

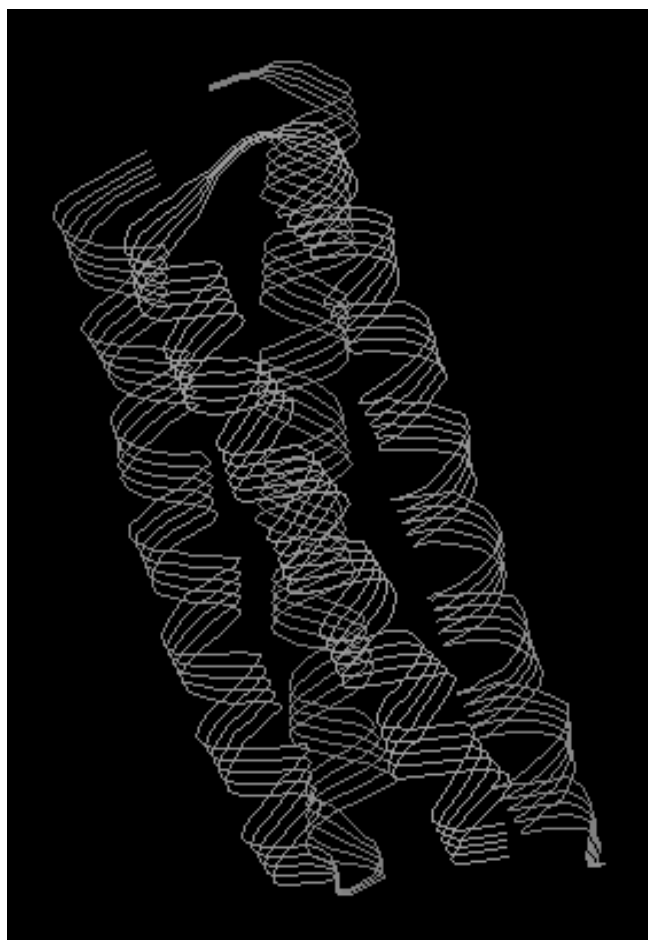


ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ROP ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Αικατερίνη Δ. Πουγούνια
ΑΕΜ: -162-



Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Μ. Γλυκός
Λέκτορας Μ.Β.Γ.

Αλεξανδρούπολη, Οκτώβριος 2007.



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ROP ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Αικατερίνη Δ. Πουγούνια
ΑΕΜ: -162-

Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Μ. Γλυκός
Λέκτορας Μ.Β.Γ.

Αλεξανδρούπολη, Οκτώβριος 2007.

Περίληψη

Η Rop είναι μία μικρή πρωτεΐνη τεσσάρων ελίκων που προσδένει RNA και αποτελεί ένα εξαιρετικό σύστημα-μοντέλο για τη μελέτη της πρωτεϊνικής δομής και αναδίπλωσης. Η δυναμική της φυσικής Rop χαρακτηρίστηκε με την ανάλυση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής δύο εκτεταμένων και ανεξάρτητων τροχιακών και τη μεταξύ τους σύγκριση. Οι προσομοιώσεις είναι NpT, διάρκειας 10ns και εκτελούνται σε περιοδικές οριακές συνθήκες.

Abstract

Rop is a small 4- α -helical RNA-binding protein that provides an excellent model system for the study of protein structure and folding. The dynamics of the natural Rop protein are characterized by the analysis of two molecular dynamics simulations of two long and independent trajectories and their inbetween comparison. The simulations are NpT, 10ns long and are performed in periodic boundary conditions.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να χαρίσω το μεγαλύτερό μου ευχαριστώ στους γονείς μου και την υπόλοιπη οικογένειά μου για την αγάπη και την υποστήριξή τους. Επίσης ιδιαίτερες και θερμές ευχαριστίες στους: Νατάσα Φίλη, Νίκο Πουγούνια, Δημήτρη Παλιτσκάρη, Δημήτρη Νασιόπουλο, Γιώργο Τριχόπουλο και Kamsot, για τις πολύτιμες τεχνικές συμβουλές τους. Και φυσικά στον επιβλέπων καθηγητή μου Κο Νικόλαο Γλυκό για την άριστη συνεργασία και την κατανόησή του.

«Art is the lie that helps
tell the truth.»

Pablo Picasso

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή	11
Πρωτεΐνη Rop (Repressor of primer) του πλασμιδίου ColE1	11
Δομή	11
Λειτουργία	12
Αλληλεπίδραση με RNA	13
Η Rop ως μοντέλο πρωτεϊνικής αναδίπλωσης	13
Στόχος	16
2. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής	17
Μοντέλο απεικόνισης και οριοθέτηση του συστήματος	17
Υπολογισμός ενέργειας συστήματος	17
Εξίσωση κίνησης	17
Δυναμικά Πεδία	18
Αλγόριθμοι ολοκλήρωσης.....	19
Αρχικές συντεταγμένες.....	19
Εύρος κινήσεων	19
Περιοδικές Οριακές συνθήκες	20
Η μέθοδος Particle Mesh Ewald (PME)	20
Δυναμικά Langevin	21
Πιστότητα αναπαράστασης	22
Εφαρμογές	22
3. Προσομοιώσεις	24
Προετοιμασία συστήματος	24
Προσομοίωση	25
Παράμετροι προσομοίωσης.....	25
Ελαχιστοποίηση ενέργειας	27
Προθέρμανση	27
Εξισορρόπηση.....	27
Παραγωγή	28
4. Ανάλυση	29
Ανάλυση των προσομοιώσεων 1 & 2	29
Σταθερότητα αρχικής δομής.....	29
Υπολογισμός μέσης δομής και σταθερότητα δομών του τροχιακού.....	33
Ατομικές διακυμάνσεις	40
Χάρτης μέσης CA-CA απόστασης και rms από αυτό	44
Ανάλυση cross-correlation.....	47
Principal Component Analysis	51
Ανάλυση κινητικότητας πλευρικών ομάδων.....	59
Σύγκριση των δύο προσομοιώσεων	66
Σύγκριση σταθερότητας αρχικής δομής & δομών τροχιακού ..	66
Σύγκριση των δομικών αλλαγών από την αρχική δομή.....	70
Σύγκριση της κατανομής των στροφομερών	70

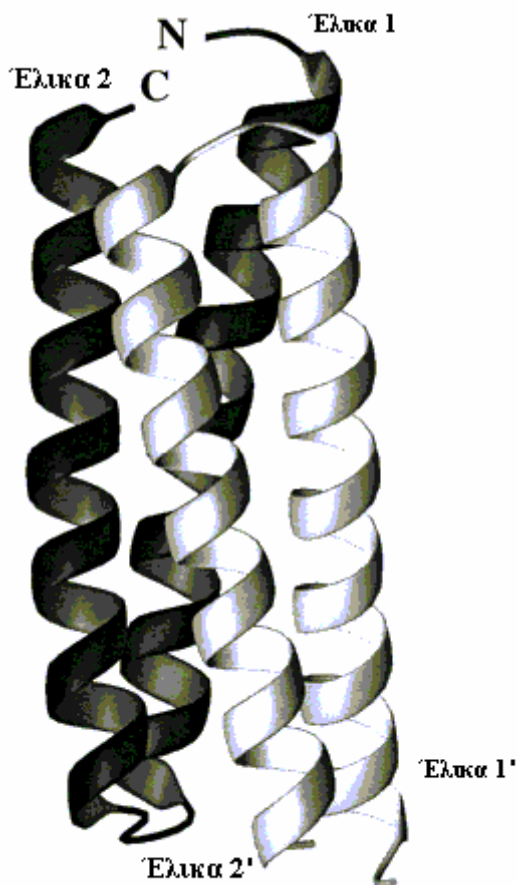
Σύγκριση της cross-correlation	73
Σύγκριση του χάρτη απόστασης CA-CA RMSD	73
Σύγκριση των ατομικών διακυμάνσεων	74
Σύγκριση της μέσης δομής	75
5. Συζήτηση	76
Αναφορές	77
Παράρτημα	83

Εισαγωγή

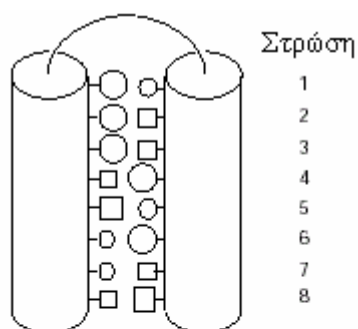
Πρωτεΐνη Rop (Repressor of primer) του πλασμιδίου ColE1¹

Δομή

Το μόριο της Rop ή αλλιώς Rom (RNA One Modulator) έχει σχήμα κυλινδρικό με μήκος περίπου 45Å και ακτίνα γύρω στα 12.5Å (Σχ.1). Είναι ένα ομοδιμερές και διαθέτει διπλό άξονα συμμετρίας. Κάθε μονομερές αποτελείται από δύο έλικες (έλικα 1/1': αμινοξέα 1-30, έλικα 2/2': αμινοξέα 32-56) (3.5 κατάλοιπα ανά στροφή έλικας) που συνδέονται με μία στροφή φουρκέτας γύρω από το κατάλοιπο 31A (έλικα-στροφή-έλικα). Τα δύο μονομερή συνδέονται στο διμερές φτιάχνοντας ένα δεμάτιο σπειραμένου σπειράματος τεσσάρων ελίκων πακεταρισμένων αντιπαράλληλα, που συνδέονται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [3,6,17].



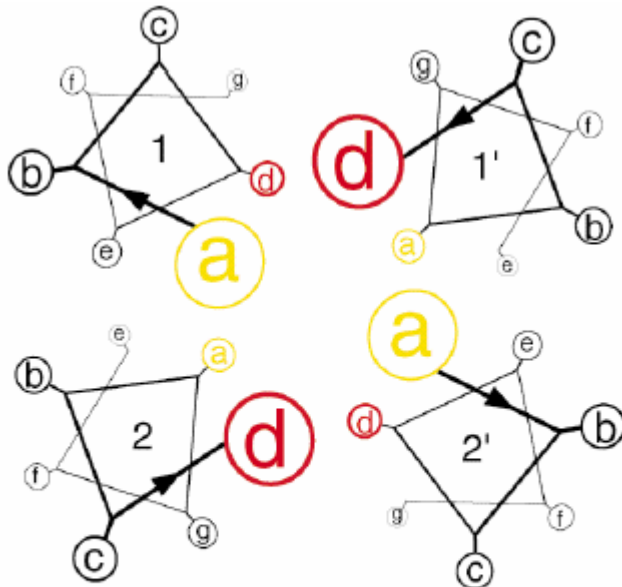
Σχ.1 Τρισδιάστατη δομή ακτίνων-X της Rop (πρόγραμμα MOLMOL).



Σχ.2 Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της Rop που δείχνει το μοτίβο των πλευρικών αλυσίδων στις οκτώ στρώσεις του πυρήνα. Οι μεγάλοι κύκλοι αναπαριστούν τις Leu, οι μικροί κύκλοι της Ala, τα μεγάλα τετράγωνα αναπαριστούν μεγάλες πλευρικές αλυσίδες εκτός από Leu και τα μικρά τετράγωνα μικρές πλευρικές αλυσίδες εκτός από Ala.

Όπως στις περισσότερες πρωτεΐνες σπειραμένου σπειράματος έτσι και στην αλληλουχία της Rop παρατηρείται μια επαναλαμβανόμενη «επτάδα» καταλοίπων, που αντιστοιχεί σε δύο ολόκληρες στροφές έλικας [10,55]. Τα κατάλοιπα χαρακτηρίζονται α-γ, όπου η θέση f είναι η πιο εκτεθειμένη στο διαλύτη

¹ Άλλα δύο μόρια Rop είναι γνωστά, του πλασμιδίου pMB1 (11 αλλαγές βάσης) και του πλασμιδίου ColK (4 αμινοξικές αλλαγές) [3].



Σχ.3 Απεικόνιση μιας στρώσης του τετραμερούς της Rop. Φαίνονται οι επαναλήψεις "επτάδας" και οι θέσεις των κατάλοιπων *a* και *d* που σχηματίζουν τον υδροφοβικό πυρήνα. Αναπαράγεται άνευ αδείας από τους Paliakasis C.D., Kokkánidis M. [55].

2 και 2' είναι πλούσια σε αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα, ενώ η όψη που σχηματίζεται από τις έλικες 1 και 1' είναι θετικά φορτισμένη στα άκρα και ουδέτερη στο κέντρο [60].

Ο υδροφοβός πυρήνας της Rop σχηματίζεται από οκτώ στρώσεις πλευρικών αλυσίδων (Σχ.2)· κάθε στιβάδα αποτελείται από δύο *a* και δύο *d* κατάλοιπα (Σχ.3). Οι θέσεις *a* τείνουν να έχουν μικρά κατάλοιπα (Ala, Cys, Ser ή Thr) και οι θέσεις *d* μεγάλα κατάλοιπα (Leu ή Ile) [3,55]. Το πακετάρισμα των 4-α ελικοειδών δεματίων στον υδροφοβικό πυρήνα φαίνεται να είναι κρίσιμο για τη σταθεροποίηση της πρωτεϊνικής δομής και την πρωτεϊνική αναδίπλωση [68].

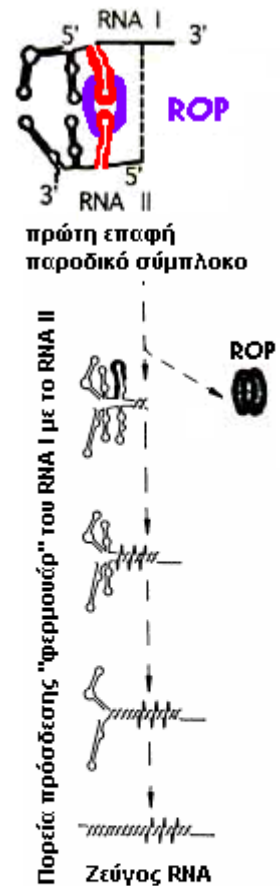
Λειτουργία

Η Rop συμμετέχει στο ρυθμιστικό μηχανισμό που ελέγχει τον αριθμό αντιγράφων του πλασμιδίου ColE1 [1,32,58]. Ο έλεγχος επιτυγχάνεται με την αρνητική ρύθμιση της συχνότητας των γεγονότων έναρξης της αντιγραφής, μέσω της αλληλεπίδρασης δύο μορίων RNA, των RNAI και RNAII, και της Rop.

Το RNAII σχηματίζει ένα υβρίδιο με το DNA κοντά στη θέση έναρξης της αντιγραφής (*ori*), απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής του DNA [6]. Η Rop αλληλεπιδρά με τις δομές στελέχους των RNAI και RNAII (Σχ.4) και δρα ως ένας προσαρμογέας που προσανατολίζει σωστά και σταθεροποιεί τις συμπληρωματικές δομές των βρόχων των δύο μορίων RNA. Το παροδικό

(καταλαμβάνεται συνεπώς από υδρόφιλα αμινοξέα), και οι θέσεις *a* και *d* είναι οι πιο καλυμμένες στο εσωτερικό (καταλαμβάνονται από υδρόφοβα αμινοξέα) [72]. Οι ενδιάμεσες θέσεις *e* και *g* δείχνουν μια ισορροπημένη κατανομή μεταξύ υδρόφοβων και υδρόφιλων αμινοξέων [55].

Η κατανομή του φορτίου στην επιφάνεια της πρωτεΐνης είναι μη ομοιογενής. Η όψη της πρωτεΐνης που σχηματίζεται από τις έλικες



Σχ.4 Αλληλεπίδραση της Rop (μωβ χρώμα) με τις δομές φουρκέτας των RNAI και RNAII (κόκκινο χρώμα) και επακόλουθος σχηματισμός ζεύγους RNA. Αναπαράγεται άνευ αδείας από τους Actis L.A. et al [1].

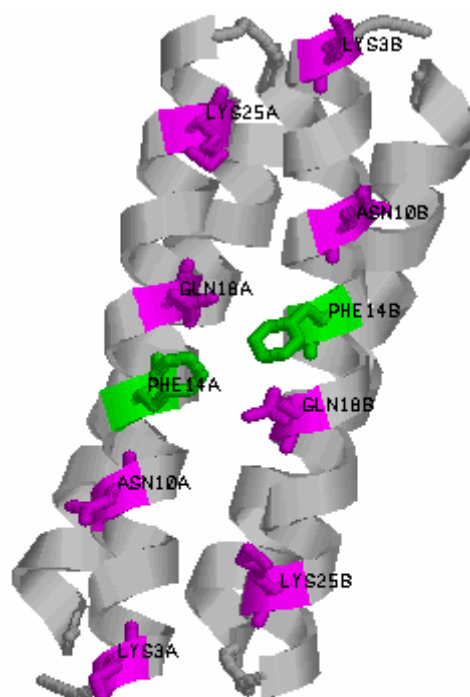
σύμπλοκο των δύο RNA έπειτα ενώνεται σαν φερμουάρ σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τριών ζευγών συμπληρωματικών φουρκετών [27,47,58,60,64,70]. Στη μορφή αυτή, το RNAII είναι ανίκανο να προσδεθεί στη θέση ori και να λειτουργήσει ως υποκινητής της αντιγραφής του DNA, η αντιγραφή του πλασμιδίου καταστέλλεται και ο αριθμός των αντιγράφων μειώνεται (Σχ.4) [1,48,69,70].

Η Rop δεν είναι ένας κλασσικός καταστολέας της αντιγραφής αφού δεν προσδέεται στο χειριστή του υποκινητή [38] αλλά υποβοηθά την κατασταλτική δράση του RNAI αυξάνοντας τη συγγένεια μεταξύ των δύο συμπληρωματικών RNA [64] (παρουσία της Rop ο υβριδισμός του RNAI με το RNAII συμβαίνει γρηγορότερα [70]).

Αλληλεπίδραση με RNA

Από μελέτες μεταλλαξιγένεσης στις οποίες μελετάται η πρόσδεση των μορίων RNA με τη Rop έχει δειχθεί ότι συγκεκριμένα κατάλοιπα της Rop αναγνωρίζουν τις δομές φουρκέτας των RNA (ανεξαρτήτως της ακριβούς αλληλουχίας βάσεων του βρόχου ή του στελέχους) (Σχ.4) [18,56].

Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στην αναγνώριση του RNA σχηματίζουν μια στενή λουρίδα κατά μήκος της θετικά φορτισμένης όψης της πρωτεΐνης (έλικες 1 και 1') και είναι συμμετρικά τοποθετημένα, με κέντρο γύρω από δύο κατάλοιπα φαινυλανανίνης (Phe14/14'). Τα δύο κατάλοιπα Phe αλληλεπιδρούν με την περιοχή βρόχου ενός ζεύγους φουρκέτας με επιπλέον αλληλεπιδράσεις μεταξύ οκτώ ακόμα πολικών αμινοξέων (Asn-10, Gln-18, Lys-25 και Lys-3) και του φωσφοσακχαρικού σκελετού του RNA (άμεσα, ή μέσω μορίων νερού). Κάθε κατάλοιπο που είναι απαραίτητο για την πρόσδεση του RNA απαιτείται και στις δύο έλικες (1 και 1'), αφού η αλληλεπίδραση με το ζεύγος φουρκέτας γίνεται σε επίπεδη επιφάνεια με συμμετρικό τρόπο (Σχ.5) [11,60].



Σχ.5 Τα κατάλοιπα της Rop που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με το RNA φαίνονται με αναπαράσταση stick. Με πράσινο απεικονίζονται οι Phe14 και με μιλιά οι Asn-10, Gln-18, Lys-25 και Lys-3 (πρόγραμμα Rasmol [11]).

Η Rop ως μοντέλο πρωτεϊνικής αναδίπλωσης

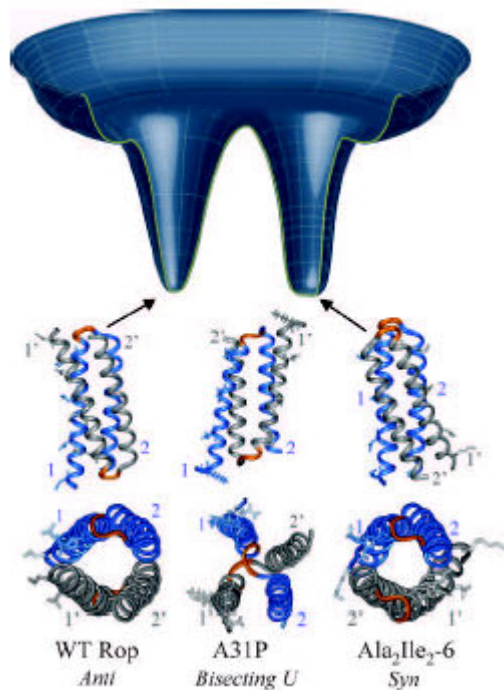
Η Rop αποτελεί ένα εξαιρετικό σύστημα-μοντέλο για την κατανόηση της πρωτεϊνικής δομής και σταθερότητας. Καθότι διμερές παρέχει μια καλή εικόνα για τις πολυμερείς πρωτεΐνες αποτελώντας τον χαρακτηριστικότερο και

απλούστερο εκπρόσωπο της οικογένειας των πρωτεϊνών που διαθέτουν 4- α -ελικοειδή δεμάτια [9,26]. Το μικρό της μέγεθος και η μεγάλη διαλυτότητά της, την κάνουν προσιτή σε γενετικούς χειρισμούς και ο καθαρισμός και η έκφρασή της σε μεγάλες ποσότητες είναι απλές διαδικασίες. Αποτελεί μία πολύ καλά χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη καθώς η κρυσταλλική δομή [3], η NMR δομή [16] και η δομή της σε διάλυμα [17] έχουν αναλυθεί σε βάθος και τα κατάλοιπα που χρειάζονται για τη κινητικές της μελέτες δείχνουν ότι χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμοδυναμική σταθερότητα [3,17,51,68,72].

