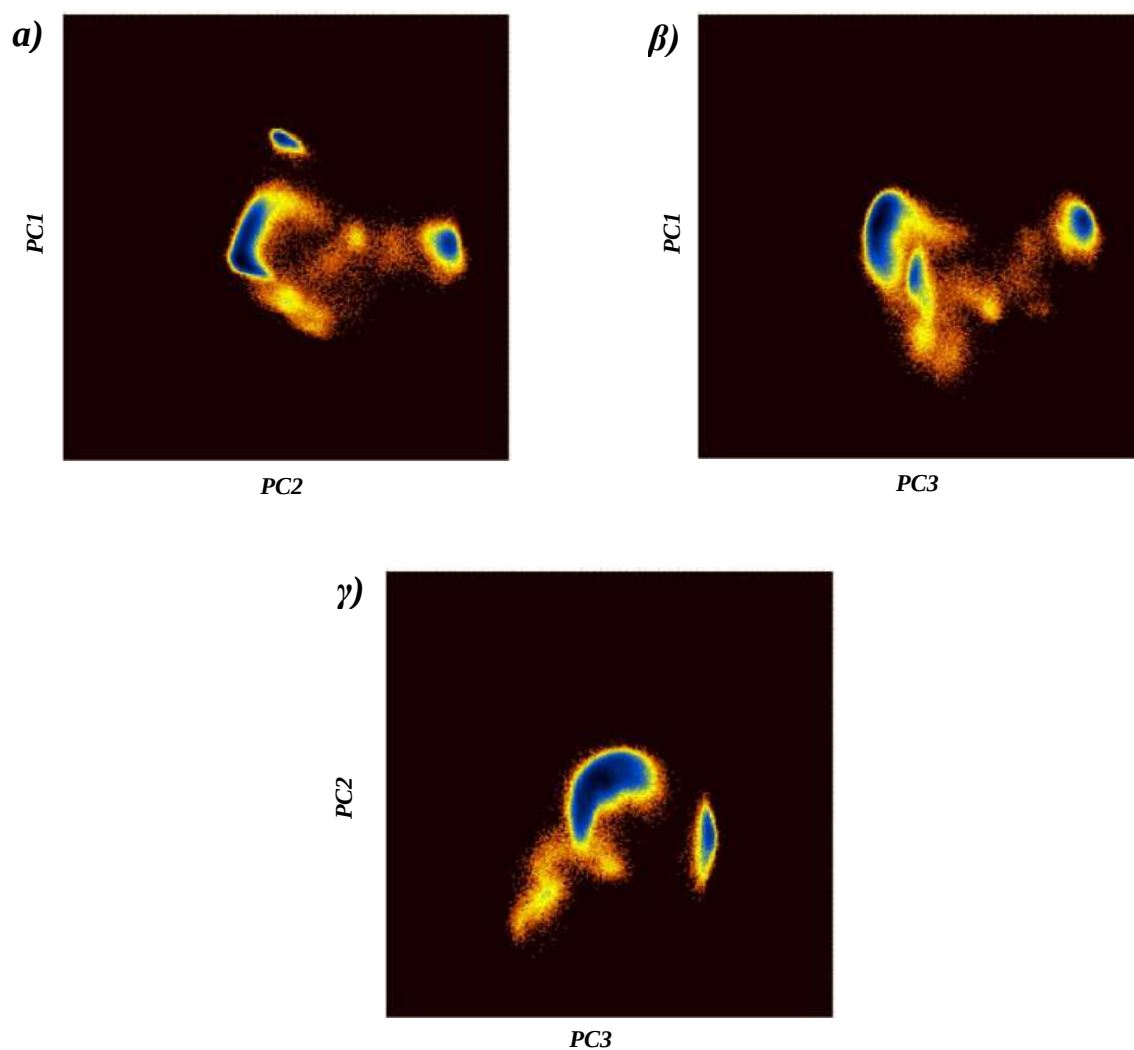
Για να μελετηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η δυναμική της στροφής της αλυσίδας A, εφαρμόστηκε ξεχωριστή ανάλυση dihedral PCA μόνο στα κατάλοιπα LEU26-GLN34, τα οποία συγκροτούν τη συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα ίδια βήματα με την αντίστοιχη ανάλυση για ολόκληρη τη δομή. Ο πίνακας 7 που προέκυψε καταγράφει την κατανομή των frames σε δύο τελικά clusters. Όπως και προηγουμένως, ο αριθμός των frames σε κάθε cluster αντικατοπτρίζει τη σχετική σταθερότητα και συχνότητα εμφάνισης των αντίστοιχων δομικών διαμορφώσεων.

Πίνακας 7: Κατανομή των frames της προσομοίωσης 340K/006 στα 2 clusters που προέκυψαν από την ανάλυση dihedral PCA για τη στροφή της Α αλυσίδας. Για κάθε cluster αναγράφεται ο αριθμός των frames που το αποτελούν, καθώς και ο συνολικός αριθμός frames που συμμετείχαν στην κατάτμηση. Υπολογισμός: *grcarma*

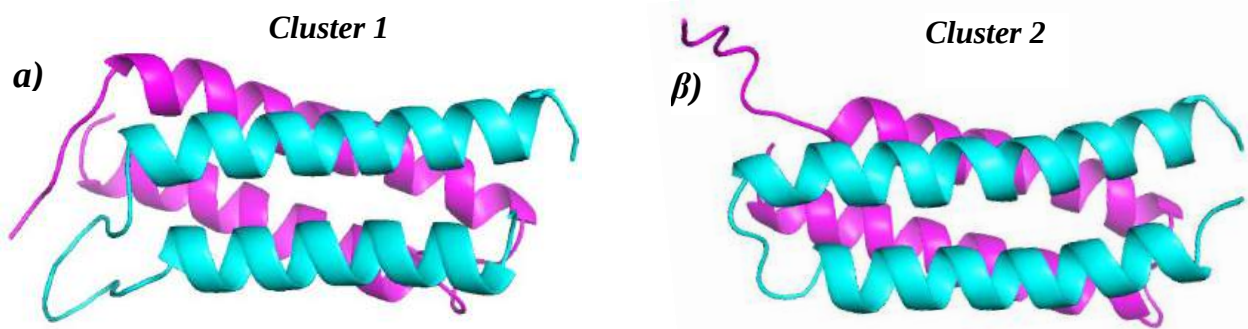
Αριθμός Cluster	Αριθμός Frames
Cluster 1	77.577
Cluster 2	7.672
Συνολικός Αριθμός Frames σε Clusters	85.249
Συνολικός Αριθμός Frames	212.431

Στις εικόνες 49 και 50 παρουσιάζονται τα τοπία πυκνότητας των κύριων συνιστωσών και οι αντιπροσωπευτικές δομές των δύο clusters αντίστοιχα. Αν και στις προβολές PC1 vs PC2, PC1 vs PC3 και PC2 vs PC3 φαίνονται πολλές κορυφές, αυτό δεν σημαίνει ότι υπάρχουν τόσες διαφορετικές δομές. Κάποιες από αυτές τις κορυφές οφείλονται στο πώς φαίνονται τα δεδομένα όταν προβάλλονται σε δύο διαστάσεις και δεν αντιστοιχούν σε πραγματικά ξεχωριστές καταστάσεις. Οι αντιπροσωπευτικές δομές, που αντιστοιχούν στα πιο χαρακτηριστικά frames κάθε cluster, απεικονίζουν ολόκληρη τη δομή της πρωτεΐνης, αλλά η διαφοροποίηση εντοπίζεται αποκλειστικά στη γεωμετρία της στροφής: στο cluster 1 είναι πιο «ανοιχτή», με τα κατάλοιπα να εκτείνονται περισσότερο στον χώρο, ενώ στο cluster 2 η στροφή είναι πιο συμπαγής και «κλειστή».