Το γεγονός ότι η Rop είναι μικρή και εξαιρετικά απλή (δεν περιέχει κατάλοιπα προλίνης, δισουλφιδικούς δεσμούς ή συμπαράγοντες) είναι σημαντικό για την εξοικονόμηση υπολογιστικού κόστους κατά τις προσομοιώσεις πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Ως εκ τούτου το αναμενόμενο θα ήταν να παρουσιάζει γρήγορη κινητική αναδίπλωσης. Ωστόσο οι μελέτες δείχνουν ότι η φυσική Rop αναδιπλώνεται και ξεδιπλώνεται ιδιαίτερα αργά [35,49,51,65,68]. Η αναδίπλωση πραγματοποιείται με έναν μηχανισμό δύο σταδίων: μία γρήγορη σύγκρουση των μονομερών και δημιουργία ενός διμερούς ενδιαμέσου με σημαντικό περιεχόμενο σε έλικες και μια ακόλουθη αργή αναδιάταξη προς την τελική φυσική δομή. Η αποδιάταξη αποτελείται από μια εξαιρετικά αργή κινητική φάση.

Τάξη	No	Παραλλαγή	<i>In vitro</i> ενεργότητα	<i>In vivo</i> Ενεργότητα	T_m (°C)	Σχετική k_f	Σχετική k_u	Δομή
I	1	WT	N	N	64	1	1	<i>anti</i>
	2	Ala ₂ Leu ₂ -4	N	M	68	1.5	28	<i>anti</i>
	3	Ala ₂ Leu ₂ -2	N	N	72	3.2	18	<i>anti</i>
	4	Ala ₂ Leu ₂ -(3+6)	N	—	72	7.5	8.3	<i>anti</i>
	5	Leu ₂ Ala ₂ -(2+7)	N	—	85	10	18	<i>anti</i>
	6	Ala ₂ Leu ₂ -6-rev	N	—	85	85	6.7x10 ²	<i>anti</i>
	7	Ala ₂ Leu ₂ -8-rev	N	O	91	92	2.7x10 ³	<i>anti</i>
	8	Ala ₂ Leu ₂ -(2+7)	N	—	85	120	7.1x10 ³	<i>anti</i>
	9	Ala ₂ Leu ₂ -(1+8)	N	—	54	160	1.1x10 ²	<i>anti</i>
	10	Ala ₂ Leu ₂ -6	N	O	82	310	3.1x10 ⁴	<i>anti</i>
	11	Ala ₂ Leu ₂ -8	N	O	91	610	5.0x10 ⁴	<i>anti</i>
II	12	Ala31Pro	M	—	—	—	<i>bisecting U</i>	
III	13	Ala ₂ He ₂ -6	O	O	83	—	—	<i>syn</i>
	14	Leu ₂ Ala ₂ -8	O	—	—	—	—	—
IV	15	Ala ₂ Met ₂ -8	O	O	48	—	—	—
	16	Ala ₂ Val ₂ -8	—	—	—	—	—	—
V	17	Ala ₄ -8	—	—	<2	—	—	—
	18	Leu ₄ -8	O	O	—	—	—	—

Πιν.1 Οι κυριότερες παραλλαγές (variants) της Rop ταξινομούνται σε πέντε τάξεις σύμφωνα με την ενεργότητα, τη θερμοδυναμική, την τοπολογία και την κινητική της αναδίπλωσής τους. Κάθε παραλλαγή ονομάζεται σύμφωνα με την ταυτότητα των καταλοίπων του στις θέσεις "a" και "d" των μεταλλαγμένων στρώσεων, καθώς και τον αριθμό ή (μέσα σε παρένθεση) την ακριβή ταυτότητα των μεταλλαγμένων στρώσεων. rev: ανεστραμμένο μοτίβο πακεταρίσματος, T_m : θερμοκρασία τήξης, σχετική k_f : ρυθμός αναδίπλωσης ως προς τη φυσική Rop, σχετική k_u : ρυθμός αποδιάταξης ως προς τη φυσική Rop, N: η Rop πρωτεΐνη προσδένει το RNA, M: μερικώς ενεργές πρωτεΐνες, O: μη ενεργότητα, -: δεν αναφέρονται πειραματικά δεδομένα [42].



Σχ.6 Σχηματική αναπαράσταση της υπόθεσης του δίχωνου (double-funneled) ενεργειακού τοπίου της Rop και οι τρεις δομικές τοπολογίες που αντιστοιχούν στη φυσική αλληλουχία και τα μεταλλάγματα Ala₂Ile₂-6 και A31P [42]. Τα μονομερή παρουσιάζονται με γκρι και μπλε χρωματισμούς και οι συνδετικές στροφές με πορτοκαλί. Τα κατάλοιπα Lys-3, Asn-10, Glu-18 και Lys-25 στις έλικες 1 και 1', που αποτελούν την περιοχή πρόσδεσης του RNA [60], φαίνονται με αναπαράσταση stick. Η φυσική Rop (WT Rop) διαθέτει τοπολογία *anti* ενώ η Ala₂Ile₂-6 τοπολογία *syn*, που προκύπτει από περιστροφή του ενός μονομερούς κατά 180° γύρω από έναν άξονα κανονικό ως προς το επίπεδο του διμερούς. Σύμφωνα με την υπόθεση οι τοπολογίες *anti* και *syn* αντιστοιχούν στις δύο κοιλάδες ενώ η A31P είναι λιγότερο σταθερή (Αναπαράγεται άνευ αδείας από τους Levy Y. et al [42]).

Μελέτες μεταλλαξιγένεσης και *de novo* σχεδιασμού της Rop παρείχαν μια ευκαιρία να εξεταστούν πολλές από τις δυνάμεις και τα χαρακτηριστικά που κατευθύνουν την πρωτεϊνική αναδίπλωση (κατανομή των υδρόφοβων καταλοίπων στο εσωτερικό, υπερνίκηση της εντροπίας διαμόρφωσης, δομικοί περιορισμοί αναδίπλωσης, στροφές μεταξύ ελίκων, δίπολα ελίκων) [33].

Η συμμετρική δομή της πρωτεΐνης επιτρέπει την εύκολη κατανόηση των συνεπειών της μετάλλαξης με έναν τρόπο που είναι λιγότερο ευθύς σε άλλες περισσότερο δομικά περίπλοκες πρωτεΐνες-μοντέλα. Έτσι αποτελεί στόχο μεταλλαξιγένεσης ειδικής θέσης (κατάλοιπα στροφών [6,21,36,39,40,52,53,57,59,61,72], κατάλοιπα πρόσδεσης RNA [6,60], κατάλοιπα υδρόφοβου πυρήνα [8,50,51,67,71]) (Πιν.1) και τυχαίας μεταλλαξιγένεσης μέσω κατασκευής βιβλιοθηκών μεταλλαγμάτων [7,44,45,46]. Αξιοσημείωτη είναι η ακραία απάντηση της Rop σε ορισμένες μεταλλάξεις με εξέχον παράδειγμα τη μετάλλαξη της Ala-31 της στροφής σε Pro που -αν και σημειακή- επιφέρει εκτεταμένη δομική αλλαγή προς μια τοπολογία διχοτομούμενου U (*bisecting U*) που φέρεται ουσιαστικά να αποτελεί δομή λιωμένου σφαιριδίου (*molten globule*) [21,22].

Είναι επίσης πολύ ενδιαφέρον ότι πολλά από αυτά τα μεταλλάγματα αναδιπλώνονται και ξεδιπλώνονται γρηγορότερα από ότι η φυσική Rop (μείωση της μεταβατικής κατάστασης) [49,51,52,67,73] (Πιν.1). Αυτή η συμπεριφορά της Rop κατά την αναδίπλωση αποτελεί μια εξαίρεση της κλασικής θεωρίας του ενεργειακού τοπίου και εξηγείται με την παραδοχή ενός δίχωνου (double-funneled) ενεργειακού τοπίου [42] (Σχ.6).

Η δομή της Rop και τα χαρακτηριστικά της (π.χ. η γεωμετρική συμπληρωματικότητα των πλευρικών αλυσίδων κατά το πακετάρισμα, συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις) έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο σε *de novo* σχεδιασμούς

πολυπεπτιδίων [4,28]. Ένα από αυτά, ο "Janus", ήταν η απάντηση στο "Paracelsus Challenge" για τη συσχέτιση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με τη δομή [12,13].

Η Rop επίσης αναφέρεται σε μελέτες στοίχισης πρωτεϊνικών δομών και αλληλουχιών με σκοπό τη δημιουργία δομών-μοντέλων για όλες τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες [34] καθώς και την εύρεση συντηρημένων μοτίβων αλληλουχιών που δίνουν συνήθη μοτίβα αναδίπλωσης [62].

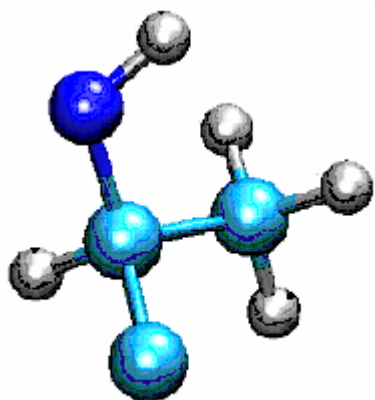
Στόχος

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο πλήρης χαρακτηρισμός της δυναμικής της φυσικής πρωτεΐνης Rop με την ανάλυση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής δύο εκτεταμένων και ανεξάρτητων τροχιακών και τη μεταξύ τους σύγκριση.

Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής Molecular Dynamics Simulations

Οι Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής δημιουργούν μοντέλα βιομακρομορίων (απαγορευτικά μικρών για άμεση παρατήρηση) και προσομοιώνουν τις κινήσεις τους σε ένα μοριακό σύστημα. Υπολογίζουν, δηλαδή, πώς αλλάζουν οι θέσεις, οι ταχύτητες και οι προσανατολισμοί των ατόμων και ως εκ τούτου τις διακυμάνσεις και τις δομικές αλλαγές των πρωτεϊνών ή των νουκλεϊκών οξέων του συστήματος.

Μοντέλο απεικόνισης και οριοθέτηση του συστήματος



Σχ.7 Μοντέλο βιομορίου στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Τα βιομόρια της προσομοίωσης συμβολίζονται ως μπάλες (άτομα) ενωμένες με ελατήρια (δεσμοί) (Σχ.7) [XX]. Τα άτομα είναι με τη μορφή μαλακών σφαιρών (soft spheres) [25], επικαλύπτουν δηλαδή το ένα το άλλο (μοντέλο Lennard-Jones) [XVIII].

Στις πραγματικές συνθήκες, ένα μόριο είναι σπάνια απομονωμένο. Στα βιολογικά συστήματα οι πρωτεΐνες, το RNA και το DNA είναι βυθισμένα σε ένα διάλυμα μορίων νερού. Πώς θα εγκαθιδρυθούν υπολογιστικά όρια παράλληλα με τη διατήρηση μιας ρεαλιστικής προσομοίωσης σε διάλυμα [XIV];

Απαραίτητος σε αυτή την περίπτωση είναι ο ορισμός ορίων (boundary conditions) στο σύστημα. Πρώτον, για να αποφευχθεί η διάχυση των μορίων του νερού μακριά από την πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, και δεύτερον για να καταστεί εφικτή η προσομοίωση και ο υπολογισμός των μακροσκοπικών ιδιοτήτων χρησιμοποιώντας έναν περιορισμένο αριθμό μορίων διαλύτη. Ο καθορισμός του τρόπου χειρισμού των ορίων του συστήματος ποικίλλει και εξαρτάται από τον τύπο του ερωτήματος που αντιμετωπίζει η προσομοίωση (περιοδικές δεσμικές συνθήκες, κελύφη διάλυσης κ.α.) [XX].

Υπολογισμός ενέργειας συστήματος

Εξίσωση κίνησης

Η περιγραφή της κίνησης των μορίων γίνεται με τη χρήση του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα ή εξίσωση της κίνησης:

$$F_i = m_i a_i$$

όπου F_i είναι η δύναμη που ασκείται στο άτομο i , m_i είναι η μάζα του και a_i είναι η επιτάχυνσή του. Από την παραπάνω εξίσωση διαδοχικά παίρνουμε:

$$F_i = m_i a_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = - \frac{\partial V}{\partial r_i}$$

όπου V είναι η δυναμική ενέργεια του συστήματος. Η εξίσωση κίνησης του Νεύτωνα συνδέει συνεπώς την παράγωγο της δυναμικής ενέργειας με τη μεταβολή της θέσης του ατόμου συναρτήσει του χρόνου [2].

Ολοκλήρωση της παραπάνω εξίσωσης δίνει ένα τροχιακό που περιγράφει τις θέσεις, τις ταχύτητες και τις επιταχύνσεις των μορίων όπως ποικίλλουν στο χρόνο (μονοπάτι που ακολουθείται από τα άτομα).

Δυναμικά Πεδία (Force Fields)

Τα δυναμικά πεδία ή εμπειρικές συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας αποτελούνται από ένα σετ παραμέτρων και έχουν την ικανότητα να αναπαράγουν εμπειρικά φυσικές ιδιότητες όπως δομικά, δυναμικά και θερμοδυναμικά δεδομένα. Παρέχουν μια καλή συμβιβαστική λύση μεταξύ της ακρίβειας των αποτελεσμάτων και της υπολογιστικής επάρκειας. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα δυναμικά πεδία είναι πολλά (AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS/AMBER).

Ένα άτομο επηρεάζεται από τις συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας κάθε ατόμου στο σύστημα:

-Αλληλεπιδράσεις δεσμικών ατόμων (μήκη και γωνίες δεσμών) [2].

-Αλληλεπιδράσεις μη-δεσμικών ατόμων (άτομα στο ίδιο ή διαφορετικά μόρια): Ο υπολογισμός τους αποτελεί το πιο χρονοβόρο μέρος των προσομοιώσεων. Ιδανικά, κάθε άτομο θα έπρεπε να αλληλεπιδρά με κάθε άλλο άτομο στο μοντέλο (ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δυνάμεις Van der Waals). Αυτό δημιουργεί έναν αλγόριθμο υπολογισμού δυνάμεων τετάρτης τάξης. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων που απέχουν μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους μπορούν να αγνοηθούν χωρίς μεγάλη απώλεια ακρίβειας με ορισμένες μεθόδους αποκοπής {παράρτ.1}[66].

Το μειονέκτημα των εμπειρικών δυναμικών πεδίων είναι οι πολλαπλές προσεγγίσεις που λαμβάνουν χώρα για τη μείωση του υπολογιστικού κόστους και οδηγούν σε ορισμένους περιορισμούς (αποκλεισμός ηλεκτρονιακής κατάστασης, ομαδοποίηση ατομικών τύπων, κατά-ζεύγη προσθετική προσέγγιση){παράρτ.2}. Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, νέα μικτά δυναμικά πεδία κβαντομηχανικής-μοριακής μηχανικής αναπτύσσονται στα εργαστήρια.

Αλγόριθμοι ολοκλήρωσης

Έχουν αναπτυχθεί αρκετοί αλγόριθμοι για την ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης (Verlet, Leap-frog, Velocity Verlet, Beeman's κ.α.).

Όλοι οι αλγόριθμοι ολοκλήρωσης θεωρούν ότι οι θέσεις, οι ταχύτητες και οι επιταχύνσεις των ατόμων σε κάθε χρονικό βήμα (step) μπορούν να προσεγγιστούν από μια σειρά εξισώσεων Taylor:

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + 1/2a(t)\delta t^2 + \dots$$

$$v(t + \delta t) = v(t) + a(t)\delta t + 1/2b(t)\delta t^2 + \dots$$

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

Όπου r είναι η θέση, v η ταχύτητα (η πρώτη παράγωγος του χρόνου), a η επιτάχυνση (η δεύτερη παράγωγος του χρόνου), κ.ο.κ. [XX].

Αρχικές συντεταγμένες

Χρειάζονται ακόμα οι αρχικές συντεταγμένες του μορίου (αρχικές θέσεις και αρχική κατανομή ταχυτήτων). Οι αρχικές θέσεις μπορούν να ληφθούν από πειραματικές δομές, όπως την κρυσταλλική δομή ακτίνων-X της πρωτεΐνης ή τη δομή που καθορίζεται από τη φασματοσκοπία NMR. Η αρχική κατανομή των ταχυτήτων συνήθως επιλέγεται τυχαία από μία κατανομή κατά Maxwell-Boltzmann ή Gauss.

Τελικά, με τις αρχικές συντεταγμένες του μορίου, τη χρήση των εμπειρικών δυναμικών πεδίων και την ολοκλήρωση της εξίσωσης κίνησης μπορούν να υπολογιστούν οι θέσεις των μορίων στο μοντέλο σε κάθε χρονικό βήμα.

Εύρος κινήσεων

Οι Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής είναι δυνατόν να περιγράψουν τοπικές κινήσεις (ατόμων, πλευρικών αλυσίδων, βρόχων) και κινήσεις σταθερού σκελετού (έλικας, δομικών μονάδων, υπομονάδων) αφού η διάρκειά τους είναι πολύ μικρή {παράρτ.3}[5,xv]. Το χρονικό βήμα καθορίζεται από την ταλάντωση υψηλότερης συχνότητας που συμβαίνει στο σύστημα.

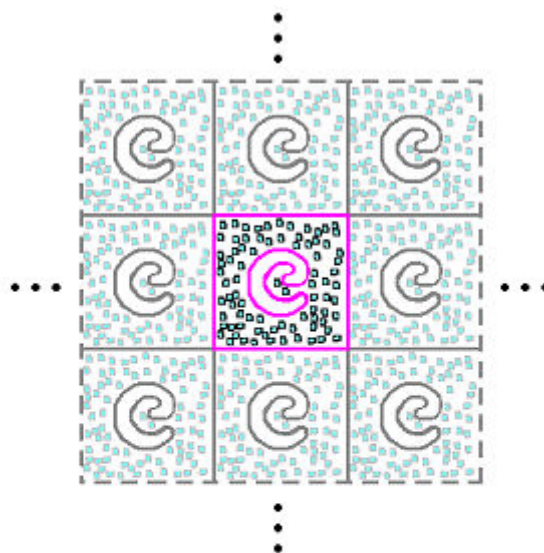
Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί και τα δύσκολα σημεία (οι μεγάλης εμβέλειας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, το πολύ μικρό χρονικό βήμα, η ανάγκη για ικανή δειγματοληψία του χώρου διαμορφώσεων) [XXIV] ώστε να αυξηθεί η ακρίβεια κατά τους υπολογισμούς στις μοριακές προσομοιώσεις.

Περιοδικές Οριακές συνθήκες (Periodic Boundary Conditions)

Ένα σύστημα μοριακής δυναμικής με περιοδικές οριακές συνθήκες [5,66] αποτελείται από ένα κεντρικό κουτί γεμάτο άτομα που περιβάλλεται από όλες τις πλευρές με πανομοιότυπα εικονικά κουτιά, αντίγραφα του κεντρικού, με χωροπληρωτικό τρόπο. Έτσι μια προσομοίωση εκτελείται χρησιμοποιώντας ένα σχετικά μικρό αριθμό μορίων με τέτοιο τρόπο ώστε τα μόρια να υφίστανται δυνάμεις σαν να βρίσκονται σε όγκο διαλύματος.

Το κουτί μπορεί να έχει σχήμα κυβικό, εξαγωνικό-πρίσματος, ρομβικού δωδεκάεδρου, επιμηκυμένου δωδεκάεδρου ή κολοβωμένου οκτάεδρου.

Στην απλούστερη περίπτωση το κεντρικό κουτί περιβάλλεται από 26 γειτονικά (Σχ.8). Οι συντεταγμένες των γειτονικών μορίων, που βρίσκονται στα περιβάλλοντα κουτιά σχετίζονται με αυτά του πρωταρχικού κουτιού με απλές μεταθέσεις. Οι δυνάμεις που ασκούνται στα κύρια μόρια υπολογίζονται από τα μόρια του ίδιου κουτιού όπως και από τα μόρια των γειτονικών κουτιών. Το κατώφλι υπολογίζεται έτσι ώστε ένα μόριο στο πρωταρχικό κουτί να μη βλέπει την εικόνα του στα διπλανά κουτιά. Όταν ένα άτομο μετακινηθεί εκτός μιας πλευράς του κουτιού, επανεμφανίζεται στην αντιδιαμετρική πλευρά.



Σχ.8 Αναπαράσταση της απλούστερης περίπτωσης περιοδικών οριακών συνθηκών με κυβική κυψέλη. Το προσομοιούμενο μόριο περιβάλλεται από μόρια νερού. Το κεντρικό κουτί απεικονίζεται με ροζ χρώμα.

Η μέθοδος Particle Mesh Ewald (PME)

Η μέθοδος Particle Mesh Ewald (PME) αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο για τον υπολογισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεγάλου εύρους στο περιοδικό σύστημα [66,VI].

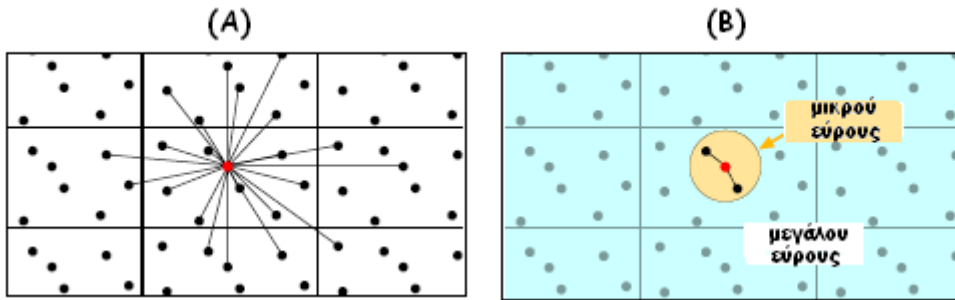
Το ηλεκτροστατικό δυναμικό στις περιοδικές οριακές συνθήκες δίνεται από τον τύπο:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N \sum_{n \in \mathbb{Z}^3} \frac{q_i q_j}{|r_{ij} + nL|}$$

Όπου N τα μόρια, q το φορτίο, r οι θέσεις και L το μήκος του κουτιού. Η απευθείας άθροιση της παραπάνω εξίσωσης είναι μη εφαρμόσιμη (Σχ.9A) [15].

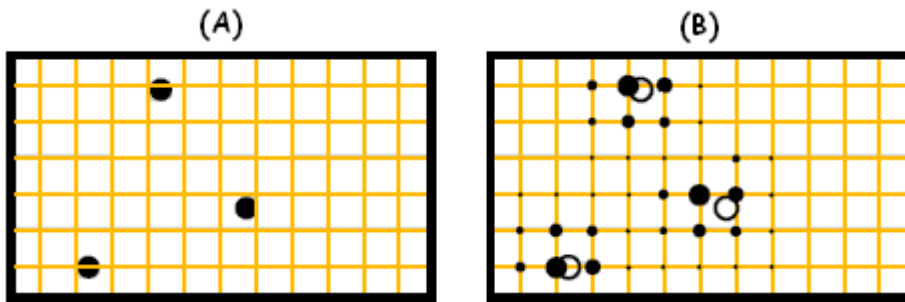
Στην PME τα ηλεκτροστατικά δυναμικά χωρίζονται σε δύο τμήματα [15]: τα δυναμικά μικρού εύρους (άμεσος χώρος) που μεταβάλλονται γρήγορα σε μικρές αποστάσεις και τα δυναμικά μεγάλου εύρους (χώρος Fourier) τα οποία μειώνονται αργά καθώς η απόσταση μεγαλώνει (Σχ.9B):

$$V = \underbrace{V_{dir}}_{\text{άμεσος χώρος}} + \underbrace{V_{rec}}_{\text{χώρος Fourier}}$$



Σχ.9 Χειρισμός των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων σε περιοδικό σύστημα. (A) Ο ευθύς υπολογισμός δεν είναι εφαρμόσιμος. (B) με την PME ο χώρος υπολογισμού χωρίζεται σε δύο τμήματα: άμεσος χώρος (μπεζ χρώμα) και χώρος Fourier (γαλάζιο χρώμα) [37].

Ο υπολογισμός των δυναμικών μεγάλου εύρους (V_{rec}) απαιτεί ανάλυση κατά Fourier της πυκνότητας φορτίου [15]. Ένα τρισδιάστατο πλέγμα δημιουργείται στο σύστημα πάνω στο οποίο κατανέμεται το φορτίο (Σχ.10). Η συνέλιξη του πλέγματος με το ατομικό φορτίο δίνει το φορτίο στα σημεία του πλέγματος. Από αυτό το φορτίο καθορίζονται τα δυναμικά και οι δυνάμεις στα άτομα του συστήματος [37].



Σχ.10 (A) Εναπόθεση του τρισδιάστατου πλέγματος πάνω στο σύστημα και (B) ανάλυση των φορτίων των ατόμων στα γειτονικά σημεία του πλέγματος.

Δυναμικά Langevin (Langevin Dynamics)

Ένα μόριο σε διάλυμα βομβαρδίζεται συνεχώς από όλες τις πλευρές από άλλα μόρια. Αυτά ασκούν δυνάμεις που σπρώχνουν το μόριο προς διάφορες κατευθύνσεις καθώς και δυνάμεις τριβής που μειώνουν την ταχύτητα της κίνησης του μορίου στο διάλυμα. Οι δυνάμεις αυτές αναπαρίστανται με την εξίσωση Langevin που δημιουργεί κλασικά δυναμικά Brownian που περιγράφουν την κίνηση ενός μορίου κάτω από την επιρροή τυχαίων συγκρούσεων με τον περιβάλλον διαλύτη [XVI].

Στην εξίσωση Langevin η δύναμη που ασκείται στο μόριο χωρίζεται σε τρία συστατικά:

$$m_i a = F_i \{x_i(t)\} - \gamma_i v_i m_i + R_i(t)$$

- Την δια-ατομική δύναμη, $F_i \{x_i(t)\}$, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ατόμων του συστήματος, που είναι ίδια με τη δύναμη που χρησιμοποιείται στην εξίσωση κίνησης του Νεύτωνα.

- Τη δύναμη τριβής $R_i(t)$ που περιγράφει την έλξη στο μόριο εξαιτίας του διαλύτη. Το μέγεθος της έλξης σχετίζεται με τον συντελεστή τριβής γ_i .

- Την τυχαία ή στοχαστική δύναμη εξαιτίας θερμικών διακυμάνσεων του διαλύτη.

Τα δυναμικά Langevin επιφέρουν αύξηση του εύρους των δυναμικών κινήσεων των ατόμων, προκαλούν δηλαδή περισσότερη κινητικότητα του συστήματος σε μικρότερο χρόνο προσομοίωσης.

Πιστότητα αναπαράστασης

Η Προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής αποτελεί μια ντετερμινιστική αλλά μη προβλέψιμη μέθοδο [25]. Τα εξαγόμενα δεδομένα συνδέονται αιτιακά με τα εισαγόμενα δεδομένα του συστήματος. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται επεξεργάζεται τα εισαγόμενα δεδομένα και εξάγει αποτελέσματα, που όμως δεν είναι προβλέψιμα. Αυτό οφείλεται στον τύπο των δυνάμεων που δρουν στα συστατικά του συστήματος: το σύστημα περιέχει αντικείμενα που αλληλεπιδρούν μη γραμμικά και η σταθερότητα του αλγορίθμου είναι ευαίσθητη σε ενδιάμεσους υπολογισμούς. Ο υπολογισμός της συμπεριφοράς ενός μοντέλου δεν εγγυάται ότι η υπολογισμένη συμπεριφορά είναι αντιπροσωπευτική αυτού του μοντέλου.

Εφόσον προσομοιώνονται μοριακά μοντέλα (απλούστερα από την πραγματικότητα) και όχι οι ίδιες οι πρωτεΐνες, υπάρχει μια αβεβαιότητα για το κατά πόσο το μοντέλο μιμείται πιστά την πραγματικότητα (απόπειρα ερμηνείας της φύσης και όχι επακριβούς περιγραφής της). Ο ρεαλισμός των μοντέλων προσομοίωσης ελέγχεται μέσω σύγκρισης με πειραματικά δεδομένα (π.χ. NMR) [29].

Εφαρμογές

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αποτελούν ένα χρήσιμο συμπληρωματικό εργαλείο των πειραματικών μελετών καθώς παρέχουν περιγραφή διαφόρων κινήσεων σε ατομικό επίπεδο που δεν είναι πειραματικά παρατηρήσιμες. Επιτρέπουν έτσι τη μελέτη περίπλοκων, δυναμικών διαδικασιών που συμβαίνουν στα βιολογικά συστήματα [xv], όπως:

- ο Σταθερότητα των πρωτεϊνών

- ο Δομικές αλλαγές
- ο Αναδίπλωση πρωτεϊνών
- ο Θερμοδυναμικές μελέτες (αλλαγές ελεύθερης ενέργειας)
- ο Μοριακή αναγνώριση: πρωτεΐνες, DNA, μεμβράνες, σύμπλοκα
- ο Μεταφορά ιόντων στα βιολογικά συστήματα

και παρέχουν τα μέσα για τη διεξαγωγή των παρακάτω μελετών:

- Σχεδιασμός φαρμάκων
- Προσδιορισμός δομής: ακτίνες-X και NMR.

Προετοιμασία συστήματος

Η αρχική δομή της πρωτεΐνης (θέσεις ατόμων και αρχικές ταχύτητες) προέρχεται από την πειραματικά προσδιορισμένη κρυσταλλική δομή ακτίνων-X της Rop από τη βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB) καταχώρηση 1ROP [III]. Αποτελείται συνολικά από 894 άτομα και 56 κατάλοιπα σε κάθε μονομερές. Τα 7 καρβοξυτελικά κατάλοιπα κάθε μονομερούς (57-63) είναι υπερκίνητα και δεν εμφανίζονται στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας ενώ τρεις πλευρικές αλυσίδες ανά μονομερές είναι ημιτελείς (Lys3, Lys6, Met11) [3].

Ακολούθησε αντικατάσταση των ιστιδινών της πρωτεΐνης με πλήρως προτονιωμένες ιστιδίνες (HIS→HSP) που αντιστοιχούν στο χαμηλό pH του συστήματος. Οι αδρανειακοί άξονες του μορίου στοιχίσθηκαν (μέσω του προγράμματος `moleman` [VIII]) για να μειωθεί ο όγκος του ορθογώνιου κουτιού και συνεπώς ο αριθμός των μορίων νερού αργότερα κατά την προσομοίωση. Οι υπολογισμοί της ενέργειας και ο προσδιορισμός των τροχιακών πιθανώς θα παρουσίαζαν απόκλιση εάν ακόμα και ένα άτομο της πρωτεΐνης έλειπε [XVI]. Η κρυσταλλική δομή από την PDB δεν περιέχει άτομα υδρογόνου οπότε αυτά προστέθηκαν εκ των υστέρων με το πρόγραμμα `psfgen` [VII]. Το ίδιο πρόγραμμα συμπλήρωσε και τα υπόλοιπα άτομα της πρωτεΐνης που έλειπαν (C, O, N).

Για την επίτευξη ενός τυπικού βιολογικού περιβάλλοντος ακολούθησε ενυδάτωση και προσθήκη ιόντων στην πρωτεΐνη (`solvate` και `autoionize` του προγράμματος `VMD` [XIX]).

Ο διαλύτης (το νερό) έχει σημαντική επιρροή στη δομή, την κίνηση και τη θερμοδυναμική της πρωτεΐνης, τόσο τοπικά όσο και συνολικά (διηλεκτρική σταθερά, δεσμοί υδρογόνου) [5,24]. Η ενυδάτωση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη της πρωτεΐνης σε κουτί με μόρια νερού (`explicit treatment`), χειρισμό πολύ πιο ακριβή αν και υπολογιστικά απαιτητικό σε σχέση με την απλή χρήση διηλεκτρικής σταθεράς (`implicit treatment`) [41,63,XII]. Το μέγεθος του κουτιού (15Å από τα άκρα του μορίου προς κάθε κατεύθυνση) επιλέχθηκε ώστε το νερό να εμβυθίζει σημαντικά την πρωτεΐνη όταν είναι πλήρως εκτεταμένη και ώστε να μην αλληλεπιδρά με τις απεικονίσεις της στα διπλανά κουτιά (περιοδικές οριακές συνθήκες) [XXI].

Η πρωτεΐνη φέρει θετικό φορτίο. Για να γίνει το σύστημα ουδέτερο (διαδικασία απαραίτητη για τη χρήση της μεθόδου PME [14]) προστέθηκε κατάλληλος αριθμός ιόντων χλωρίου και νατρίου με τυχαία κατανομή (χειρισμός κατάλληλος για μικρά φορτία) και μέση ιοντική συγκέντρωση στο διάλυμα 0.05M. Τα ιόντα προφυλάσσουν τις περιοχές της πρωτεΐνης που φέρουν το φορτίο και κάνουν το σύστημα πιο σταθερό [31].

Προσομοίωση

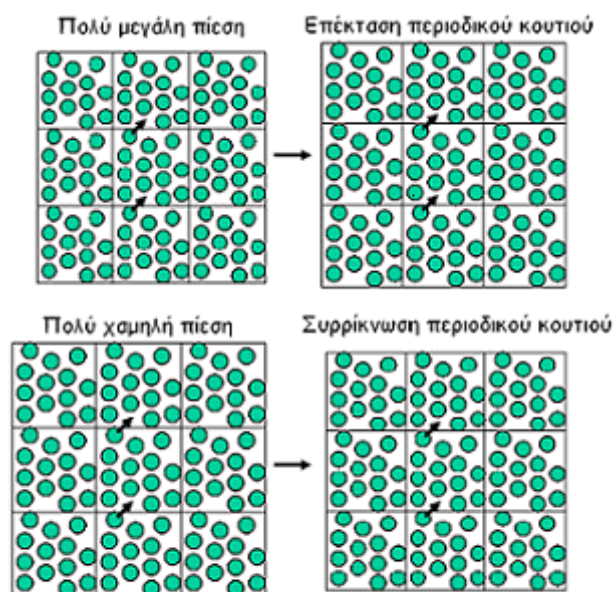
Παράμετροι προσομοίωσης

Όλοι οι υπολογισμοί εκτελέστηκαν σε μια συστοιχία υπολογιστών 16 κόμβων OpenMosix Linux [XI] με τη χρήση του προγράμματος NAMD (version 2.5) [II]. Οι προσομοιώσεις είναι NpT σε συνθήκες σταθερής πίεσης (1 atm) και θερμοκρασίας (320 K). Για τον ορισμό ορίων στο σύστημα χρησιμοποιήθηκαν περιοδικές οριακές συνθήκες με ορθογώνια στοιχειώδη κυψελίδα (σελ.20).

Η πίεση και η θερμοκρασία ρυθμίζονται με τη μέθοδο Langevin piston Nose-Hoover

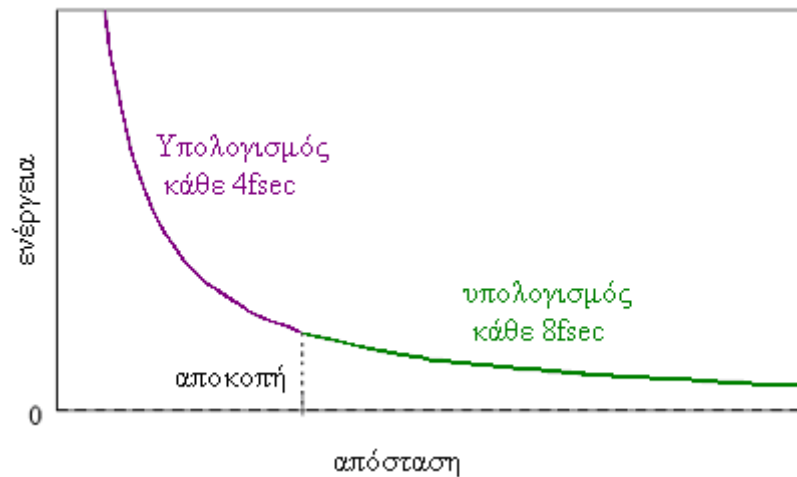
[20,II]. Στο περιοδικό σύστημα χρησιμοποιείται ένας βαροστάτης που μεταβάλλει τον όγκο του κελιού και διατηρεί με αυτόν τον τρόπο την πίεση σταθερή (Σχ.11). Για τον έλεγχο των διακυμάνσεων στο βαροστάτη χρησιμοποιούνται τα δυναμικά Langevin [66]. Με τη μέθοδο αυτή η πίεση διατηρείται σταθερή στην χαρακτηριστική τιμή της 1 atm (ατμοσφαιρική πίεση στο επίπεδο της θάλασσας). Με τα δυναμικά Langevin επιπρόσθετες δυνάμεις τριβής και τυχαίες δυνάμεις επάγονται στο σύστημα και διατηρούν τη θερμοκρασία σταθερή στους 320 K (σελ.21).

Για την προβολή των θέσεων και των ταχυτήτων των ατόμων στο χρόνο χρησιμοποιείται η μέθοδος ολοκλήρωσης Verlet [66]. Τα μήκη των δεσμών συμπεριλαμβανομένων των υδρογόνων και των μητρικών τους ατόμων ορίστηκαν στις τιμές ισορροπίας με τη χρήση του αλγόριθμου SHAKE [66]. Για περαιτέρω μείωση του κόστους υπολογισμού των ολικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων ακολουθείται ένα σχήμα ολοκλήρωσης πολλαπλών χρονικών βημάτων [66,II]. Οι δεσμικές αλληλεπιδράσεις υπολογίζονται σε κάθε χρονικό βήμα (2fs), οι δυνάμεις van der Waals και οι μικρού εύρους (μέχρι 12Å) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κάθε 2 χρονικά βήματα (4fs), ενώ οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεγαλύτερης εμβέλειας (πάνω από 12Å) κάθε 4 χρονικά βήματα (8fs) με τη χρήση της μεθόδου PME (Σχ.12) (σελ.20) [14]. Το μέγεθος του πλέγματος επιλέχθηκε αρκετά μεγάλο έτσι ώστε οι αποστάσεις του πλέγματος να αναπαριστούν με ακρίβεια την κατανομή του φορτίου, αλλά όχι τόσο μεγάλο ώστε να καθυστερεί την προσομοίωση παρέχοντας άχρηστη ακρίβεια [II]. Η διηλεκτρική σταθερά του συστήματος είναι



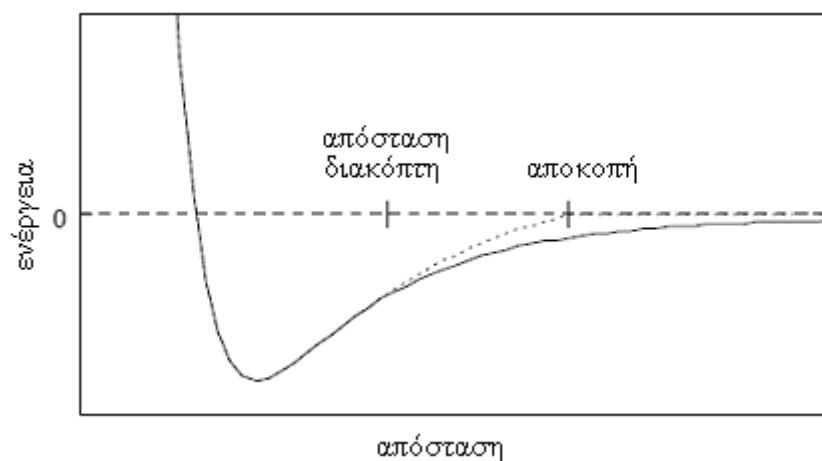
Σχ.11 Η ρύθμιση της πίεσης στο περιοδικό σύστημα μέσω μεταβολής του όγκου του κουτιού (μέθοδος του βαροστάτη).

1, ώστε να μην τροποποιούνται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων [11].



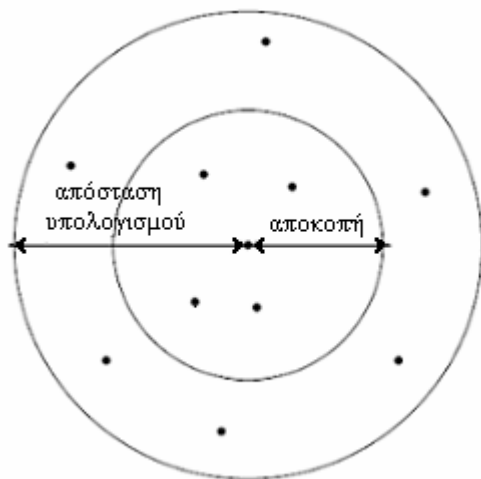
Σχ.12 Διάγραμμα υπολογισμού των ηλεκτροστατικών δυνάμεων των προσομοιώσεων μέχρι (μωβ τμήμα) και πάνω (πράσινο τμήμα) από 12\AA με τη χρήση ολικών ηλεκτροστατικών (σχήμα πολλαπλών χρονικών βημάτων).

Οι μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις van der Waals περικλύονται ομαλά (ώστε να διατηρείται η ενέργεια) σε απόσταση αποκοπής 12\AA με τη χρήση της μεθόδου του διακόπτη {παράρτ.1}. Ο τύπος του διακόπτη ξεκινά να έχει επίδραση στα 10\AA (απόσταση διακόπτη) ώσπου να μηδενίσει ομαλά το δυναμικό van der Waals στην απόσταση αποκοπής (Σχ.13) [11].