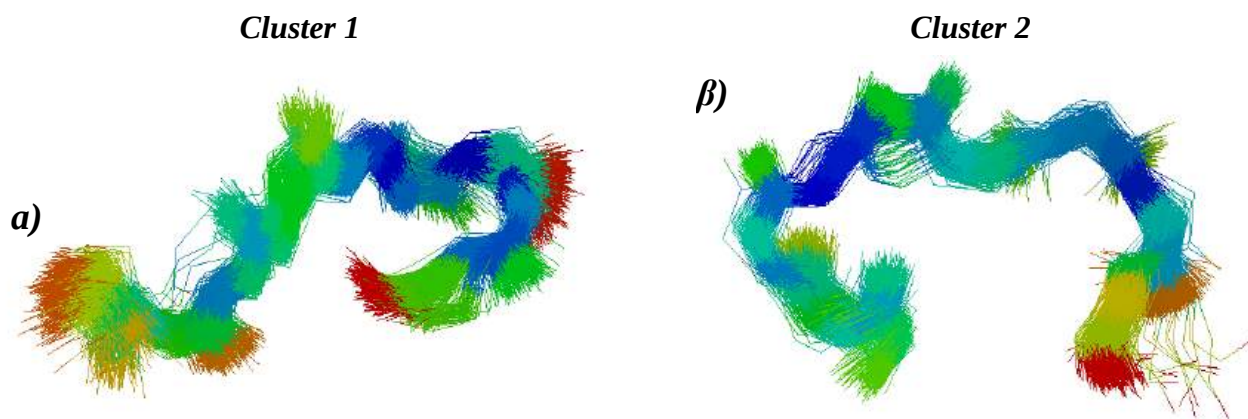
Παράλληλα, η εικόνα 51 παρουσιάζει την υπέρθεση των δομών των 2 clusters, εστιάζοντας στη στροφή της αλυσίδας Α (κατάλοιπα LEU26-GLN34, που απεικονίζονται από αριστερά προς τα δεξιά). Τα χρώματα ποικίλλουν από μπλε και πράσινο μέχρι πορτοκαλί και κόκκινο, υποδηλώνοντας διαφορετικά επίπεδα κινητικότητας στη στροφή. Η παρουσία αυτών των χρωματικών διαφοροποιήσεων δείχνει ότι η στροφή παρουσιάζει σημαντική δυναμική κίνηση, με περιοχές χαμηλής αλλά και υψηλής κινητικότητας



Εικόνα 49: Τοπία πυκνότητας που δείχνουν την κατανομή των *frames* της προσομοίωσης μετά από ανάλυση *dPCA* για τη στροφή της *A* αλυσίδας. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (*backbone*) της υποθετικής δομής της *Rop* με την μετάλλαξη *A31P*, με εξαίρεση τις ουρές. Οι μπλε περιοχές αντιστοιχούν στα 2 clusters. α) Τοπίο *PC1* vs *PC2*, β) Τοπίο *PC1* vs *PC3*, γ) Τοπίο *PC2* vs *PC3*. Υπολογισμός: *grcarma*



Εικόνα 50: Αναπαράσταση των αντιπροσωπευτικών δομών των 2 clusters που δημιουργήθηκαν από το dihedral PCA για τη στροφή της A αλυσίδας. Η A αλυσίδα της πρωτεΐνης Ror είναι χρωματισμένη με κυανό, ενώ η B αλυσίδα με ματζέντα. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (backbone) της υποθετικής δομής της Ror με την μετάλλαξη A31P, με εξαίρεση τις ουρές. Παρουσιάζονται οι δομές που εκπροσωπούν τα clusters: α) cluster 1, β) cluster 2. Υπολογισμός: grcarma. Δημιουργία: PyMOL.



Εικόνα 51: Αναπαράσταση δομών υπέρθεσης των 2 clusters που δημιουργήθηκαν από το dihedral PCA για τη στροφή της A αλυσίδας. Η χρωματική κωδικοποίηση δείχνει την κινητικότητα, από μπλε (χαμηλή) έως κόκκινο (υψηλή). Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (backbone) της υποθετικής δομής της Ror με την μετάλλαξη A31P, με εξαίρεση τις ουρές. Η στροφή περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 26 έως 34, τα οποία εμφανίζονται διατεταγμένα από αριστερά προς δεξιά. Παρουσιάζονται οι δομές που εκπροσωπούν τα clusters: α) cluster 1, β) cluster 2. Υπολογισμός: grcarma. Δημιουργία: RasMol.

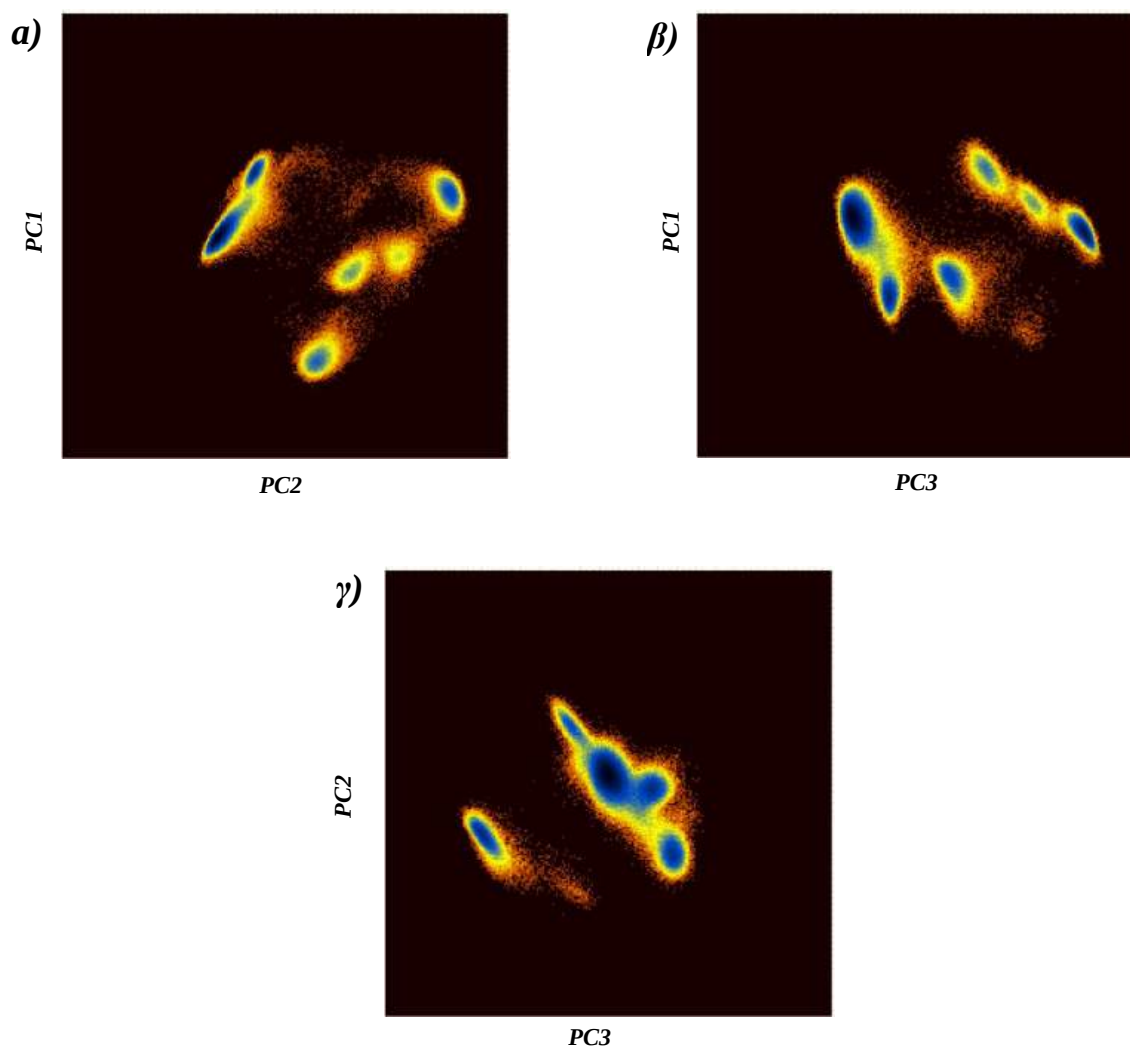
4.6.5. Dihedral PCA: Στροφή B αλυσίδας

Αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιήθηκε και για τη στροφή της αλυσίδας B, ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία. Ο πίνακας 8 παρουσιάζει την κατανομή των frames της προσομοίωσης σε τέσσερα clusters, όπως προέκυψαν από την ανάλυση dPCA, αποτυπώνοντας τη σχετική συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών διαμορφώσεων. Ο συνολικός αριθμός frames της προσομοίωσης ήταν 212.431, όμως μόνο 124.800 frames εντάχθηκαν στην κατάτμηση σε clusters.