Σχ.13 Διάγραμμα των δυνάμεων van der Waals με και χωρίς τη μέθοδο του διακόπτη. Με τη λειτουργία του διακόπτη, το δυναμικό μηδενίζεται ομαλά στην απόσταση αποκοπής. Χωρίς το διακόπτη, εμφανίζεται μια ασυνέχεια εκεί που αποκόπτεται το δυναμικό (αναπαράγεται χωρίς άδεια από τους Bhandarkar et al [11]).

Τα ζεύγη των ατόμων για τα οποία πρέπει να υπολογιστούν οι μη-δεσμικές τοπικές αλληλεπιδράσεις (δυνάμεις van der Waals και οι μικρού εύρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις) ορίζονται κάθε 8 χρονικά βήματα και απέχουν ακτίνα απόστασης 13.5\AA . Η απόσταση αυτή εξασφαλίζει τη διατήρηση της ενέργειας αφού κανένα ζεύγος ατόμων δεν μετακινείται περισσότερο από 1.5\AA ($13.5-12$) στη διάρκεια 8 χρονικών βημάτων (Σχ.14) [11].



Σχ.14 Αναπαράσταση της διαφοράς μεταξύ της απόστασης αποκοπής και της απόστασης υπολογισμού των μη-δεσμικών τοπικών αλληλεπιδράσεων. Η απόσταση υπολογισμού ορίζει μία σφαίρα λίγο μεγαλύτερη από αυτήν της αποκοπής έτσι ώστε να επιτρέπεται στα ζεύγη ατόμων να μετακινούνται εντός και εκτός της απόστασης αποκοπής χωρίς να προκαλούν διατάραξη της διατήρησης της ενέργειας. (αναπαράγεται χωρίς άδεια από τους Bhandarkar et al [II]).

Ελαχιστοποίηση ενέργειας (energy minimization)

Αποτελεί εναρμόνιση της αρχικής δομής (αρχικές συντεταγμένες) με το δυναμικό πεδίο που χρησιμοποιείται [xx]. Η ενεργειακή ελαχιστοποίηση περιλαμβάνει αναζήτηση του ενεργειακού τοπίου του μορίου για τοπικά ελάχιστα, με συστηματική αλλαγή της διαμόρφωσης του συστήματος (θέσεις των ατόμων) και υπολογισμό της ενέργειας (με τη χρήση του δυναμικού πεδίου) [66,ix]. Η ελαχιστοποίηση του συστήματος πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια (για εξοικονόμηση υπολογιστικής προσπάθειας) {παράρτ.4}. Στο πρώτο έγινε ελαχιστοποίηση των πλευρικών αλυσίδων της πρωτεΐνης (με διατήρηση του πρωτεϊνικού σκελετού σταθερού στο χώρο) ενώ στο δεύτερο συμμετείχαν όλα τα άτομα της πρωτεΐνης. Με την εύρεση δομών χαμηλότερης ενέργειας, απομακρύνθηκαν τυχόν ισχυρές αλληλεπιδράσεις van der Waals και η δομή σταθεροποιήθηκε.

Προθέρμανση (heating)

Αποδόθηκαν αρχικές ταχυτήτες στα άτομα σε χαμηλή θερμοκρασία με τα CA άτομα συγκρατημένα και το σύστημα ξεκίνησε να κινείται (ολοκλήρωση της εξίσωσης κίνησης του Νεύτωνα και προσδιορισμός των ατομικών θέσεων και ταχυτήτων διαδοχικά για τα επόμενα στιγμιότυπα). Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά (ανά 20K) μέχρι να φτάσει τους 320K {παράρτ.4}.

Εξισορρόπηση (equilibration)

Ο ρυθμιστής της πίεσης (Langevin piston) τέθηκε σε λειτουργία και η προσομοίωση έτρεξε μέχρι να σταθεροποιηθούν οι ιδιότητες του συστήματος (ενέργεια, όγκος, πίεση, θερμοκρασία) στο χρόνο. Αρχικά πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση με τα CA άτομα της πρωτεΐνης συγκρατημένα και έπειτα το σύστημα εξισορροπήθηκε στο χρόνο χωρίς περιορισμούς {παράρτ.4}. Ο περιορισμός των CA ατόμων

επιτρέπει μόνο στα υπόλοιπα άτομα της πρωτεΐνης, που ανταποκρίνονται στις δυνάμεις γρηγορότερα, να συμμετάσχουν στην προθέρμανση και το πρώτο βήμα της εξισορρόπησης (εξοικονόμηση υπολογιστικής ισχύος).

Παραγωγή (production)

Μετά τη σταθεροποίηση του συστήματος η προσομοίωση συνέχισε να τρέχει μέχρι να συμπληρωθούν συνολικά 10ns (25000 frames){παράρτ.4}. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για δεύτερη φορά με τη χρήση των ίδιων παραμέτρων με αποτέλεσμα τελικά την παραγωγή δύο ανεξάρτητων τροχιακών.

Ανάλυση

Οι συντεταγμένες και οι ενέργειες των δύο τροχιακών παραγωγής αποθηκεύτηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της κάθε προσομοίωσης (1' και 2') ξεχωριστά, καθώς και για τη μεταξύ τους σύγκριση. Οι περισσότερες αναλύσεις έγιναν μετά από προσαρμογή ελαχίστων τετραγώνων (βέλτιστη υπέρθεση) των συντεταγμένων ως προς μια δομή αναφοράς για την απάλειψη των μεταθετικών και περιστροφικών κινήσεων της πρωτεΐνης. Διαφορετικά, οι κινήσεις διάχυσης της πρωτεΐνης θα έδιναν ψευδείς συσχετίσεις μεταξύ των ατόμων και οι (ενδιαφέρουσες) εσωτερικές διακυμάνσεις θα επηρεάζονταν ή θα χάνονταν στο θόρυβο [30]. Η ανάλυση των τροχιακών πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα VMD [XIX], XPLORE [IV], Rasmol [I], carma [VI] και R [V].

Ανάλυση των προσομοιώσεων 1 & 2

Σταθερότητα αρχικής δομής

Ως μέτρο της πρωτεϊνικής σταθερότητας και ελαστικότητας χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση η ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD), που αποτελεί αριθμητικό δείκτη της αλλαγής στη διαμόρφωση του μορίου σε σχέση με κάποια δομή αναφοράς (π.χ. αρχική ή μέση δομή).

Η RMSD μεταξύ της αρχικής (κρυσταλλικής) δομής και των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης υπολογίστηκε με την ακόλουθη εξίσωση (πρόγραμμα carma [VI]):

$$RMSD_{\alpha 1}(t_j) = \sqrt{\frac{\sum_{\alpha=1}^{N_{\alpha}} (\vec{r}_{\alpha}(t_j) - \vec{r}_{\alpha 1})^2}{N_{\alpha}}}$$

Όπου N_{α} είναι ο αριθμός των ατόμων των οποίων οι θέσεις συγκρίνονται, $\vec{r}_{\alpha 1}$ οι συντεταγμένες του ατόμου α στην αρχική δομή και $\vec{r}_{\alpha}(t_j)$ οι συντεταγμένες του ατόμου α τη χρονική στιγμή t_j . Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα xmgr [XXIII].

Προσομοίωση 1

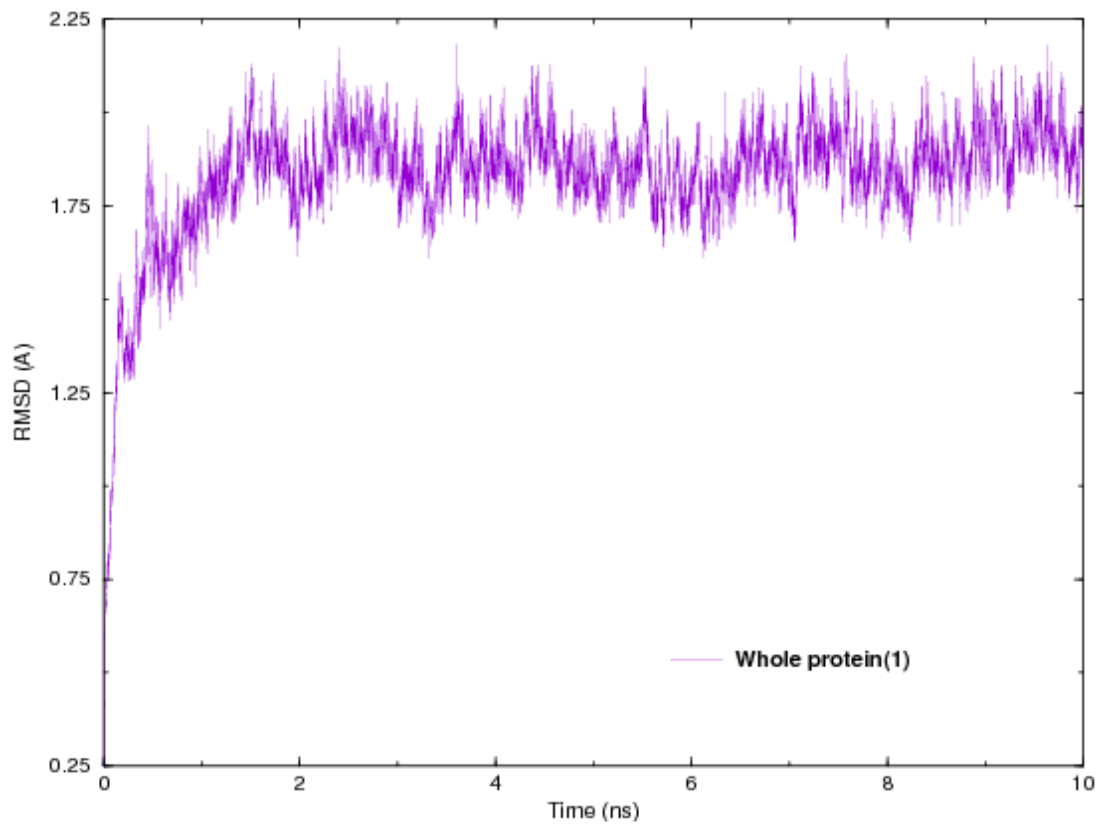
Η RMSD της συνολικής πρωτεΐνης από την αρχική δομή κατά την προσομοίωση 1 απεικονίζεται στο Σχ.15Α. Κατά τα αρχικά 0.1ns (που αντιστοιχούν στη φάση προθέρμανσης του τροχιακού) παρατηρείται πολύ απότομη αύξηση της απόκλισης. Η αύξηση συνεχίζεται με πιο αργούς ρυθμούς μέχρι τα 1.7ns περίπου. Πέρα από αυτό το σημείο το τροχιακό σταθεροποιείται στα $1.86(\pm 0.08)\text{\AA}$. Η πορεία της απόκλισης των ατόμων του άλφα-άνθρακα γίνεται σταθερή

κοντά στα 0.3ns με μέσο όρο στα $0.77(\pm 0.12)\text{\AA}$ (Σχ.15B). Τα άτομα CA παρουσιάζουν διαμορφώσεις πλησιέστερα στην κρυσταλλική δομή από ότι η συνολική πρωτεΐνη, ενώ το εύρος των διακυμάνσεων της απόκλισής τους παρουσιάζεται ελαφρά μεγαλύτερο. Η τελευταία παρατήρηση ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι επειδή το πλήθος των ατόμων είναι μικρότερο, οι ουρές έχουν μεγαλύτερη επίδραση στο RMSD. Οι παραπάνω τιμές υποδεικνύουν ότι η κρυσταλλική δομή ακτίνων-X της Rop δεν υπόκειται μεγάλη αλλαγή σε υδατικό διάλυμα.

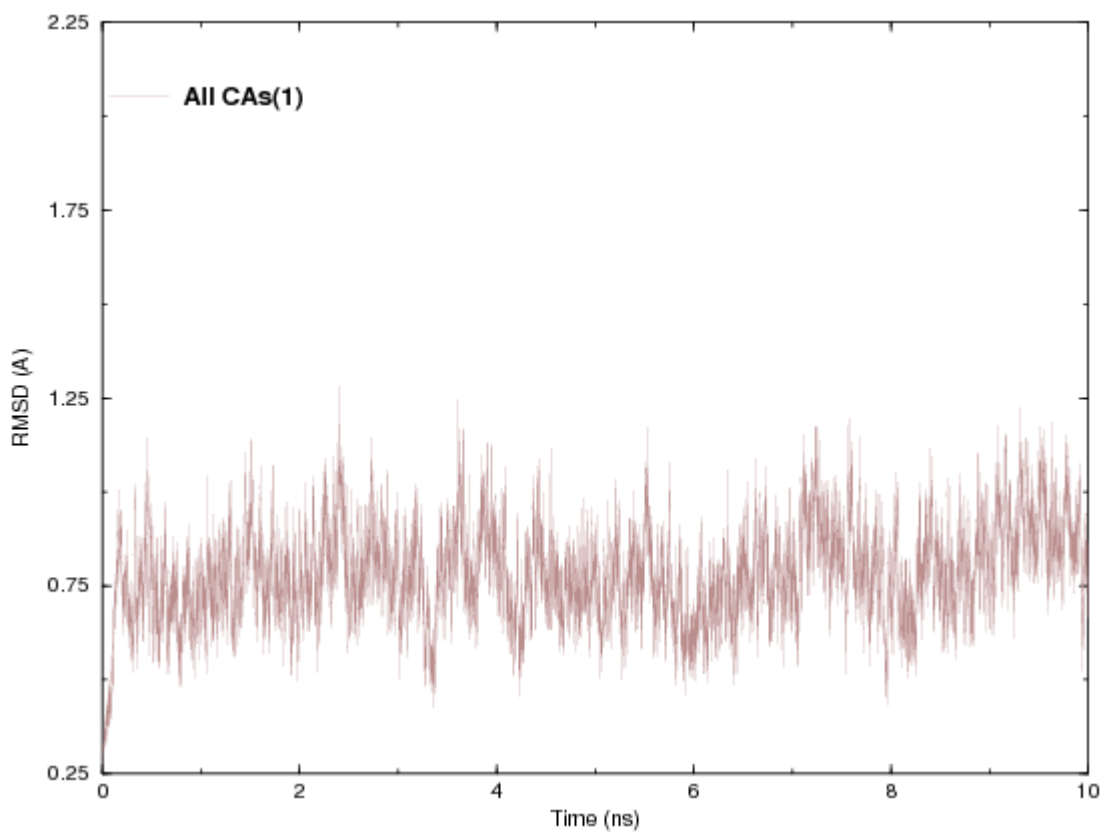
Προσομοίωση 2

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης προσομοίωσης η RMS απόκλιση της ολικής πρωτεΐνης από την αρχική δομή παρουσιάζει πολύ γρήγορη αύξηση στα πρώτα 0.1ns, κατά τα οποία το σύστημα εξισορροπείται (Σχ.16A). Μέχρι τα 0.9ns η αύξηση συνεχίζεται και έπειτα επιτυγχάνεται σταθεροποίηση της δομής στα $1.76(\pm 0.09)\text{\AA}$. Η πορεία της RMSD των ατόμων CA παρουσιάζει πλατώ αρκετά νωρίτερα, στα 0.4ns, με μέση τιμή στα $0.7(\pm 0.11)\text{\AA}$ (Σχ.16B). Οι συντεταγμένες των CA ατόμων εμφανίζουν κάπως εντονότερες διακυμάνσεις από αυτές της συνολικής πρωτεΐνης και μικρότερη απόκλιση από τη κρυσταλλική δομή. Γενικά σε κανένα από τα διαγράμματα δεν παρατηρούνται αλλαγές μεγάλης κλίμακας. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι δεν υπήρξαν μεγάλες αλλαγές στη διαμόρφωση της αρχικής δομής κατά το τρέξιμο της προσομοίωσης.

(A)

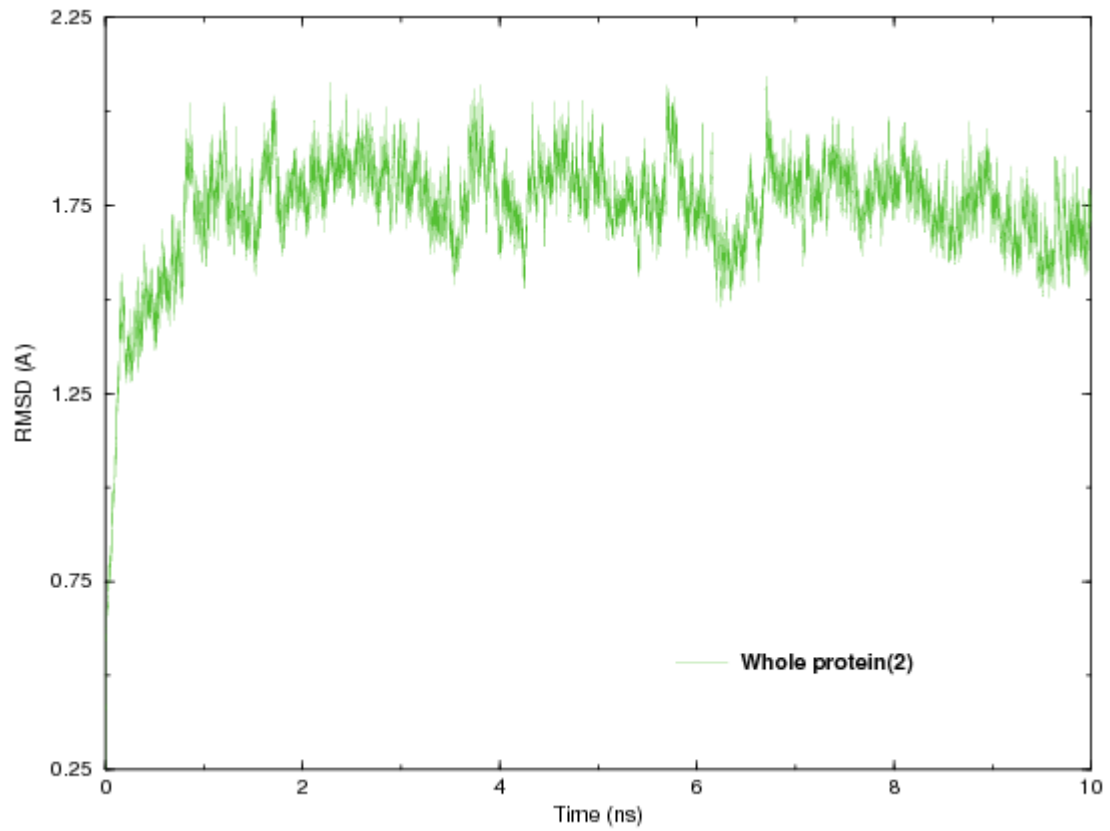


(B)

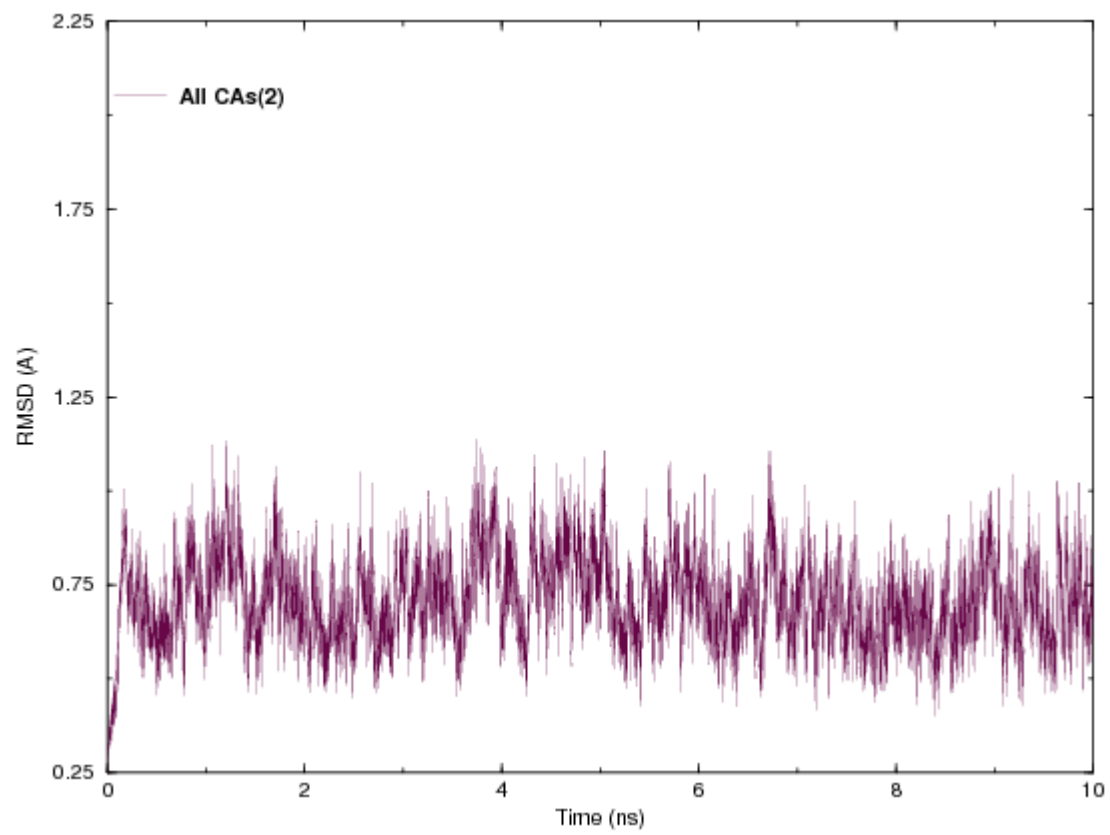


Σχ.15 RMSD των ατομικών θέσεων (A) όλων των ατόμων (B) των CA ατόμων της πρωτεΐνης σε σχέση με την αρχική δομή κατά τη διάρκεια της **προσομοίωσης 1**.

(A)



(B)



Σχ.16 RMSD των ατομικών θέσεων (A) όλων των ατόμων (B) των CA ατόμων της πρωτεΐνης σε σχέση με την αρχική δομή κατά τη διάρκεια της **προσομοίωσης 2**.

Υπολογισμός μέσης δομής και σταθερότητα δομών του τροχιακού

Η μέση δομή της πρωτεΐνης (μέσες τιμές των συντεταγμένων όλων των ατόμων της) υπολογίστηκε με το πρόγραμμα xplor [IV]. Η μέση τιμή των συντεταγμένων του ατόμου α ορίζεται ως:

$$\langle \vec{r}_\alpha \rangle = \frac{1}{N_t} \sum_{j=1}^{N_t} \vec{r}_\alpha(t_j)$$

Όπου N_t ο αριθμός των χρονικών βημάτων που διαρκεί η κίνηση της πρωτεΐνης και $\vec{r}_\alpha(t_j)$ η θέση (συντεταγμένες) του ατόμου α τη χρονική στιγμή t_j .

Κατόπιν υπολογίστηκε η RMSD από τη μέση δομή (xplor [IV]) που αποδίδεται από τον τύπο:

$$RMSD_\alpha(t_j) = \sqrt{\frac{\sum_{a=1}^{N_a} (\vec{r}_\alpha(t_j) - \langle \vec{r}_\alpha \rangle)^2}{N_a}}$$

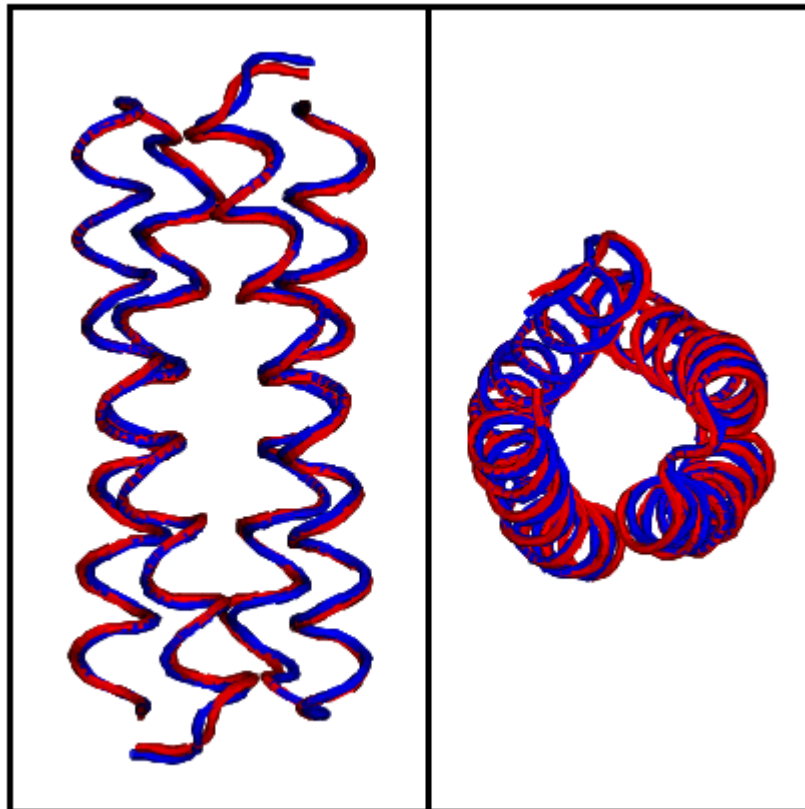
Όπου N_a ο αριθμός των ατόμων των οποίων οι θέσεις συγκρίνονται, $\vec{r}_\alpha(t_j)$ η θέση του ατόμου α τη χρονική στιγμή t_j και $\langle \vec{r}_\alpha \rangle$ η θέση του ατόμου α στη μέση δομή.

Προσομοίωση 1

Στο Σχ.17 φαίνεται η μέση δομή της Rop κατά την Προσομοίωση 1, σε σχέση με την αρχική της δομή (προηγέθηκε βέλτιστη υπέρθεση). Σημαντικές αποκλίσεις στη θέση των καταλοίπων παρουσιάζονται στα N'-τελικά άκρα των δύο μονομερών (κατάλοιπα 1-3). Επίσης διαφορές μικρότερης κλίμακας παρουσιάζονται σε άλλα κατάλοιπα των ελίκων (κατάλοιπα 10, 36, 37, 38, 44, 47) και των φουρκετών (κατάλοιπα 28, 32, 33). Τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν απόκλιση είναι στις περισσότερες περιπτώσεις τα ίδια στα δύο μονομερή.

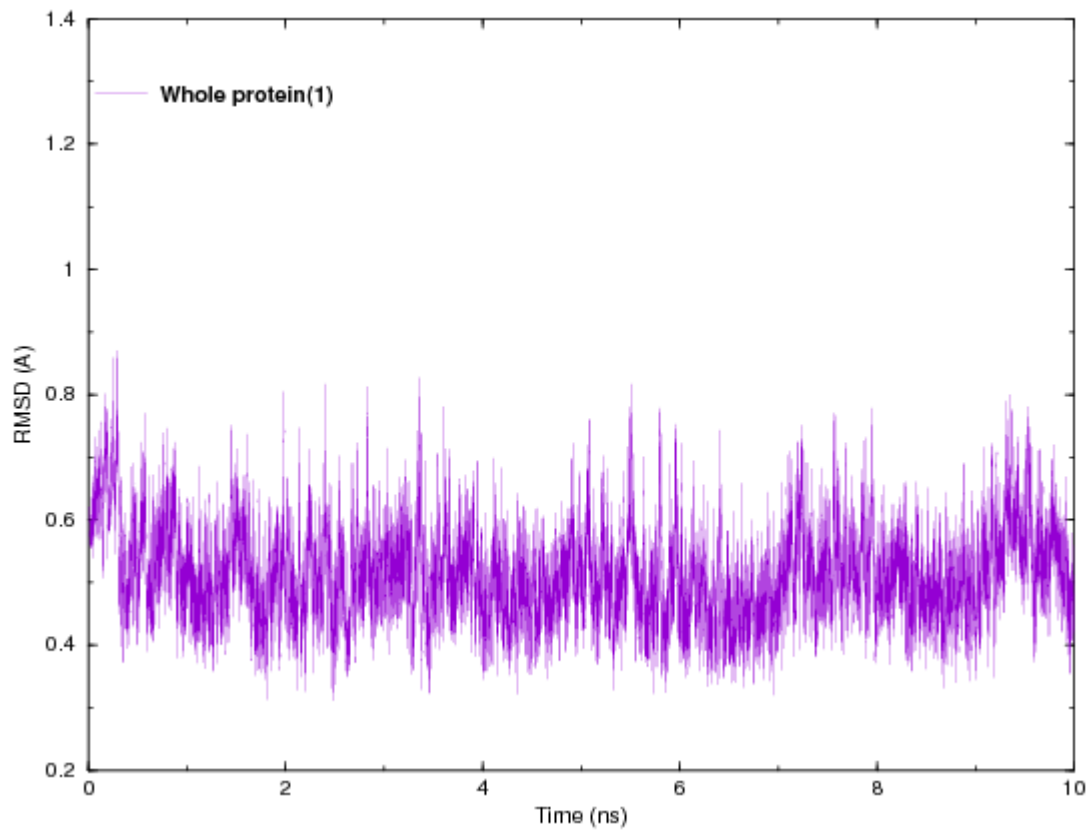
Η προκύπτουσα RMSD της πρωτεΐνης σε σχέση με τη μέση δομή κατά την προσομοίωση 1 παρουσιάζεται στο Σχ.18A. Εμφανίζει μέση τιμή γύρω στα $0.50(\pm 0.07)\text{\AA}$ και δεν παρουσιάζει απότομες μεταπτώσεις υποδεικνύοντας ότι δε συμβαίνουν μεγάλες αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Η RMS απόκλιση των CA ατόμων από τη μέση δομή ταλαντώνεται γύρω από τα $0.88(\pm 0.07)\text{\AA}$ (Σχ.18B), ενώ οι αντίστοιχες τιμές για το ένα μονομερές ($0.84(\pm 0.09)\text{\AA}$) (Σχ.18Γ) και τη μία έλικα ($0.38(\pm 0.09)\text{\AA}$) (Σχ.18Δ), υποδεικνύουν ότι τη μεγαλύτερη απόκλιση από τη μέση δομή παρουσιάζουν τα ακραία κατάλοιπα και η στροφή φουρκέτας κάθε μονομερούς.

Σχ.17 Σύγκριση της μέσης δομής της πρωτεΐνης Rop από το Τροχιακό 1 (κόκκινο χρώμα) με την αρχική της δομή (μπλε χρώμα), μετά από βέλτιστη χωρική υπέρθεση. Οι δομές παρουσιάζονται με τη μορφή "trace" και παρατηρούνται από μια πλευρική άποψη και την κάτοψη. (Οι εικόνες δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος VMD [XIX]).

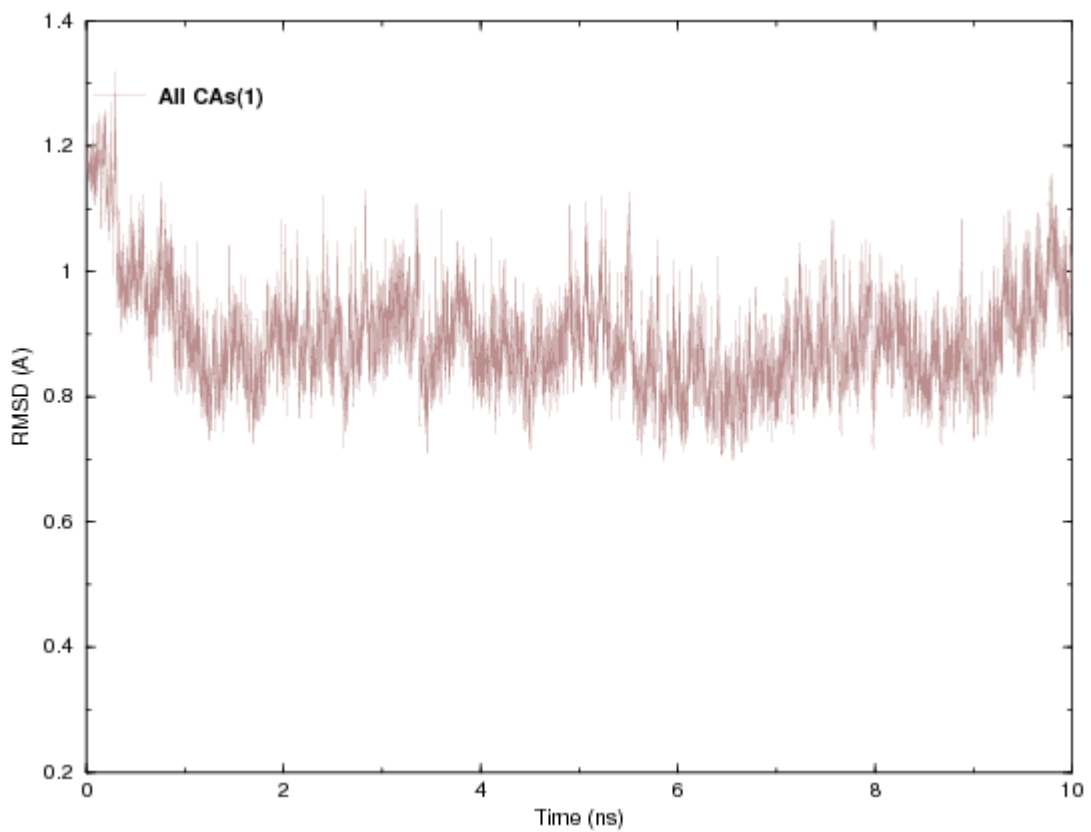


Σχ.18 RMSD των ατομικών θέσεων σε σχέση με τη μέση δομή κατά τη διάρκεια της **προσομοίωσης 1**, (A) για ολόκληρη την πρωτεΐνη, (B) για τα CA άτομα ολόκληρης της πρωτεΐνης, (Γ) για τα CA άτομα του ενός μονομερούς, (Δ) για τα CA άτομα της μιας έλικας.

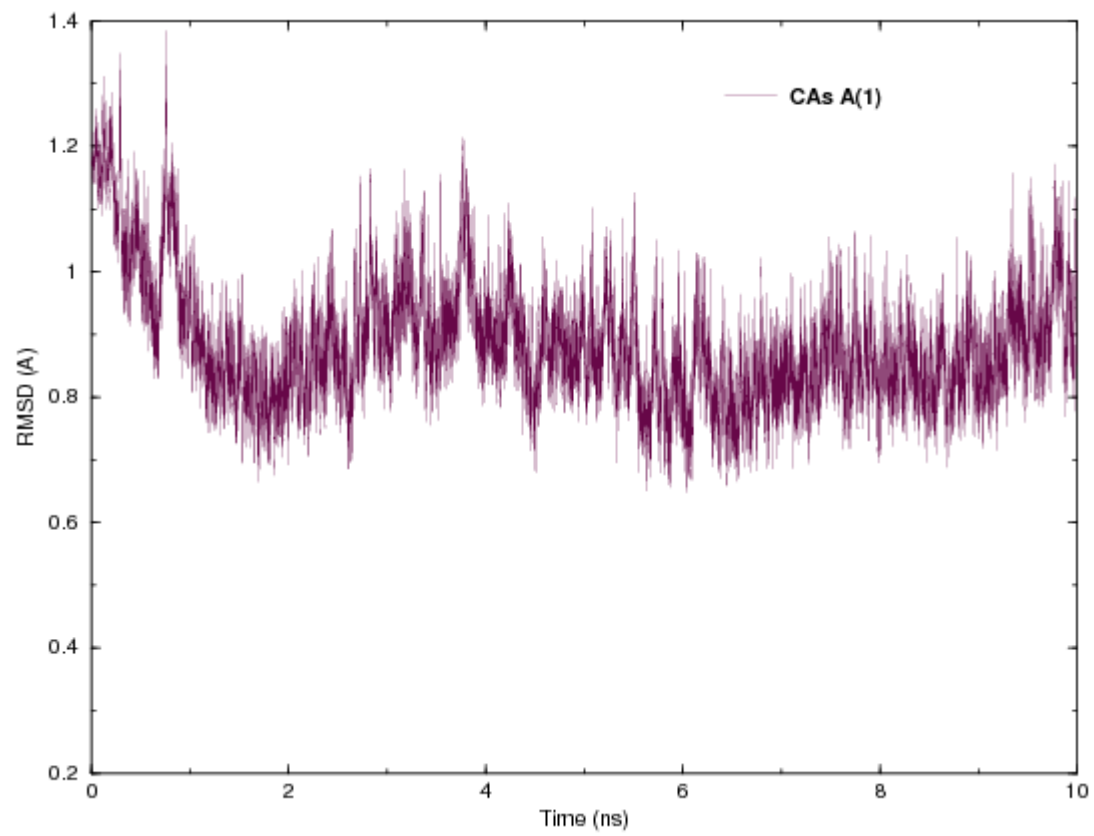
(A)



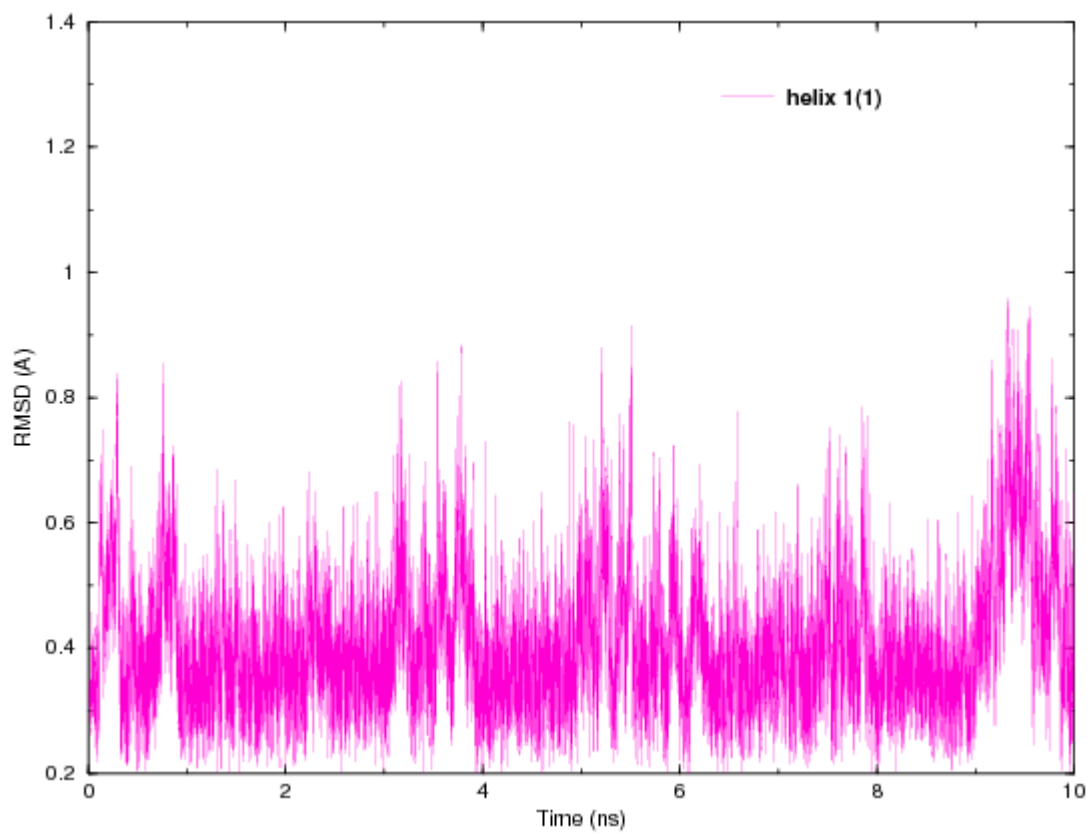
(B)



(F)



(Δ)

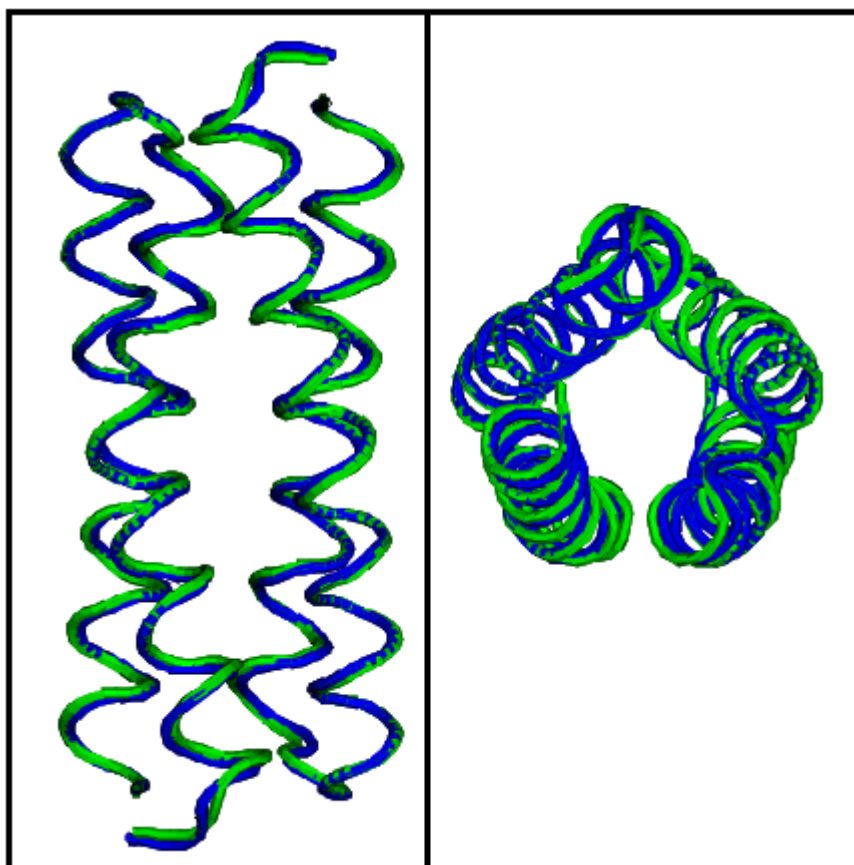


Προσομοίωση 2

Από τη σύγκριση της μέσης δομής της πρωτεΐνης με την αρχική της δομή (Σχ.19), παρατηρούνται διαφορές που εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές των N'-τελικών άκρων των μονομερών (κατάλοιπα 1-4). Αποκλίσεις επίσης παρατηρούνται σε ορισμένα κατάλοιπα των ελίκων (7, 26, 35, 54) και των φουρκετών των δύο μονομερών (28, 32, 33).