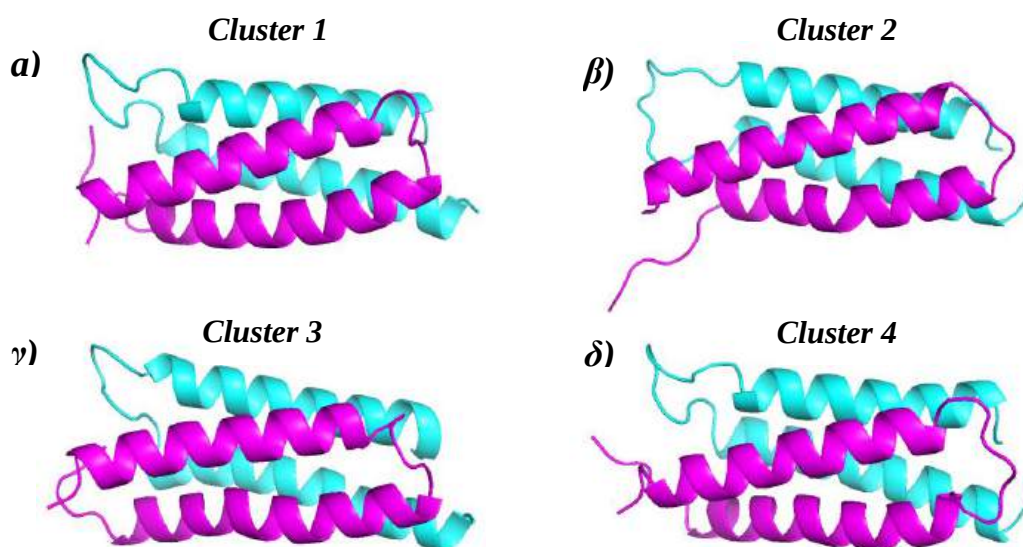
Πίνακας 8: Κατανομή των frames της προσομοίωσης 340K/006 στα 4 clusters που προέκυψαν από την ανάλυση dihedral PCA για τη στροφή της B αλυσίδας. Για κάθε cluster αναγράφεται ο αριθμός των frames που το αποτελούν, καθώς και ο συνολικός αριθμός frames που συμμετείχαν στην κατάτμηση. Υπολογισμός: $grcarma$

Αριθμός Cluster	Αριθμός Frames
Cluster 1	82.627
Cluster 2	18.309
Cluster 3	15.542
Cluster 4	8.322
Συνολικός Αριθμός Frames σε Clusters	124.800
Συνολικός Αριθμός Frames	212.431

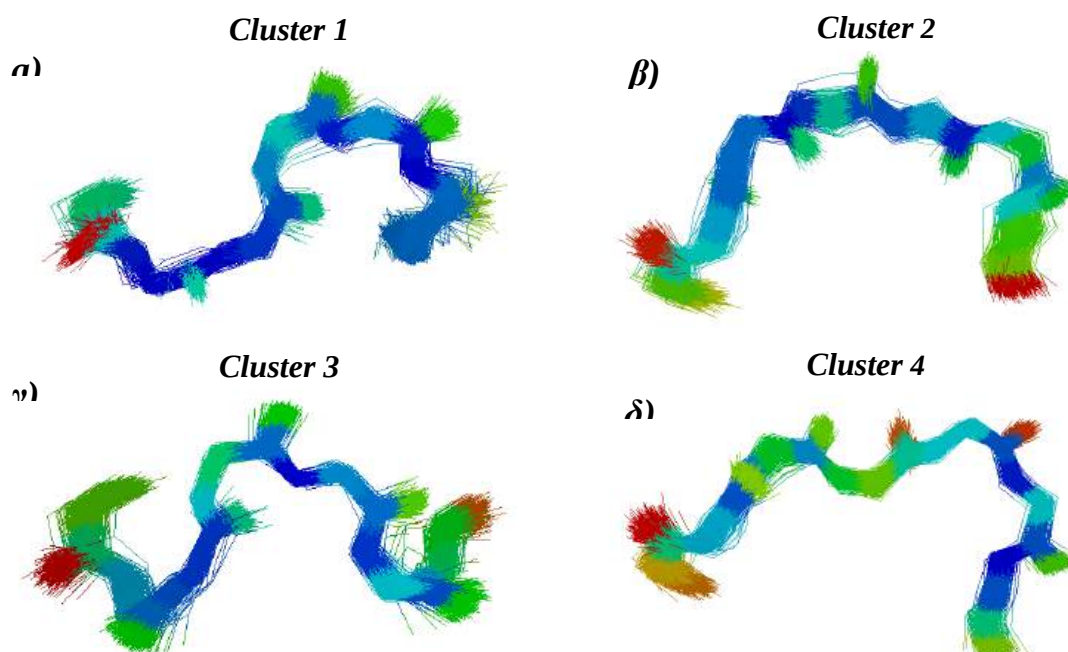
Η εικόνα 52 απεικονίζει τα τοπία πυκνότητας των τριών κύριων συνιστωσών της ανάλυσης dPCA για τη στροφή της αλυσίδας B, μαζί με την κατανομή των τεσσάρων clusters. Παρατηρούνται περισσότερες κορυφές από τον αριθμό των clusters, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις.



Εικόνα 52: Τοπία πυκνότητας που δείχνουν την κατανομή των frames της προσομοίωσης μετά από ανάλυση dPCA για τη στροφή της B αλυσίδας. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (backbone) της υποθετικής δομής της Rop με την μετάλλαξη A31P, με εξαίρεση τις ουρές. Οι μπλε περιοχές αντιστοιχούν στα 4 clusters. α) Τοπίο PC1 vs PC2, β) Τοπίο PC1 vs PC3, γ) Τοπίο PC2 vs PC3. Υπολογισμός: grcarma



Εικόνα 53: Αναπαράσταση των αντιπροσωπευτικών δομών των 2 clusters που δημιουργήθηκαν από το dihedral PCA για τη στροφή της B αλυσίδας. Η A αλυσίδα της πρωτεΐνης Ror είναι χρωματισμένη με κυανό, ενώ η B αλυσίδα με ματζέντα. Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (backbone) της υποθετικής δομής της Ror με την μετάλλαξη A31P, με εξαίρεση τις ουρές. Παρουσιάζονται οι δομές που εκπροσωπούν τα clusters: α) cluster 1, β) cluster 2 γ) cluster 3, δ) cluster 4. Υπολογισμός: grcarma. Δημιουργία: PyMOL.



Εικόνα 54: Αναπαράσταση δομών υπέρθεσης των 4 clusters που δημιουργήθηκαν από το dihedral PCA για τη στροφή της B αλυσίδας. Η χρωματική κωδικοποίηση δείχνει την κινητικότητα, από μπλε (χαμηλή) έως κόκκινο (υψηλή). Η ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας μόνο τα άτομα του σκελετού της πρωτεΐνης (backbone) της υποθετικής

δομής της Rop με την μετάλλαξη A31P, με εξαίρεση τις ουρές. Η στροφή περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 26 έως 34, τα οποία εμφανίζονται διατεταγμένα από αριστερά προς δεξιά. Παρουσιάζονται οι δομές που εκπροσωπούν τα clusters: α) cluster 1, β) cluster 2, γ) cluster 3, δ) cluster 4. Υπολογισμός: gcrarna. Δημιουργία: RasMol.

Η εικόνα 53 παρουσιάζει τις τέσσερις αντιπροσωπευτικές δομές που προέκυψαν από τα αντίστοιχα clusters της ανάλυσης dPCA. Στην απεικόνιση, η αλυσίδα B φαίνεται στο προσκήνιο, καθώς η στροφή της είναι το τμήμα που μελετάται σε αυτή την υποενότητα. Οι στροφές στις δομές εμφανίζουν γενικά παρόμοια διαμόρφωση, με εξαίρεση τις δομές στα clusters 2 και 4 (εικόνες 53β και 53δ), στις οποίες οι στροφές τους είναι πιο «ανοιχτές» σε σχέση με τις άλλες δύο.