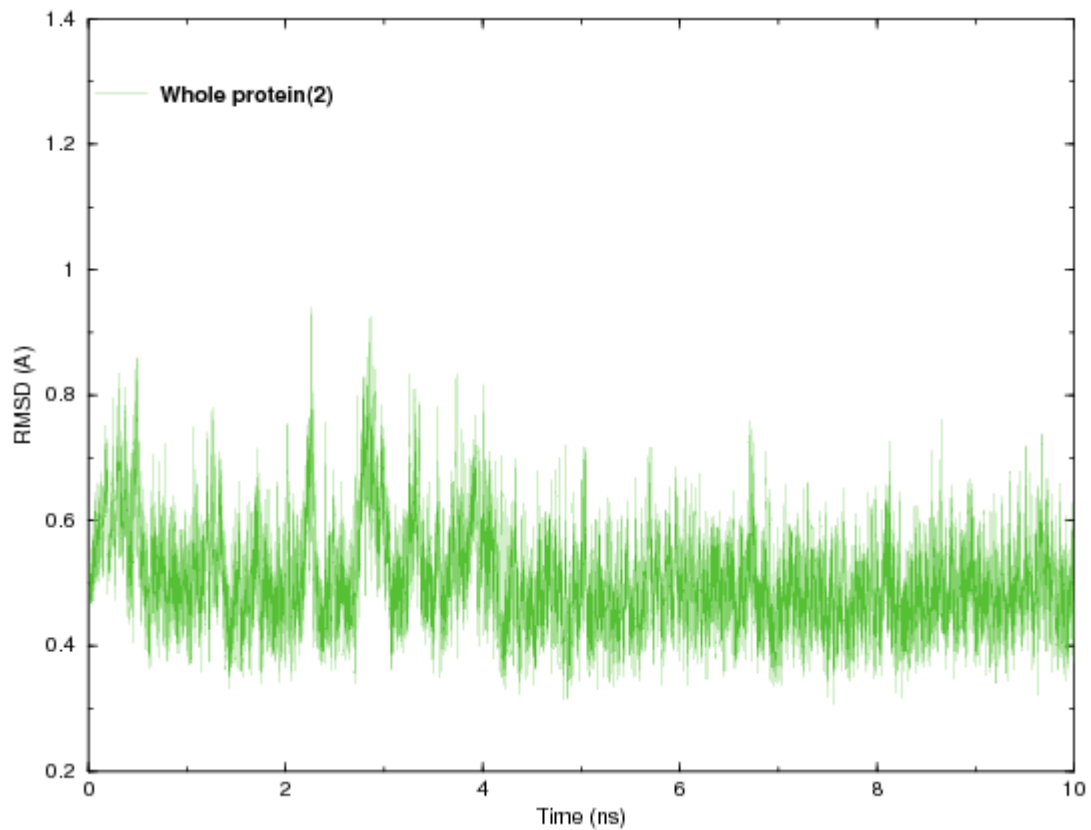
Κατά την πορεία της δεύτερης προσομοίωσης η RMSD της ολικής πρωτεΐνης σε σχέση με τη μέση δομή κυμαίνεται γύρω από τα $0.5(\pm 0.08)\text{\AA}$ (Σχ.20Α). Η αντίστοιχη μέση RMSD των CA ατόμων είναι $0.87(\pm 0.07)\text{\AA}$ (Σχ.20Β). Τα διαγράμματα της RMSD από τη μέση δομή δείχνουν ότι η πρωτεΐνη λαμβάνει μια καλά ορισμένη και σταθερή διαμόρφωση κατά την προσομοίωση. Οι τιμές της RMSD των CA ατόμων για το ένα μονομερές και τη μία έλικα της πρωτεΐνης είναι αντίστοιχα $0.88(\pm 0.10)\text{\AA}$ (Σχ.20Γ) και $0.40(\pm 0.11)\text{\AA}$ (Σχ.20Δ). Η μικρή σχετικά απόκλιση των ατόμων της έλικας υποδηλώνει ότι μεγαλύτερη απόκλιση επιδεικνύουν τα κατάλοιπα των στροφών, καθώς και τα αρχικά και τελικά άτομα κάθε μονομερούς.

Σχ.19 Σύγκριση της μέσης δομής της πρωτεΐνης Rop από το Τροχιακό 2 (πράσινο χρώμα) με την αρχική της δομή (μπλε χρώμα), μετά από βέλτιστη χωρική υπέρθεση. Οι δομές παρουσιάζονται με τη μορφή "trace" και παρατηρούνται από μια πλευρική άποψη και την κάτοψη. (Οι εικόνες δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος VMD [XIX]).

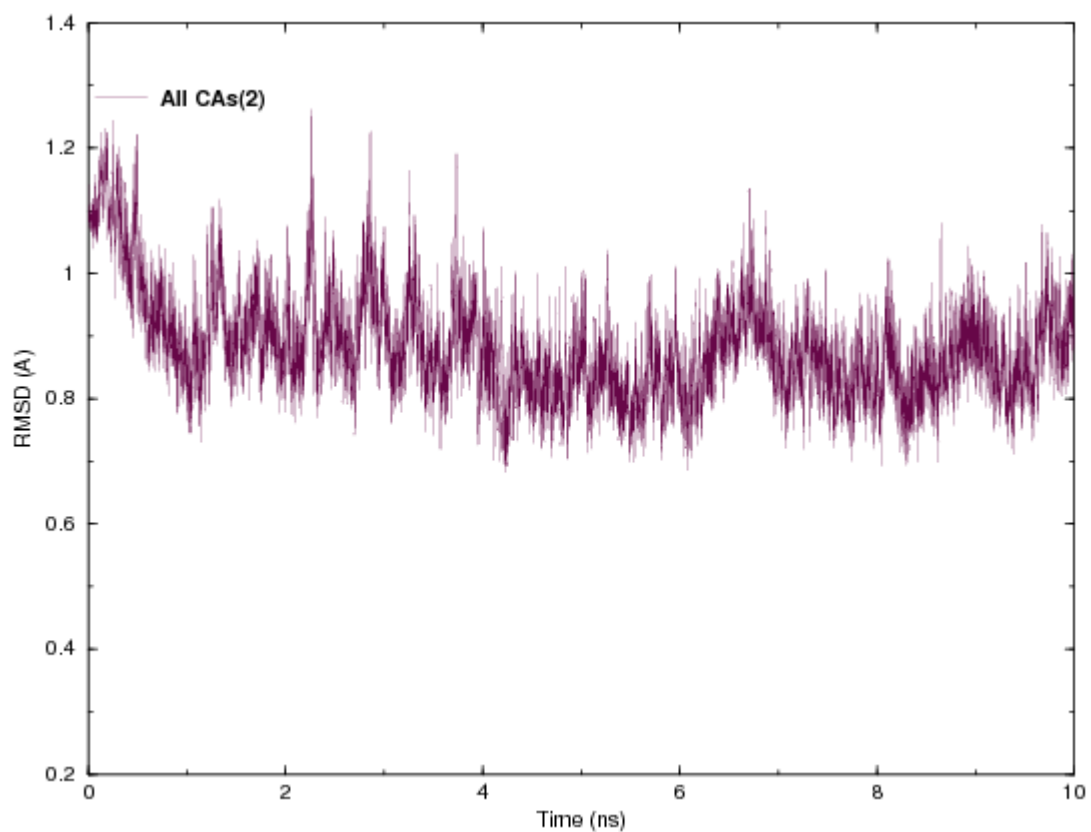


Σχ.20 RMSD των ατομικών θέσεων σε σχέση με τη μέση δομή κατά τη διάρκεια της **προσομοίωσης 2**, (A) για ολόκληρη την πρωτεΐνη, (B) για τα CA άτομα ολόκληρης της πρωτεΐνης, (Γ) για τα CA άτομα του ενός μονομερούς, (Δ) για τα CA άτομα της μιας έλικας.

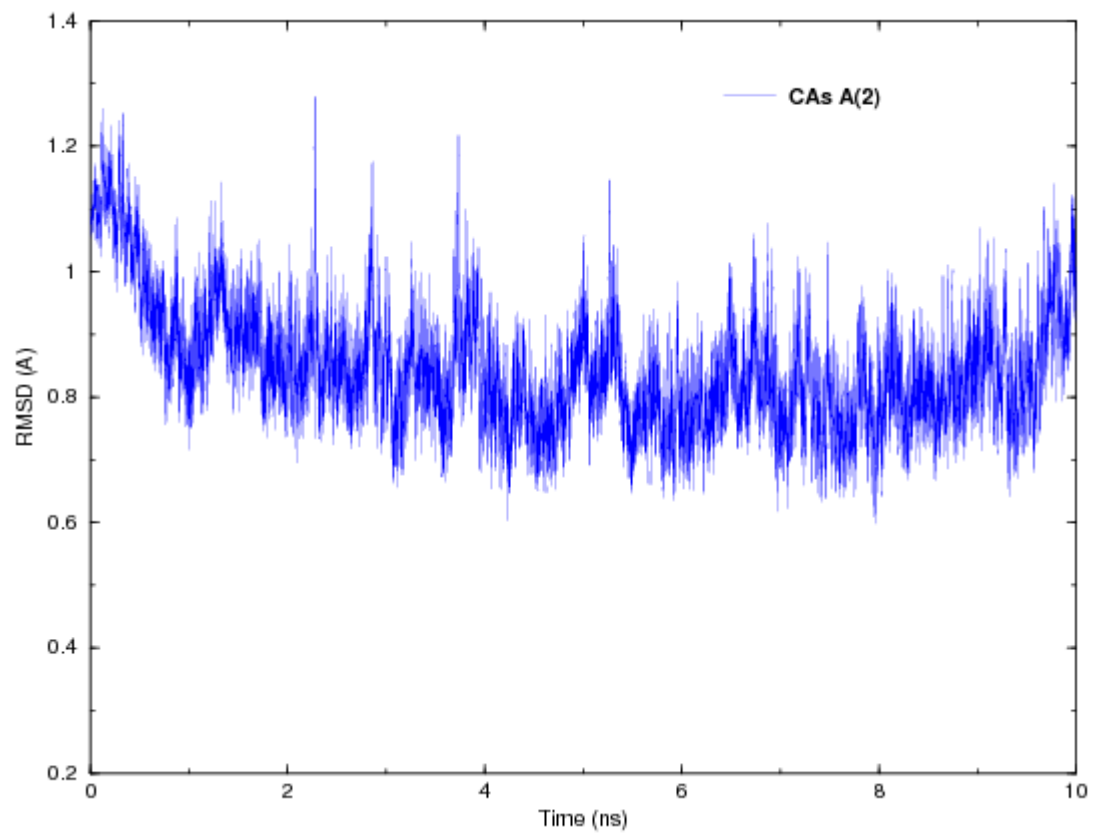
(A)



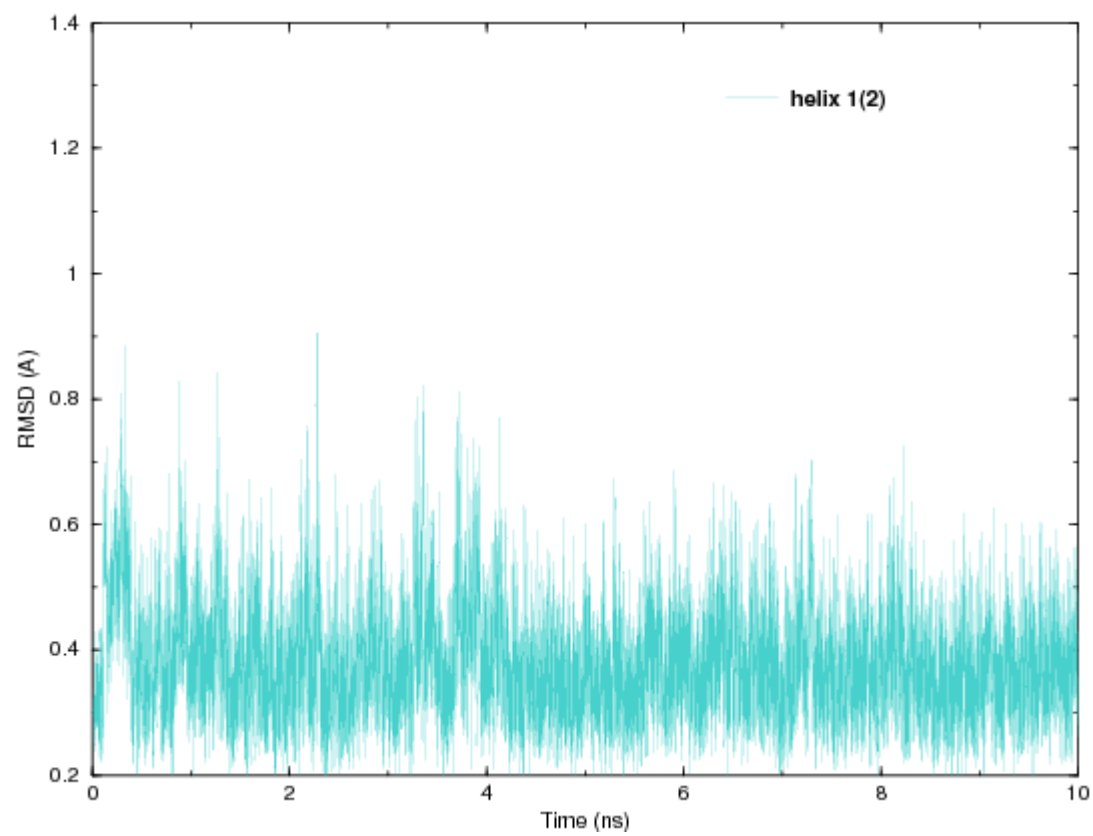
(B)



(F)



(Δ)



Ατομικές διακυμάνσεις

Οι RMS αποκλίσεις δεν αντανακλούν απαραίτητα την κινητικότητα των δομικών στοιχείων. Μία πιο σαφής πληροφορία για την κινητικότητα των περιοχών της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται συγκρίνοντας τις ρίζες της μέσης τετραγωνικής διακύμανσης (RMSF) των CA ατόμων κατά μήκος της πρωτεϊνικής αλληλουχίας [23] (με το πρόγραμμα xplor [IV]):

$$RMSF_{\alpha}(t_j) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N (\vec{r}_{\alpha}(t_j) - \langle \vec{r}_{\alpha} \rangle)^2}{N_{\alpha}}}$$

Όπου N ο αριθμός των στιγμιότυπων (frames) του τροχιακού, $\vec{r}_{\alpha}(t_j)$ οι συντεταγμένες του ατόμου α στο στιγμιότυπο j και $\langle \vec{r}_{\alpha} \rangle$ οι μέσες συντεταγμένες του ατόμου α στο τροχιακό. Η απόκλιση από τη μέση δομή κατά τη διάρκεια των δύο προσομοιώσεων δε φαίνεται να κατανέμεται ομοιόμορφα κατά μήκος της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (Σχ.21A).

Για τη σύγκριση των τιμών αυτών με τις πειραματικές τιμές, υπολογίστηκαν οι ατομικοί θερμικοί παράγοντες (B-factors) των προσομοιώσεων από τις RMSF των CA ατόμων από τον τύπο:

$$B_{\alpha} = \frac{8\pi^2}{3} (RMSF_{\alpha})^2$$

Ακολούθησε σύγκρισή τους με τους πειραματικά προσδιορισμένους ατομικούς θερμικούς παράγοντες από την κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Έχουν δοθεί, ωστόσο, ορισμένες εξηγήσεις για τις διαφορές μεταξύ των πειραματικών και των προσομοιούμενων θερμικών παραγόντων [30], που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αυτά τα δεδομένα θα πρέπει να συγκρίνονται πολύ προσεκτικά.

Προσομοίωση 1

Το Σχ.21A δείχνει τις μέσες ατομικές διακυμάνσεις των CA ατόμων κατά τη διάρκεια του τροχιακού κατά μήκος της πρωτεϊνικής αλληλουχίας και τονίζει τα ευκίνητα κατάλοιπα. Οι μεγαλύτερες διακυμάνσεις παρατηρούνται στα άκρα του κάθε μονομερούς της πρωτεΐνης. Τα ακραία κατάλοιπα όχι μόνο εμφανίζουν τη μεγαλύτερη κινητικότητα στη δομή αλλά κινούνται και πολύ γρήγορα. Οι δύο στροφές φουρκέτας $\Phi(A)$ και $\Phi(B)$ παρουσιάζουν επίσης μεγάλο RMSD. Τα τμήματα που ταλαντώνονται λιγότερο δίνοντας παρόμοιες τιμές RMSF είναι οι τέσσερις έλικες του μορίου. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς τα αμινοξέα των ελίκων συμβάλλουν στον υδρόφοβο πυρήνα. Χαρακτηριστικό είναι ότι στις περιοχές αυτές συμβαίνουν επαναλαμβανόμενες αυξομειώσεις της ατομικής διακύμανσης που αντιστοιχούν στην κατανομή των καταλοίπων σύμφωνα με το μοτίβο επτάδας (σελ.11). Τα

κατάλοιπα στις θέσεις a και d (κατάλοιπα υδρόφοβου πυρήνα) δείχνουν τη μικρότερη RMSF, ενώ τα εκτεθειμένα κατάλοιπα των υπόλοιπων θέσεων έχουν μεγαλύτερες τιμές RMSF.

Κατά τη σύγκριση, οι θερμικοί παράγοντες που υπολογίστηκαν από την προσομοίωση 1 εμφανίζονται συνεχώς χαμηλότεροι από τους πειραματικούς παράγοντες με εξαίρεση τα ακραία κατάλοιπα κάθε μονομερούς (Σχ.21B). Πιο συγκεκριμένα, στις περιοχές των φουρκετών οι πειραματικοί παράγοντες-B είναι διπλάσιοι των προσομοιούμενων, ενώ στις έλικες εμφανίζονται κατά μιάμιση φορά μεγαλύτεροι. Παρόλα αυτά οι περιοχές με τις υψηλότερες τιμές από τις προσομοιώσεις αντιστοιχούν αδρά στις περιοχές με τις υψηλότερες πειραματικές τιμές.

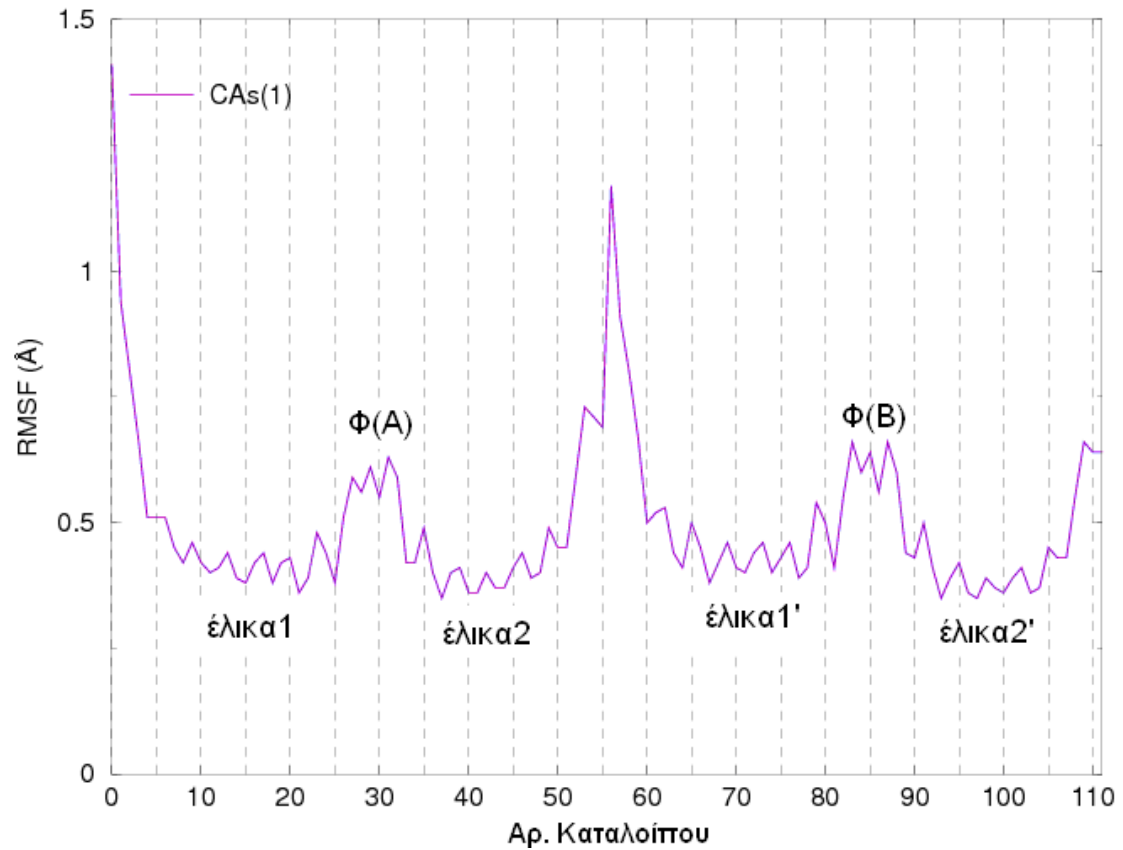
Προσομοίωση 2

Η ρίζα της μέσης τετραγωνικής διακύμανσης των CA ατόμων κατά μήκος της πρωτεΐνης απεικονίζεται στο Σχ.22A. Τα αρχικά και τελικά κατάλοιπα των μονομερών επιδεικνύουν πολύ μεγάλη RMSF που οφείλεται στον ασταθή και υπερκινητικό χαρακτήρα τους [3]. Οι περιοχές των στροφών φουρκέτας (κατάλοιπα 25-35, 81-91) εμφανίζουν επίσης αρκετά υψηλές διακυμάνσεις ενώ οι έλικες είναι οι λιγότερο ελαστικές δομές ειδικά στις περιοχές που διαμορφώνουν τον υδρόφοβο πυρήνα κάθε μονομερούς. Η οδοντωτή μορφή των διακυμάνσεων στις περιοχές των ελίκων προβάλλει την περιοδική κατανομή των καταλοίπων εντός και εκτός του υδρόφοβου πυρήνα σύμφωνα με το μοτίβο της επιτάδας (θέσεις a-g) (σελ.11).