Τέλος, στην εικόνα 54 παρουσιάζεται η υπέρθεση των τεσσάρων clusters, με χρήση θερμών και ψυχρών χρωμάτων για την απεικόνιση της τοπικής κινητικότητας. Σε σύγκριση με την αλυσίδα A, η στροφή της αλυσίδας B εμφανίζει κυρίως μπλε και πράσινα χρώματα, γεγονός που υποδηλώνει μεγαλύτερη σταθερότητα και μικρότερη κινητικότητα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.

4.6.6. Secondary Structure: Ολόκληρη Δομή

Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της δευτεροταγούς δομής της συνολικής πρωτεϊνικής δομής της Rop, όπως αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος gcrarna. Η αξιολόγηση της δομής βασίστηκε σε δύο τύπους αναπαράστασης: τα WebLogo γραφήματα και τα διαγράμματα STRIDE.

Αρχικά, τα WebLogo γραφήματα απεικονίζουν τη συχνότητα εμφάνισης κάθε τύπου δευτεροταγούς δομής σε κάθε κατάλοιπο της αλυσίδας, με βάση τις προβλέψεις που προέκυψαν από το gcrarna. Σε αυτά, η κάθε στήλη αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο κατάλοιπο, ενώ το ύψος και ο τύπος των γραμμάτων αντιπροσωπεύουν τη σχετική συχνότητα με την οποία το συγκεκριμένο είδος δομής εμφανίζεται σε εκείνη τη θέση. Η αναπαράσταση αυτή προσφέρει άμεση οπτική κατανόηση των

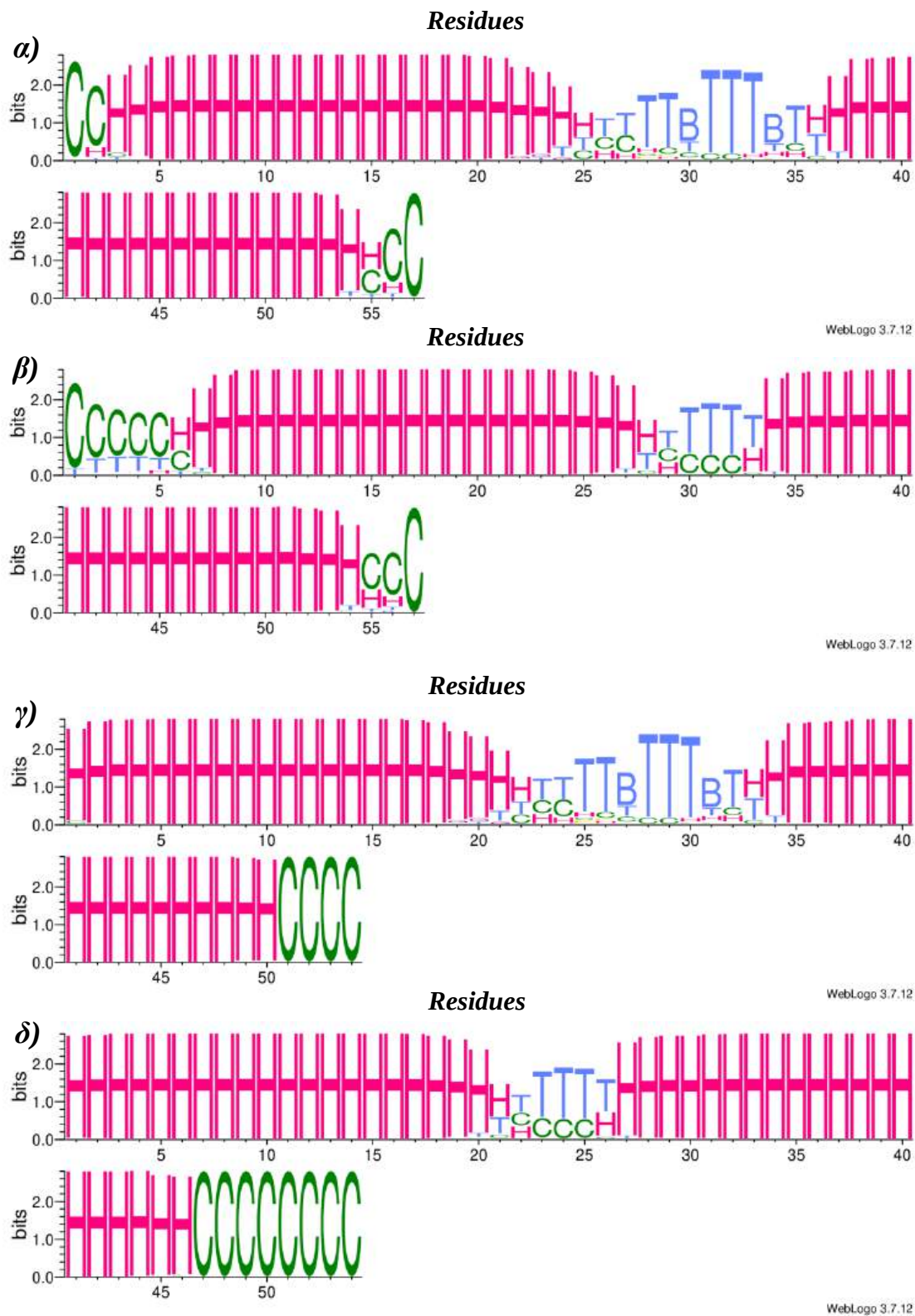
περιοχών υψηλής δομικής σταθερότητας. Τα γράμματα που εμφανίζονται στο WebLogo έχουν τον εξής συμβολισμό:

- H: α -έλικα (α -helix)
- G: 3_{10} έλικα
- C: τυχαίες ή μη καθορισμένες περιοχές (coil)
- T: στροφή
- B: β -φύλλο ή β -γέφυρα (β -bridge)

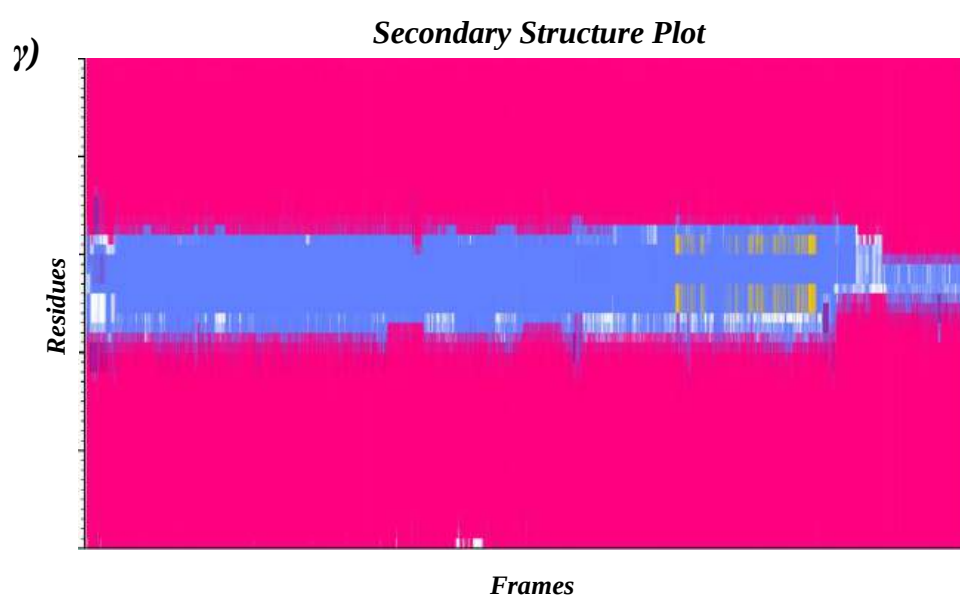
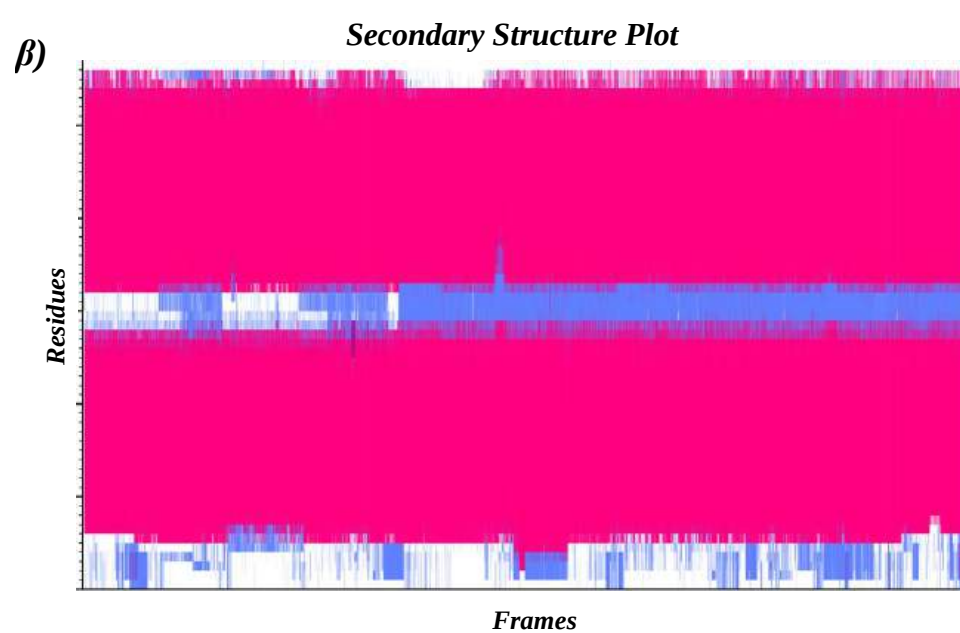
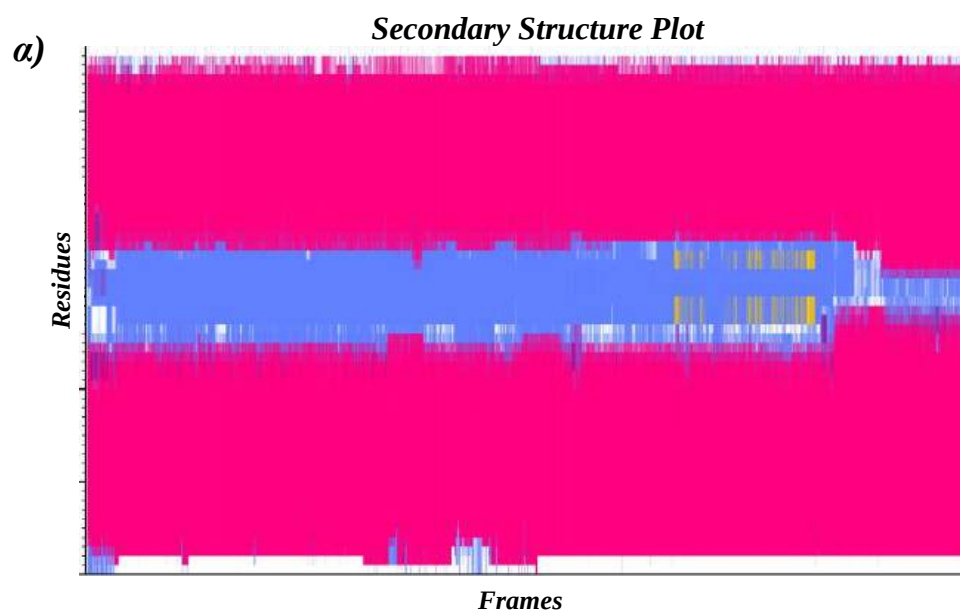
Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα διαγράμματα STRIDE, τα οποία παρέχουν μια εναλλακτική και πιο αναλυτική απεικόνιση της κατανομής των δευτεροταγών στοιχείων κατά μήκος της αλληλουχίας. Ο κατακόρυφος άξονας αντιστοιχεί στα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, ενώ ο οριζόντιος άξονας απεικονίζει τα διαδοχικά frames της προσομοίωσης. Κάθε σημείο του διαγράμματος δείχνει τον τύπο δευτεροταγούς δομής που παρατηρείται για ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο σε ένα συγκεκριμένο χρονικό frame. Ο χρωματικός κώδικας του διαγράμματος επιτρέπει την οπτική διάκριση των διαφόρων τύπων δευτεροταγούς δομής:

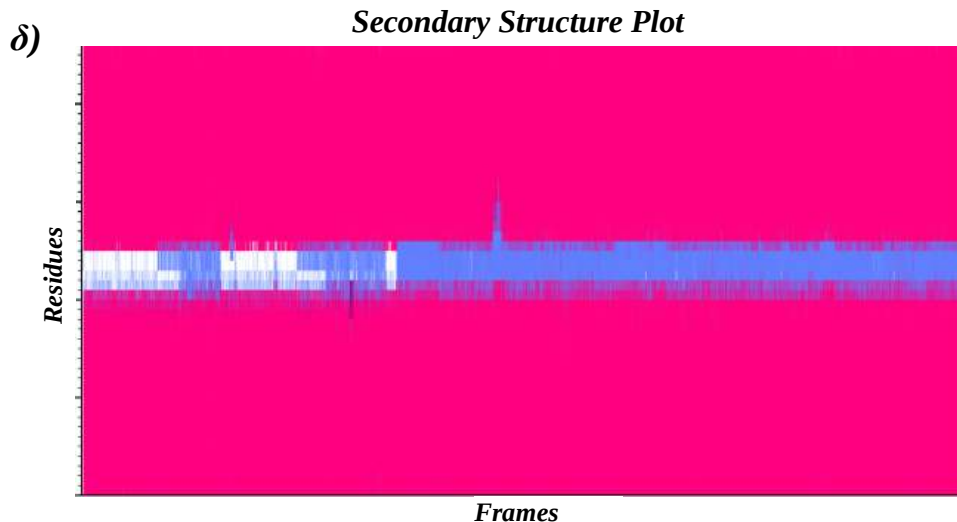
- Ροζ: α -έλικες
- Κίτρινο: β -φύλλα
- Μπλε: στροφές
- Άσπρο: τυχαίες ή μη καθορισμένες περιοχές
- Σκούρο μωβ: 3_{10} έλικες
- Μωβ: π -έλικες

Μέσω αυτής της αναπαράστασης είναι δυνατός ο εντοπισμός δομικά σταθερών περιοχών, όπου ο ίδιος τύπος δευτεροταγούς δομής διατηρείται σε πολλά διαδοχικά frames, αλλά και ευέλικτων τμημάτων της πρωτεΐνης που παρουσιάζουν μεταβολές στη δομή τους κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Εικόνα 55: Γραφήματα WebLogo για την ανάλυση δευτεροταγούς δομής της φυσιολογικής Ror πρωτεΐνης με την μετάλλαξη A31P. Παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών δευτεροταγών στοιχείων: α) A αλυσίδα με τα N- και C-τελικά άκρα, β) B αλυσίδα με τα άκρα, γ) A αλυσίδα χωρίς τα άκρα, δ) B αλυσίδα χωρίς τα άκρα. Οι δευτεροταγείς δομές απεικονίζονται με σύμβολα: H για α-έλικες, T για στροφές, B για βήτα-γέφυρα, G για 3_{10} έλικες και C για τυχαίες περιοχές (coils).





Εικόνα 56: Διαγράμματα δευτεροταγούς δομής της φυσιολογικής πρωτεΐνης Ror με την μετάλλαξη A31P, που δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα STRIDE. Στον κατακόρυφο άξονα απεικονίζονται τα κατάλοιπα (residues) της πρωτεΐνης και στον οριζόντιο τα frames της προσομοίωσης. α) Α αλυσίδα με τα N- και C-τελικά άκρα, β) Β αλυσίδα με τα άκρα, γ) Α αλυσίδα χωρίς τα άκρα, δ) Β αλυσίδα χωρίς τα άκρα. Τα χρώματα αντιστοιχούν σε διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής: ροζ για α-έλικες, μπλε για στροφές, μωβ για 3_{10} έλικες, σκούρο μωβ για π-έλικες, κίτρινο για β-φύλλα και άσπρο για τυχαίες περιοχές (coils).

Στην εικόνα 55 παρουσιάζονται τέσσερα WebLogo γραφήματα που αφορούν τη δευτεροταγή δομή των δύο αλυσίδων της πρωτεΐνης: α) η αλυσίδα Α με τα αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα, β) η αλυσίδα Β επίσης με τα άκρα, γ) η αλυσίδα Α χωρίς τα τελικά άκρα και δ) η αλυσίδα Β χωρίς τα άκρα.