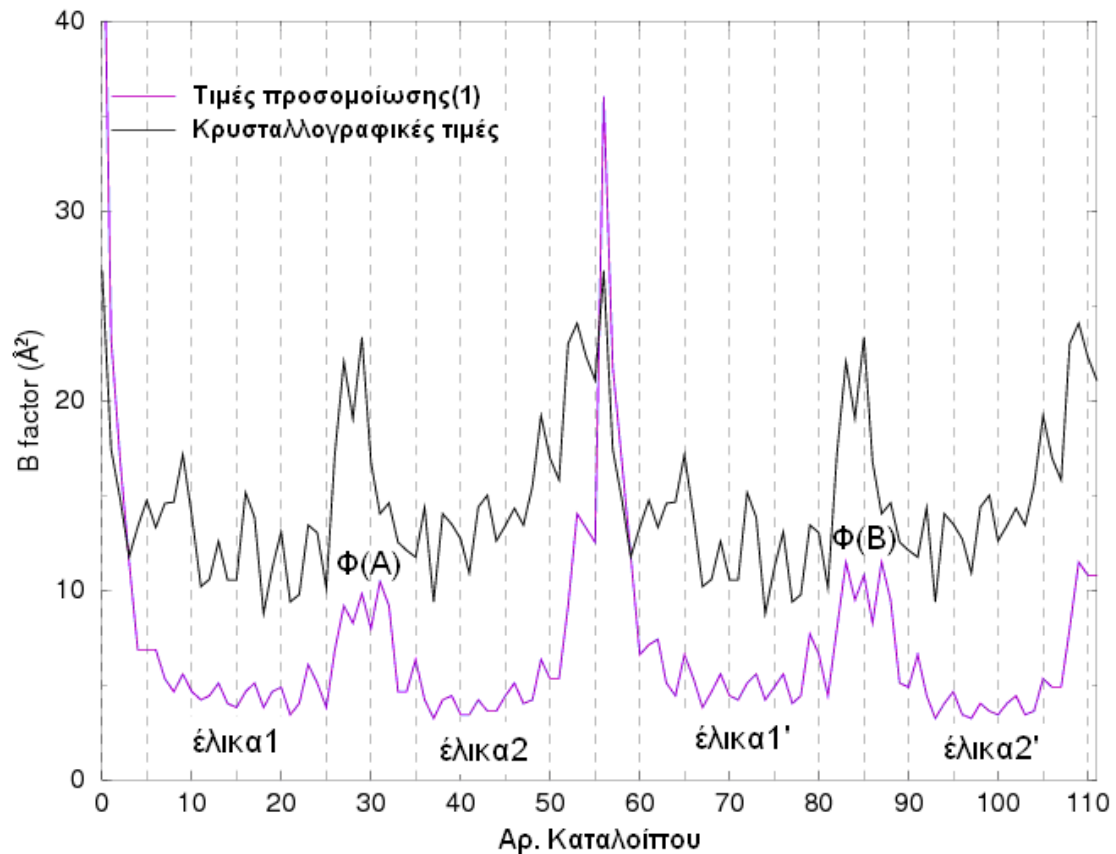
Συγκρίνοντας τους ατομικούς θερμικούς παράγοντες της προσομοίωσης με τους πειραματικούς (Σχ.22B) διαφαίνεται η σχεδόν συνεχής υπεροχή των δεύτερων σε σχέση με τους πρώτους κατά μήκος του μορίου (εξαίρεση αποτελούν τα άκρα κάθε μονομερούς). Στις περιοχές των ελίκων οι παράγοντες παρουσιάζονται μιάμιση φορά μεγαλύτεροι στη δομή των ακτίνων-X ενώ στις περιοχές των στροφών φουρκέτας η διαφορά φτάνει σχεδόν στο διπλό. Πάντως αξιοσημείωτο είναι ότι οι κορυφές της προσομοίωσης αντιστοιχούν χονδρικά στις κορυφές της κρυσταλλογραφικής δομής.

Σχ.21 (Α) RMSF των CA ατόμων της **προσομοίωσης 1** γύρω από τη μέση δομή κατά μήκος της πρωτεϊνικής αλληλουχίας. (Β) Σύγκριση των κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένων ατομικών θερμικών παραγόντων με αυτούς της προσομοίωσης 1.

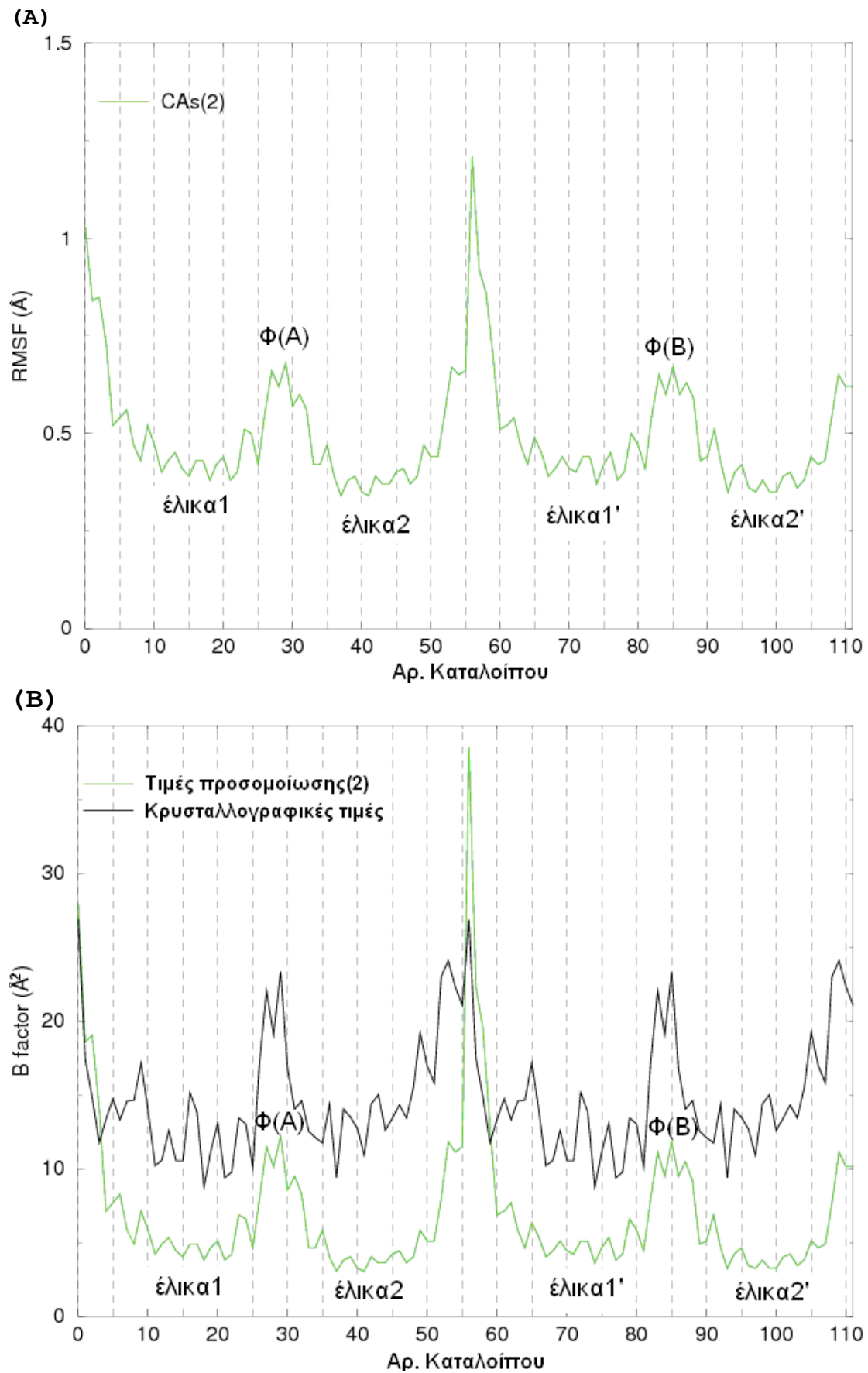
(Α)



(Β)



Σχ.22 (A) RMSF των CA ατόμων της **προσομοίωσης 2** γύρω από τη μέση δομή κατά μήκος της πρωτεϊνικής αλληλουχίας. (B) Σύγκριση των κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένων ατομικών θερμικών παραγόντων με αυτούς της προσομοίωσης 2.



Χάρτης μέσης CA-CA απόστασης και rms από αυτό

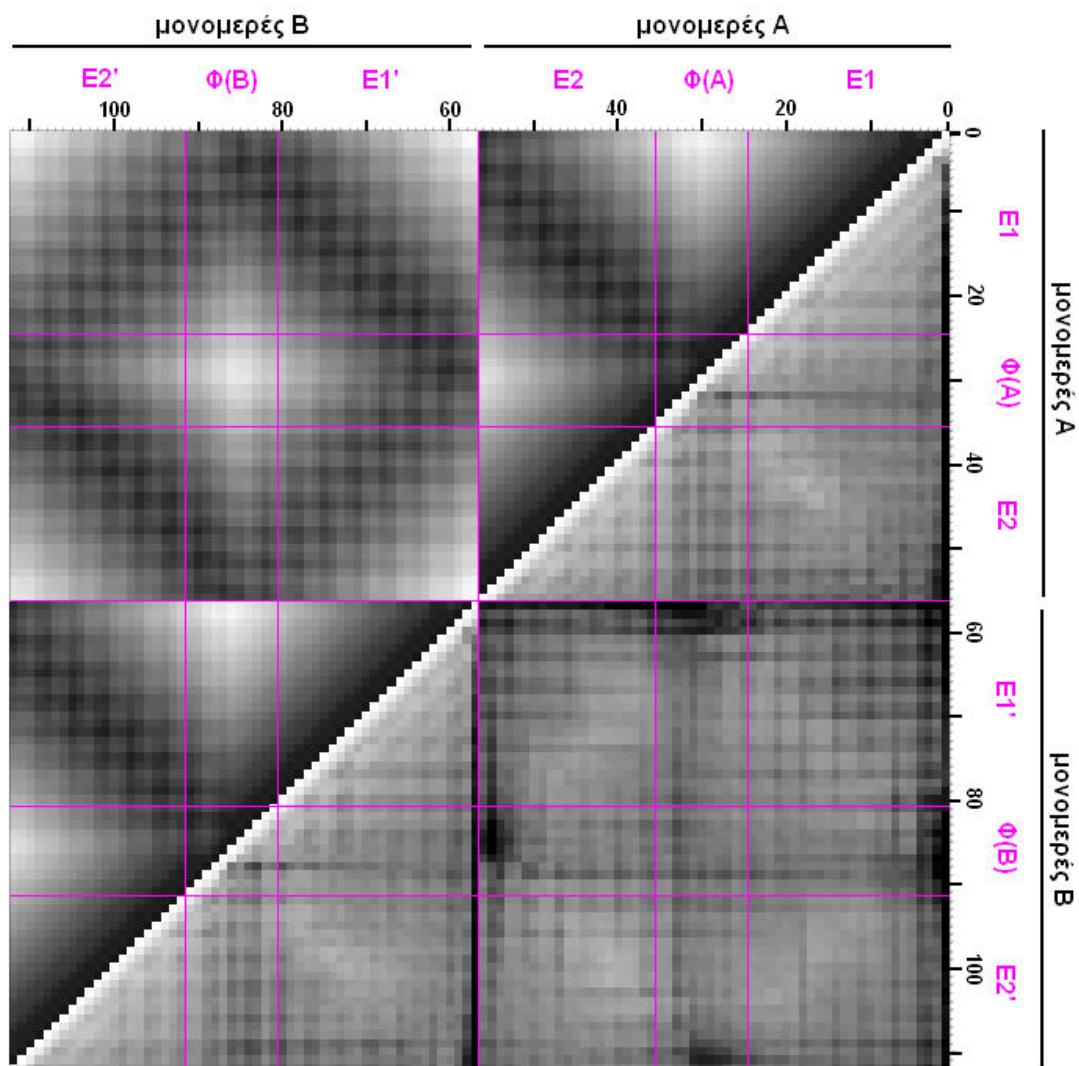
Για τη μελέτη των αποστάσεων μεταξύ των CA ατόμων της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων υπολογίσθηκαν οι χάρτες απόστασης και οι χάρτες RMSD (πρόγραμμα carma [VI]). Οι άξονες x και y στους χάρτες απεικονίζουν την αλληλουχία της πρωτεΐνης κατά αύξοντα αριθμό καταλοίπων (ατόμων CA) από αριστερά προς τα δεξιά και από πάνω προς τα κάτω (Σχ.23-24). Η απόχρωση καθενός σημείου $P(x,y)$ στο χάρτη απόστασης αναπαριστά τη μέση απόσταση (κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης) μεταξύ των ατόμων CA που αντιστοιχούν στις συντεταγμένες του (x και y). Οι κοντινές αποστάσεις αναπαρίστανται με μαύρες αποχρώσεις, οι ενδιάμεσες αποστάσεις με γκρι και οι μεγάλες αποστάσεις με λευκό. Στο χάρτη RMSD ο χρωματισμός αναπαριστά τις RMS αποκλίσεις από τις προαναφερθείσες μέσες αποστάσεις και είναι αντεστραμμένος (οι σκουρότερες περιοχές αντιστοιχούν σε υψηλότερο RMSD). Οι παραπάνω χάρτες υποδεικνύουν τη συμπεριφορά των διαφόρων δομικών στοιχείων της πρωτεΐνης κατά την κίνησή τους, καθώς και τη σχετική κίνηση των δομικών στοιχείων των δύο μονομερών. Από τη στιγμή που κάθε διάγραμμα είναι πανομοιότυπο κατά το ήμισυ με άξονα συμμετρίας τη διαγώνιο, οι δυο χάρτες ενοποιήθηκαν για ευκολότερη σύγκριση σε ένα χάρτη συγχώνευσης.

Προσομοίωση 1

Στο χάρτη απόστασης της προσομοίωσης 1 (Σχ.23 πάνω μισό) πολλαπλές τριτοταγείς επαφές μεταξύ διαφορετικών τμημάτων δευτεροταγούς δομής είναι εμφανείς (μαύρες περιοχές στο διάγραμμα). Εντός των μονομερών η στροφή φουρκέτας $\Phi(A)$ βρίσκεται πλησίον του C' -τελικού άκρου της έλικας 1 και το N' -τελικό άκρο της έλικας 2 (αντιστοίχως η $\Phi(B)$ με $C'-E1'$ και $N'-E2'$). Μεταξύ των μονομερών, οι δύο φουρκέτες φαίνεται να απέχουν πολύ μεταξύ τους, ενώ επαφές παρατηρούνται μεταξύ της $\Phi(A)$, του N' -τελικού άκρου της έλικας $E1'$ και του C' -τελικού άκρου της έλικας $E2'$ (αντίστοιχα μεταξύ της $\Phi(B)$, $N'-E1$ και $C'-E2$). Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν με τη δομή της Rop (Σχ.1).

Η κινητικότητα κάθε τμήματος της πρωτεΐνης διαφάνεται στο διάγραμμα RMSD (Σχ.23 κάτω μισό). Μεγάλη κινητικότητα γενικά παρουσιάζουν τα N' -τελικά κατάλοιπα των $E1$ και $E1'$ και οι δύο στροφές φουρκέτας του μορίου (εμφανίζουν μεγάλη RMS απόκλιση κατά μήκος όλοκληρης της δομής). Κατά τα άλλα εντός των μονομερών δε φαίνεται να επισυμβαίνουν μεγάλες κινήσεις ενώ μεταξύ των δύο μονομερών οι μαυρισμένες περιοχές στο διάγραμμα υποδηλώνουν κάπως έντονη κινητικότητα ορισμένων περιοχών σε σχέση με άλλες. Πιο συγκεκριμένα μεγάλο εύρος κινητικότητας επιδεικνύει η κάθε φουρκέτα σε σχέση με τα άκρα των ελίκων του άλλου μονομερούς ($\Phi(A)$ με $N'-E1'$ και $C'-E2'$, $\Phi(B)$ με $N'-E1$ και $C'-E2$). Τα «λευκά» τμήματα του

χάρτη δείχνουν τμήματα του μορίου που κινούνται σε φάση (σαν rigid bodies). Συνεπώς, κάθε έλικα φαίνεται να συμπεριφέρεται ως ένα στερεό σώμα. Οι σχετικές κινήσεις μεταξύ των διαφόρων ελίκων των δύο μονομερών σχετίζεται με τη μεταξύ τους διάταξη (οι παράλληλες έλικες κινούνται στην ίδια φάση κατά μήκος της αλληλουχίας τους).

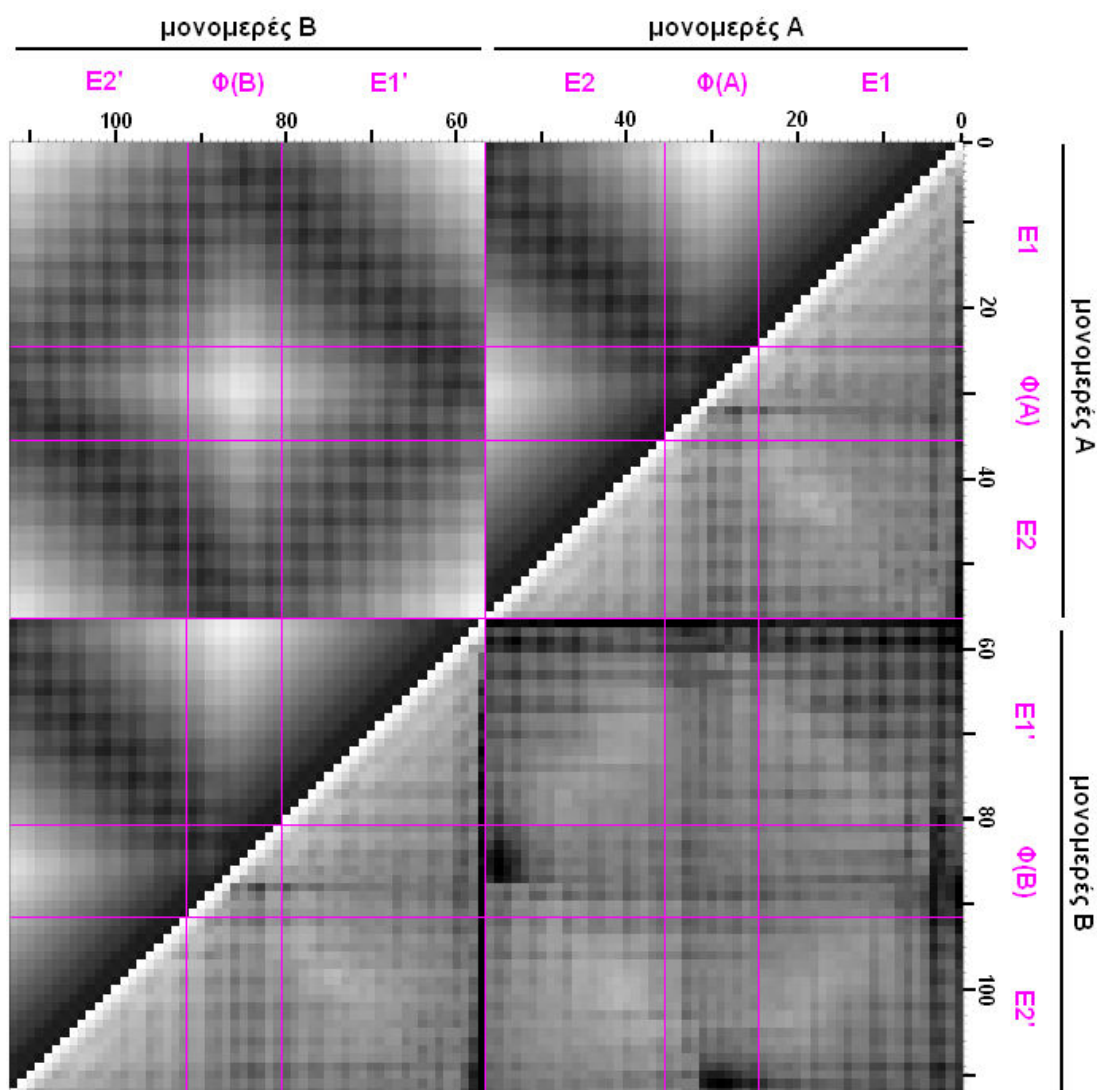


Σχ.23 Ενοποίηση του χάρτη αποστάσεων Ca-Ca (πάνω μισό) και του χάρτη Ca-Ca RMSD (κάτω μισό) της **προσομοίωσης 1**. Οι αριθμοί δείχνουν τον αριθμό των καταλοίπων ενώ με ροζ οριοθετούνται οι διαφορετικές δευτεροταγείς δομές της πρωτεΐνης. E: έλικες, Φ: στροφές φουρκέτας.