Στα γραφήματα α και β παρατηρείται η παρουσία τυχαίων ή μη καθορισμένων δομών (C) κυρίως στις περιοχές των άκρων, κάτι που είναι αναμενόμενο, καθώς τα άκρα των αλυσίδων είναι συχνά πιο ευέλικτα και δομικά ασταθή.

Στο εσωτερικό της δομής, και στα τέσσερα γραφήματα, επικρατεί η παρουσία της α-έλικας (H), η οποία αποτελεί το βασικό δομικό στοιχείο της πρωτεΐνης, ενώ εμφανίζονται και οι στροφές (T) που συνδέουν τις α-έλικες της κάθε αλυσίδας. Στα γραφήματα α και γ, όπου απεικονίζεται η αλυσίδα Α, παρατηρείται επιπλέον η παρουσία του συμβόλου Β, γεγονός που ενδεχομένως υποδεικνύει ότι στην περιοχή της στροφής σχηματίζεται β-φύλλο μέσω β-γεφυρών, οι οποίες είναι δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν τις β δομές. Αντίθετα, στα γραφήματα της αλυσίδας Β, δεν παρατηρείται αντίστοιχη παρουσία β στοιχείων παρά μόνο στροφές, γεγονός που

υποδηλώνει διαφοροποίηση στη δευτεροταγή δομή μεταξύ των στροφών των δύο αλυσίδων.

Στην *εικόνα 56* παρουσιάζονται τέσσερα διαγράμματα STRIDE, τα οποία απεικονίζουν τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης: α) η αλυσίδα A με τα αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα, β) η αλυσίδα B επίσης με τα άκρα, γ) η αλυσίδα A χωρίς τα άκρα, και δ) η αλυσίδα B χωρίς τα τελικά άκρα.

Από την ανάλυση προκύπτει ότι κυριαρχεί η παρουσία ροζ περιοχών, οι οποίες αντιστοιχούν σε α-έλικες, επιβεβαιώνοντας ότι το συγκεκριμένο δομικό στοιχείο αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό της αλυσίδας αυτής. Επιπλέον, παρατηρούνται μπλε περιοχές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν στροφές (turns) και υποδεικνύουν τα σημεία όπου η πολυπεπτιδική αλυσίδα αλλάζει κατεύθυνση. Στα άκρα της αλυσίδας (*εικόνα 55α και 55β*) εμφανίζονται λευκές περιοχές, που αντιστοιχούν σε μη δομημένα ή λιγότερο σταθερά τμήματα, χωρίς χαρακτηριστικά δευτεροταγούς δομής, κάτι που είναι σύνηθες στα τελικά άκρα των πρωτεϊνικών αλυσίδων.

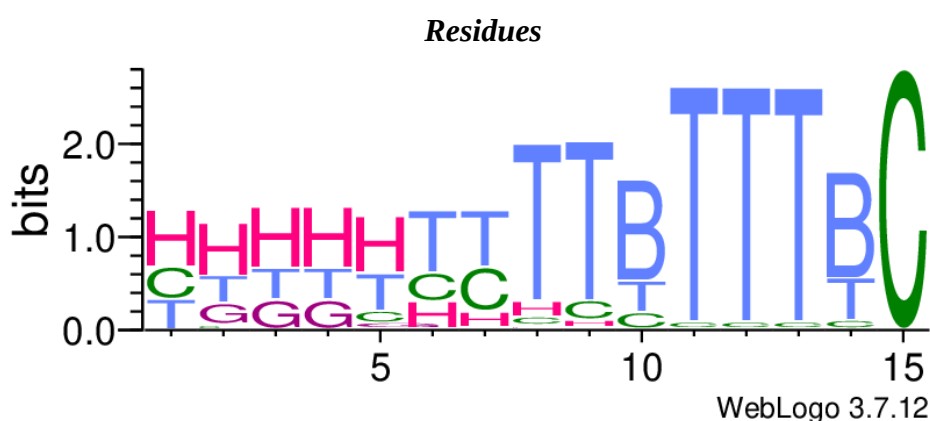
4.6.7. Secondary Structure: Στροφή A αλυσίδας

Για τη στροφή A εφαρμόστηκαν οι ίδιες αναλυτικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν και για ολόκληρη τη δομή, με σκοπό την αποσαφήνιση των χαρακτηριστικών της δευτεροταγούς δομής στην τοπική αυτή περιοχή. Τα κατάλοιπα που επιλέχθηκαν για αυτή την ανάλυση περιλαμβάνουν την περιοχή από τη θρεονίνη 21 έως και την αλανίνη 35.

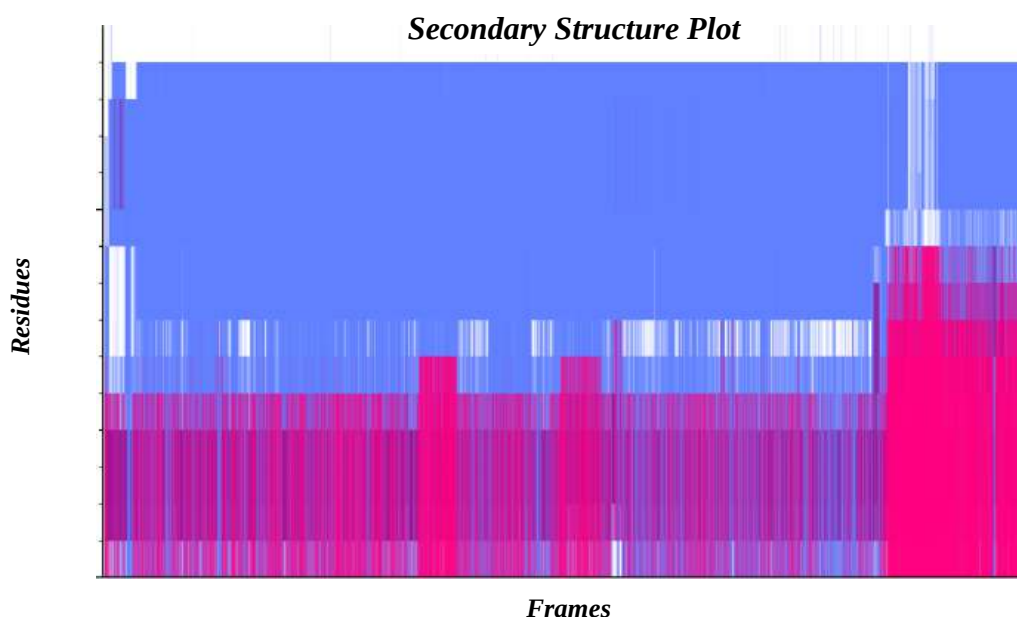
Παρακάτω παρουσιάζονται το γράφημα WebLogo (*εικόνα 57*) που απεικονίζει τα δευτεροταγή στοιχεία της στροφής, καθώς και το διάγραμμα STRIDE (*εικόνα 58*), το οποίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κατανομή και τον τύπο των δομικών στοιχείων στην εν λόγω περιοχή.

Με βάση τις *εικόνες 57 και 58*, και λαμβάνοντας υπόψη τόσο την κωδικοποίηση των γραμμάτων όσο και τη χρωματική απεικόνιση στο γράφημα WebLogo και διάγραμμα STRIDE αντίστοιχα, προκύπτει ότι η στροφή A υιοθετεί δομή τύπου β-φύλλου, η οποία σταθεροποιείται μέσω β-γεφυρών. Αυτό

επιβεβαιώνεται από την παρουσία γραμμάτων "T" και "B" στο WebLogo (που αντιστοιχούν σε στροφή και β-γέφυρα αντίστοιχα), καθώς και από την κυριαρχία μπλε χρωματισμών στο STRIDE, το οποίο είναι χαρακτηριστικό των στροφών. Επιπλέον, πριν από τη στροφή παρατηρείται η παρουσία του γράμματος "H", που αντιστοιχεί σε έλικα, ενώ μετά τη στροφή κυριαρχεί το γράμμα "C", το οποίο αντιπροσωπεύει τυχαίες περιοχές (στο γράφημα WebLogo εμφανίζονται με ροζ χρώμα οι έλικες και με άσπρο οι τυχαίες περιοχές αντίστοιχα).



Εικόνα 57: Γράφημα WebLogo για την ανάλυση δευτεροταγούς δομής της στροφής από την αλυσίδα A της φυσιολογικής Rop πρωτεΐνης με την μετάλλαξη A31P. Παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών δευτεροταγών στοιχείων. Οι δευτεροταγείς δομές απεικονίζονται με σύμβολα: H για α-έλικες, T για στροφές, B για βήτα-γέφυρα, G για 310 έλικες και C για τυχαίες περιοχές (coils).

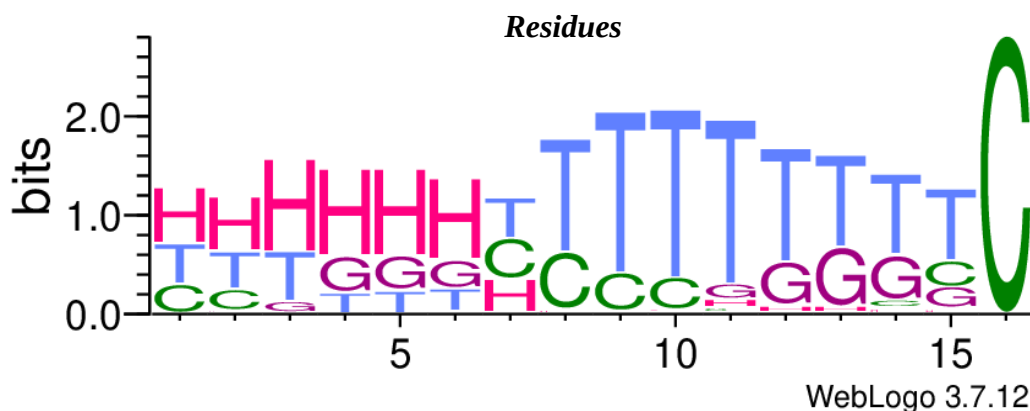


Εικόνα 58: Διάγραμμα δευτεροταγούς δομής της στροφής από την αλυσίδα A της φυσιολογικής πρωτεΐνης Ror με την μετάλλαξη A31P, που δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα STRIDE. Στον κατακόρυφο άξονα απεικονίζονται τα κατάλοιπα (residues) της πρωτεΐνης και στον οριζόντιο τα frames της προσομοίωσης. Τα χρώματα αντιστοιχούν σε διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής: ροζ για α-έλικες, μπλε για στροφές, μωβ για 310 έλικες, σκούρο μωβ για π-έλικες, κίτρινο για β-φύλλα και άσπρο για τυχαίες περιοχές (coils).

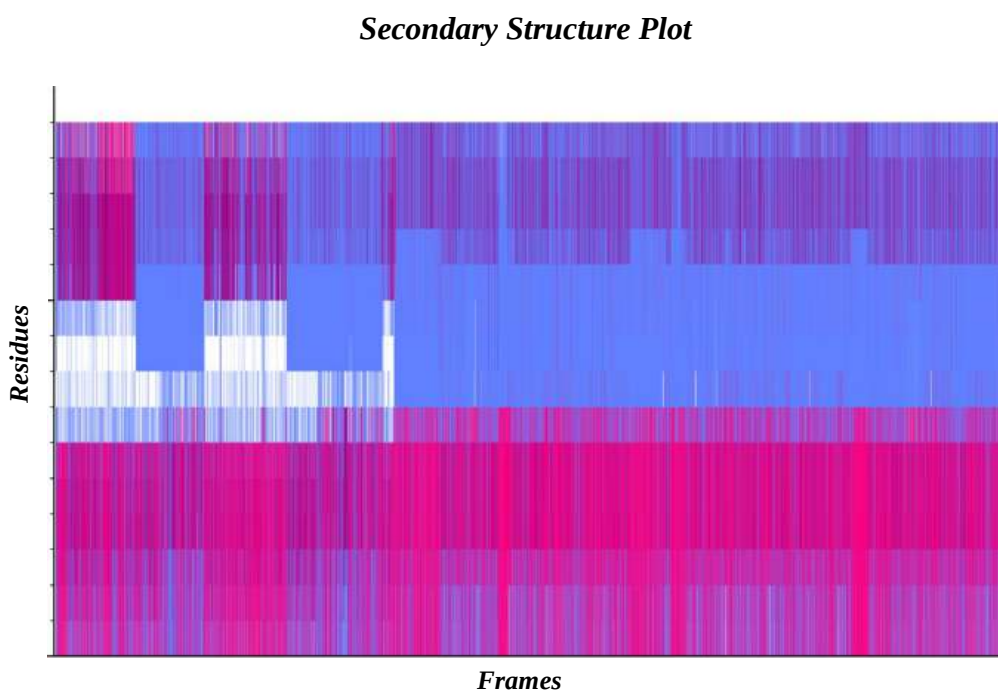
4.6.8. Secondary Structure: Στροφή B αλυσίδας

Η τελευταία ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας αφορούσε τη δευτεροταγή δομή της στροφής της β αλυσίδας. Ακολουθήθηκαν αντίστοιχες διαδικασίες με αυτές των προηγούμενων αναλύσεων, αξιοποιώντας τα εργαλεία WebLogo και STRIDE, προκειμένου να χαρτογραφηθούν και να ερμηνευτούν τα δομικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης περιοχής. Για την ανάλυση αυτή επιλέχθηκε η περιοχή που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα από τη λευκίνη 23 έως και την κυστεΐνη 38. Παρακάτω παρουσιάζονται το γράφημα WebLogo (εικόνα 59) και το διάγραμμα STRIDE (εικόνα 60).

Από το γράφημα WebLogo διακρίνεται καθαρά το γράμμα T και το ύψος του, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία στροφής στην περιοχή αυτή. Σε αντίθεση με τη στροφή της Α αλυσίδας, δεν παρατηρείται σχηματισμός β-φύλλου. Στο διάγραμμα STRIDE, κυριαρχεί το μπλε χρώμα, το οποίο αντιστοιχεί στην ύπαρξη στροφών, επιβεβαιώνοντας έτσι τα ευρήματα του WebLogo. Επιπλέον, πριν από τη στροφή παρατηρείται το γράμμα "H", που υποδηλώνει την παρουσία ελικοειδούς δομής, ενώ μετά τη στροφή εμφανίζεται το γράμμα "C", το οποίο αντιστοιχεί σε τυχαίες περιοχές της δευτεροταγούς δομής.



Εικόνα 59: Γράφημα WebLogo για την ανάλυση δευτεροταγούς δομής της στροφής από την αλυσίδα B της φυσιολογικής Ror πρωτεΐνης με την μετάλλαξη A31P. Παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών δευτεροταγών στοιχείων. Οι δευτεροταγείς δομές απεικονίζονται με σύμβολα: H για α-έλικες, T για στροφές, B για βήτα-γέφυρα, G για 310 έλικες και C για τυχαίες περιοχές (coils).



Εικόνα 60: Διάγραμμα δευτεροταγούς δομής της στροφής από την αλυσίδα B της φυσιολογικής πρωτεΐνης Ror με την μετάλλαξη A31P, που δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα STRIDE. Στον κατακόρυφο άξονα απεικονίζονται τα κατάλοιπα (residues) της πρωτεΐνης και στον οριζόντιο τα frames της προσομοίωσης. Τα χρώματα αντιστοιχούν σε διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής: ροζ για α-έλικες, μπλε για στροφές, μωβ για 310 έλικες, σκούρο μωβ για π-έλικες, κίτρινο για β-φύλλα και άσπρο για τυχαίες περιοχές (coils).

5. Συμπεράσματα

Βασικός στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο η μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης Rop, στην οποία έχει εισαχθεί η μετάλλαξη A31P, είναι πιθανό να οδηγηθεί σε πλήρη αποδιάταξη. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν συνολικά 90 προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες και αναλύσεις της δομής σε χαρακτηριστικά στιγμιότυπα, ώστε να καταγραφεί η συμπεριφορά της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης σε βάθος χρόνου.

Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων έδειξαν σταθερά ότι η πρωτεΐνη, αντί να αποδιπλώνεται περαιτέρω, τείνει να επαναδιπλώνεται σταδιακά προς τη φυσιολογική ελικοειδή μορφή της. Η γενική συμπεριφορά του συστήματος υποδεικνύει ότι, παρά την παρουσία της προλίνης στη θέση 31, ενός κατάλοιπου γνωστού για την ικανότητά του να διαταράσσει τις α -έλικες, δεν παρατηρήθηκε πλήρης αποδίπλωση της δομής. Αντίθετα, η αναδίπλωση στην αρχική δομή ήταν το κυρίαρχο φαινόμενο.

Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρήθηκαν στιγμές με σημαντική αποδιοργάνωση στη στροφή της Α αλυσίδας, ωστόσο αυτά τα φαινόμενα ήταν προσωρινά και δεν οδήγησαν σε συνολική αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Η εμφάνιση αυτών των περιστατικών ερμηνεύεται καλύτερα μέσα από το πλαίσιο της στοχαστικής φύσης της αποδίπλωσης, όπως υποστηρίζεται και στη σχετική βιβλιογραφία [9], όπου αναφέρεται ότι σε ορισμένες χρονικές στιγμές μπορεί τυχαία να διεισδύσουν μόρια νερού σε κρίσιμα σημεία της δομής, προκαλώντας μερική αποδιάταξη. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα από τις 90 προσομοιώσεις υποδεικνύουν με σαφήνεια ότι τέτοια φαινόμενα είναι σχετικά σπάνια και από μόνα τους δεν αρκούν για να προκαλέσουν πλήρη αποδιάταξη, τουλάχιστον όταν ξεκινάμε από την εξεταζόμενη μερικώς ξεδιπλωμένη μορφή.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προλίνη στη θέση 31 δεν «συνεργάζεται» με την αναδίπλωση της Rop στην φυσιολογική της μορφή. Με άλλα λόγια, η παρουσία της δεν είναι συμβατή με τη φυσιολογική αναδίπλωση της πρωτεΐνης, και γι' αυτό η παρούσα εργασία δεν παρέχει ξεκάθαρη εξήγηση για τη ρίζα αυτής της ασυμβατότητας. Η προλίνη φαίνεται να εμποδίζει την πλήρη επαναφορά στην κανονική δομή, χωρίς όμως να οδηγεί σε ολική κατάρρευση.

6. Βιβλιογραφία

- [1] Banner D.W., Kokkinidis M., Tsernoglou D. (1987). Structure of the ColE1 Rop protein at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 196(3):657–675. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90039-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90039-8)
- [2] Castagnoli L., Vetriani C. (1989). Genetic and structural analysis of the ColE1 Rop (Rom) protein. *The EMBO Journal*. 8(2):621–629. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03417.x>
- [3] Branden C., Tooze J. (1999). Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών. 2η Έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
- [4] Amprazi M., Fellas G. (2008). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a variant of the ColE1 Rop protein. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 64(5):432–434. <https://doi.org/10.1107/S1744309108011342>
- [5] Shukla R.T., Baliga C. (2013). The role of loop closure propensity in the refolding of Rop protein probed by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 40:10–21. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2012.12.002>
- [6] Nagi A.D., Regan L. (1997). An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein. *Folding and Design*. 2(1):67–75. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(97\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(97)00008-7)
- [7] Amprazi M., Kotsifaki D. (2014). Structural plasticity of 4- α -helical bundles exemplified by the puzzle-like molecular assembly of the Rop protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(30):11049–11054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322065111>
- [8] Glykos N.M., Papanikolau Y. (2013). Loopless Rop: Structure and dynamics of an engineered homotetrameric variant of the Repressor of Primer protein. *Protein Science*. 22(8):1062–1074. <https://doi.org/10.1002/pro.2282>

- [9] Vouzina O.-D., Tafanidis A., Glykos N.M. (2024). The curious case of A31P, a topology-switching mutant of the Repressor of Primer protein: A molecular dynamics study of its folding and misfolding. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 64:6081–6091.
- [10] Peters K., Hinz H.J., Cesareni G. (1997). Introduction of a Proline Residue into Position 31 of the Loop of the Dimeric 4- α -Helical Protein ROP Causes a Drastic Destabilization. *Biological Chemistry*. 378(10):1141–1145. <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.10.1141>
- [11] Glykos N.M., Cesareni G. (1999). Protein plasticity to the extreme: Changing the topology of a 4- α -helical bundle with a single amino acid substitution. *Structure*. 7(6):663–672. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80081-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80081-1)
- [12] Karplus M., Petsko G.A. (1990). Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*. 347(6294):631–639. <https://doi.org/10.1038/347631a0>
- [13] Allen M.P. (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. In: Attig N., Binder K., Grubmüller H., Kremer K. (eds) *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*. NIC Series, vol 23, pp. 1–28. John von Neumann Institute for Computing
- [14] Monticelli L., Tieleman D.P. (2013). Force Fields for Classical Molecular Dynamics. In: Monticelli L., Salonen E. (eds) *Biomolecular Simulations*. Methods in Molecular Biology, vol 924. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_8
- [15] Binder, K., Horbach, J., Kob, W., Paul, W., & Varnik, F. (2004). Molecular dynamics simulations. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16(5), S429–S453. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/16/5/006>
- [16] Hollingsworth S.A., Dror R.O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*. 99(6):1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- [17] Durrant J.D., McCammon J.A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71>

- [18] Georgoulia, P. S., & Glykos, N. M. (2019). Molecular simulation of peptides coming of age: Accurate prediction of folding, dynamics and structures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 664, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.033>
- [19] GROMACS Development Team. (2025) System Preparation — GROMACS User Guide. Available at: <https://manual.gromacs.org/current/user-guide/system-preparation.html>
- [20] Lindorff-Larsen K., & Piana S. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8), 1950–1958. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>
- [21] Lemkul J.A. (2024). Introductory Tutorials for Simulating Protein Dynamics with GROMACS. *Journal of Physical Chemistry B*. 128(39):9418–9435. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.4c04901>
- [22] Makarewicz T., Kaźmierkiewicz R. (2013). Molecular Dynamics Simulation by GROMACS Using GUI Plugin for PyMOL. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 53(5):1057–1063. <https://doi.org/10.1021/ci400071x>
- [23] Sargsyan K., Grauffel C., Lim C. (2017). How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 13(4):1518–1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00028>
- [24] Maiorov V.N., Crippen G.M. (1994). Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *Journal of Molecular Biology*. 235(2):625–634. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1017>
- [25] Glykos N. (2017). Home – plot – Utopia. Available at: <https://utopia.duth.gr/glykos/plot/>
- [26] Predki, P. F., Agrawal, V., Brünger, A. T., & Regan, L. (1996). Amino-acid substitutions in a surface turn modulate protein stability. *Nature Structural Biology*, 3(1), 54–58. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-54>

- [27] Rosignoli, S. & Paiardini, A. (2022). *Boosting the Full Potential of PyMOL with Structural Biology Plugins*. *Biomolecules*, 12(12), 1764. <https://doi.org/10.3390/biom12121764>
- [28] Gupta, S. K., & Gupta, P. (2021). Anaglyph stereo virtual dissection: A novel inexpensive method for stereoscopic visualisation of intracardiac anatomy on CT angiogram. *Cardiology in the Young*, 31(10), 1641–1644. <https://doi.org/10.1017/S1047951121001323>
- [29] Oliveira, S. H. P., Ferraz, F. A. N., Honorato, R. V., Xavier-Neto, J., Sobreira, T. J. P., & de Oliveira, P. S. L. (2014). *KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin*. *BMC Bioinformatics*, 15, 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-197>
- [30] Koukos, P. I., & Glykos, N. M. (2013). Grcarma: A fully automated task-oriented interface for the analysis of molecular dynamics trajectories. *Journal of Computational Chemistry, Software News and Updates*, 34(26), 2310–2312. <https://doi.org/10.1002/jcc.23381>
- [31] Glykos, N. M. (2006). Carma: A molecular dynamics analysis program. *Journal of Computational Chemistry*, 27(14), 1765–1768. <https://doi.org/10.1002/jcc.20482>
- [32] Pikora, M., & Gieldon, A. (2015). RASMOL AB - new functionalities in the program for structure analysis. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 737-740. https://doi.org/10.18388/abp.2015_972
- [33] Frishman, D. (2004). STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server). <https://doi.org/10.1093/nar/gkh429>
- [34] Crooks, Gavin E., & USDOE. (2003). WebLogo [Computer software]. <https://doi.org/10.11578/dc.20210416.8>