Προσομοίωση 2

Στον χάρτη απόστασης της προσομοίωσης 2 (Σχ.24 πάνω μισό) διακρίνονται οι τύποι των επαφών μεταξύ των διαφορετικών δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης (μαύρες περιοχές). Όπως ήταν αναμενόμενο από την ήδη γνωστή δομή της Rop (Σχ.1) το διάγραμμα παρουσιάζει συμμετρία εξαιτίας της ομοιότητας των δύο μονομερών. Εφόσον κάθε μονομερές αποτελείται από δύο έλικες που ενώνονται στο ένα άκρο τους με μία στροφή φουρκέτας, εντός κάθε μονομερούς (πάνω τριγωνικές περιοχές στο διάγραμμα)

παρατηρούνται επαφές μεταξύ της στροφής φουρκέτας και των αντίστοιχων άκρων των ελίκων ($\Phi(A)$ με C' -τελικό άκρο της $E1$ και N' -τελικό άκρο της $E2$, $\Phi(B)$ με C' - $E1'$ και N' - $E2'$). Η αντιπαράλληλη διάταξη των δύο όμοιων μονομερών ερμηνεύει τις δια-μονομερείς επαφές (τετράγωνο πάνω αριστερά). Για παράδειγμα, οι όμοιες έλικες ($E1$ με $E1'$ και $E2$ με $E2'$) συγκλίνουν στα αντίθετα άκρα τους (N' -τελικό με C' -τελικό).



Σχ.24 Ενοποίηση του χάρτη αποστάσεων Ca-Ca (πάνω μισό) και του χάρτη Ca-Ca RMSD (κάτω μισό) της **προσομοίωσης 2**. Οι αριθμοί δείχνουν τον αριθμό των καταλοίπων ενώ με ροζ οριοθετούνται οι διαφορετικές δευτεροταγείς δομές της πρωτεΐνης. E: έλικες, Φ: στροφές φουρκέτας.

Όσον αφορά την κινητικότητα του μορίου από τον χάρτη RMSD (Σχ.24 κάτω δεξιά) διαπιστώνεται ότι εντός των μονομερών οι ευρύτερες κινήσεις είναι αυτές των φουρκετών και των ευκίνητων αρχικών (N' -τελικών) καταλοίπων των ελίκων $E1$ και $E1'$. Σημαντική και περισσότερη κινητικότητα παρατηρείται στο κάθε μονομερές σε σχέση με το άλλο (μαύρες περιοχές στο τετράγωνο κάτω δεξιά). Τα άκρα των ελίκων του ενός μονομερούς κινούνται αρκετά σε σχέση με τη στροφή φουρκέτας και τα άκρα των ελίκων του άλλου μονομερούς. Από τη μελέτη των «λευκών» τμημάτων του

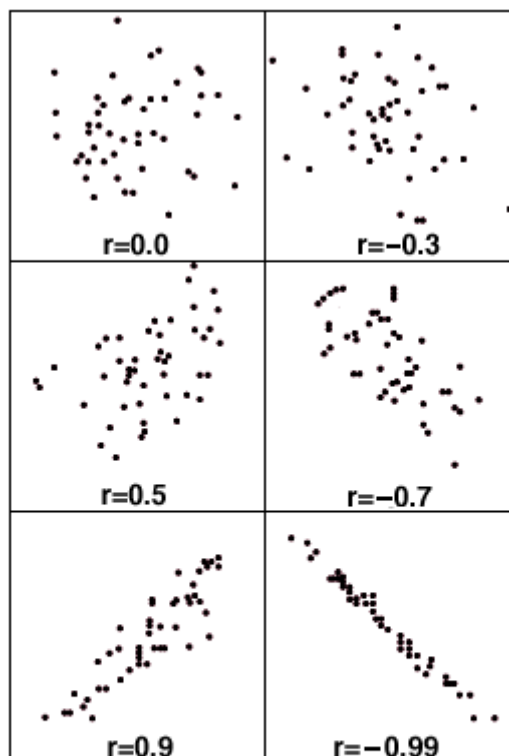
διαγράμματος γίνεται φανερό ότι οι έλικες συμπεριφέρονται ως στερεά σώματα, ενώ οι σχέσεις μεταξύ των ελίκων των διαφορετικών μονομερών φαίνεται να εξαρτώνται από τη σχετική τους διάταξη (παράλληλη ή αντιπαράλληλη).

Ανάλυση cross-correlation

Για περαιτέρω αξιολόγηση της κίνησης της πρωτεΐνης υπολογίστηκαν οι cross-correlations των διακυμάνσεων μεταξύ των ατόμων CA (πρόγραμμα carma [VI]). Η cross-correlation (covariance) αποτελεί στατιστικό μέτρο της σχετικής διασποράς μεταξύ δύο ομάδων δεδομένων, πόσο δηλαδή αυτά διαφέρουν από τη μέση τιμή σχετικά το ένα με το άλλο (Σχ.25). Όσο πιο στενά συγκεντρώνονται τα σημεία σε ομάδες, τόσο πιο υψηλή είναι η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών και τόσο μεγαλύτερη η ικανότητα να προβλεφθεί η μία μεταβλητή από την άλλη.

Σε αυτή την ανάλυση υπολογίστηκαν και παρουσιάζονται με τη μορφή διαγράμματος οι cross-correlations ανάμεσα στις διακυμάνσεις των ατόμων CA της Rop (Σχ.26). Οι δύο κάθετοι άξονες απεικονίζουν τον αριθμό των καταλοίπων της πρωτεΐνης, ενώ η τιμή της cross-correlation παρουσιάζεται με τη μορφή χρωματικού κώδικα (με αύξουσα τιμή από τα ψυχρά προς τα θερμά χρώματα) (πρόγραμμα gnuplot [XXII]). Οι υψηλές θετικές τιμές cross-correlation των διακυμάνσεων υποδηλώνουν ίδια φάση κίνησης των ατόμων, οι μηδενικές τιμές διαφορετικές φάσεις κίνησης, ενώ οι αρνητικές τιμές αντίθετες φάσεις κίνησης.

Στη συνέχεια ακολούθησε σύγκριση των διαγραμμάτων των cross-correlations από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής με διαγράμματα cross-correlations που προέκυψαν από πειραματικά δεδομένα (δομές NMR). Οι δομές NMR προήλθαν από τη βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB) [XIII]. Από αυτές τις δομές δημιουργήθηκε ένα ψευδοτροχιακό (πρόγραμμα VMD [XIX]) από το οποίο με το πρόγραμμα carma [VI] υπολογίστηκε το διάγραμμα των cross-correlations. Τα NMR-διαγράμματα, σε αντίθεση με αυτά των προσομοιώσεων, διαθέτουν και τα καρβοξυτελικά άκρα των



Σχ.25 Γραφικές παραστάσεις δύο μεταβλητών ταυτόχρονα και οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης σε κάθε περίπτωση. Όσο πιο συγκεντρωμένα είναι τα σημεία, τόσο πιο μεγάλη είναι η απόλυτη τιμή του συντελεστή.

μονομερών της πρωτεΐνης. Η μορφή ψηφιδωτού οφείλεται πιθανώς στον μικρό αριθμό των δομών NMR (δέκα) που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό.

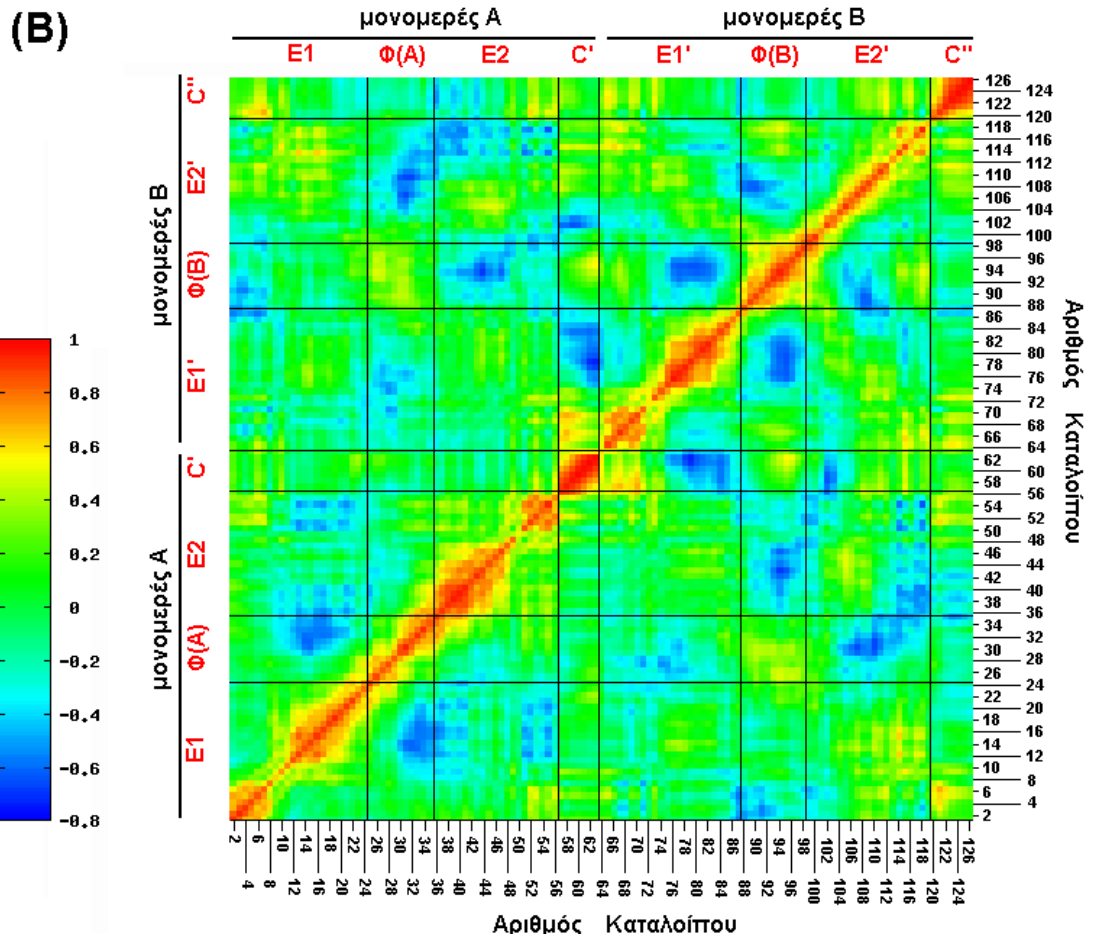
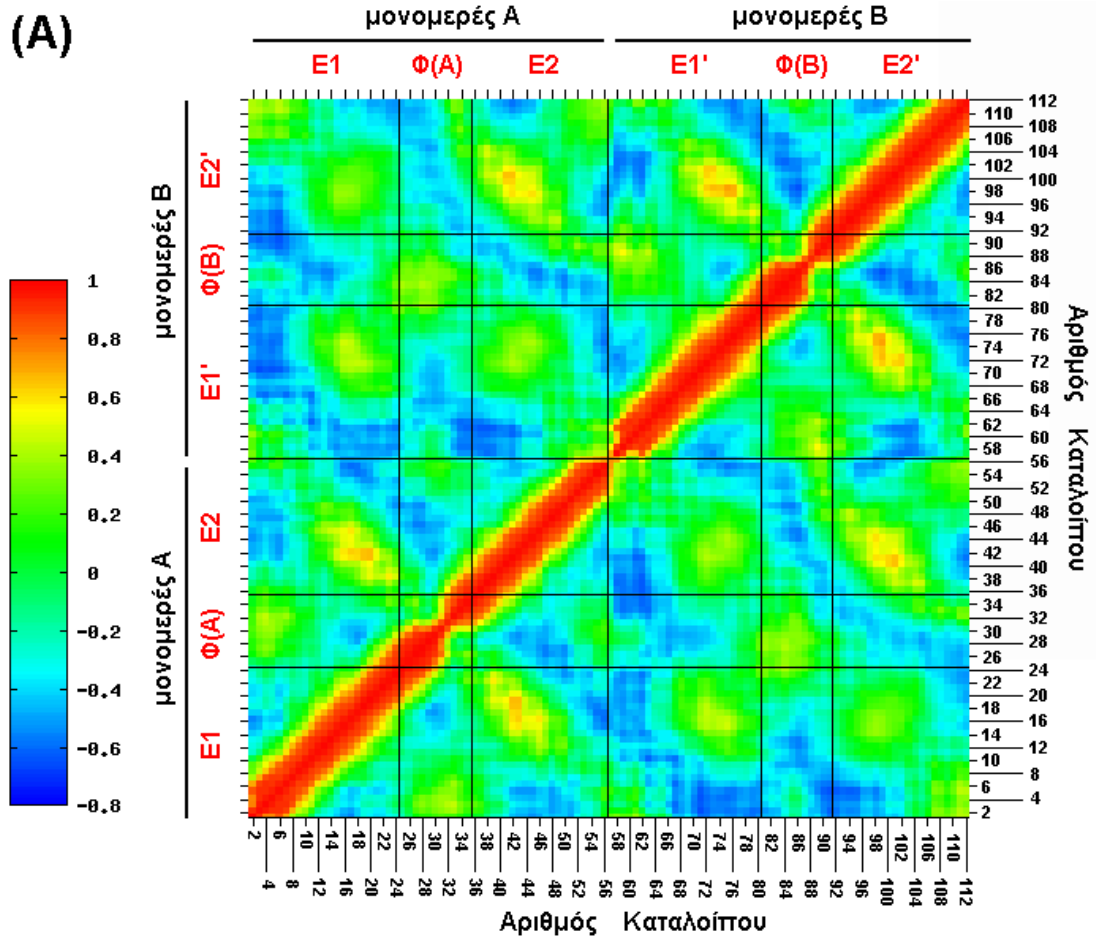
Προσομοίωση 1

Από τη μελέτη του διαγράμματος των cross-correlation (Σχ.26A) προκύπτει ότι οι έλικες δίνουν περιοχές θετικής συσχέτισης κατά μήκος της διαγωνίου για αποστάσεις αλληλουχίας $\Delta \leq 4.5$. Σε αντίθεση, τα ζεύγη ατόμων στην κορυφή των στροφών φουρκέτας συγκλίνουν για $\Delta \leq 1.5$. Τα στοιχεία εκτός της διαγωνίου αποτελούν ζεύγη ατόμων που κινούνται προς την ίδια μεριά και είναι μη συνεχόμενα στην αλληλουχία. Γενικώς παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ όλων των ελίκων, και των ελίκων εντός του κάθε μονομερούς και αυτών μεταξύ των δύο μονομερών. Ο τρόπος που κατανέμονται οι περιοχές θετικής συσχέτισης μεταξύ των ελίκων, και συνεπώς ο τρόπος κίνησής τους, συσχετίζεται με τον τρόπο διάταξης των εκάστοτε ελίκων (παράλληλος ή αντιπαράλληλος). Οι δύο φουρκέτες φαίνεται να κινούνται στην ίδια φάση μεταξύ τους, όπως και με την πρώτη έλικα του κάθε μονομερούς (έλικα 1 και έλικα 1' με τις φουρκέτες A και B αντίστοιχα). Από τις μπλε περιοχές του διαγράμματος φαίνεται ποια τμήματα της πρωτεΐνης κινούνται σε αντίθετες φάσεις. Κατά τη σύγκριση με το διάγραμμα από τα πειραματικά δεδομένα (Σχ.26B) παρατηρείται ομοιότητα όσον αφορά τις περιοχές μεγάλης συσχέτισης (κίτρινες περιοχές), αν και εμφανίζονται ορισμένες αποκλίσεις (πχ. στη συσχέτιση μεταξύ των ελίκων 1 και 2).

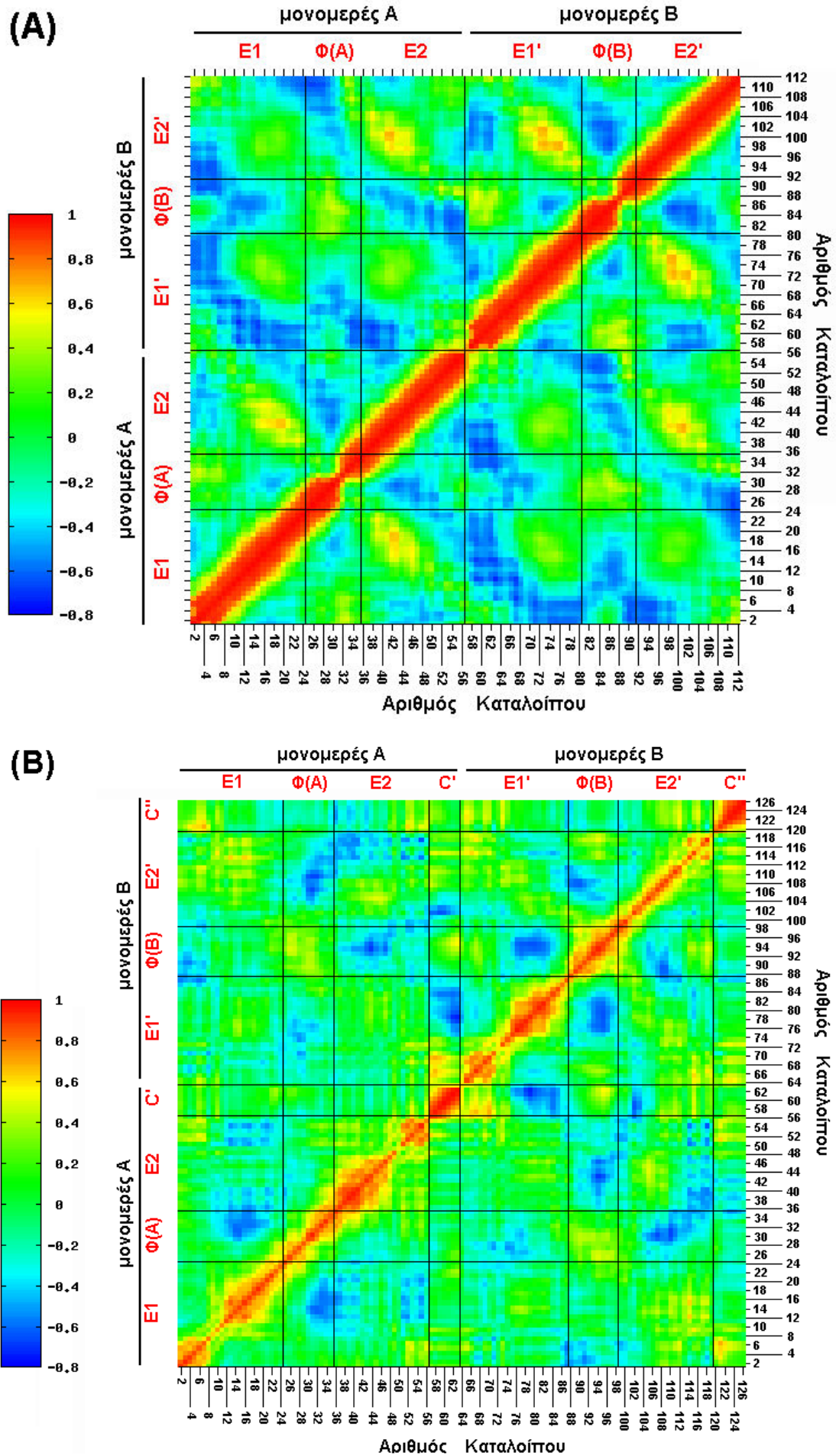
Προσομοίωση 2

Στο χάρτη των cross-correlations (Σχ.27A) διακρίνεται ότι οι συσχετίσεις μεταξύ των ατόμων στις α-έλικες συγκλίνουν για αποστάσεις αλληλουχίας $\Delta \leq 4.5$, ενώ τα ζεύγη ατόμων στην κορυφή των στροφών φουρκέτας συγκλίνουν μόνο για $\Delta \leq 1.5$. Όσον αφορά τα διαφορετικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής, όλες οι διαφορετικές έλικες φαίνεται να συσχετίζονται στην κίνησή τους και με τρόπο που εξαρτάται από τη μεταξύ τους διάταξη (παράλληλη ή αντιπαράλληλη). Επίσης, οι φουρκέτες των δύο μονομερών παρουσιάζουν μεγάλη θετική συσχέτιση. Οι μπλε περιοχές του διαγράμματος υποδεικνύουν τις περιοχές της πρωτεΐνης που κινούνται αντίθετα μεταξύ τους. Σε σχέση με το χάρτη cross-correlation που προκύπτει από τις δομές NMR (Σχ.27B) δεν εμφανίζονται ιδιαίτερες διαφορές, υποδεικνύοντας την ομοιότητα των κινήσεων που υπαγορεύονται από την προσομοίωση και τη διαδικασία NMR.

Σχ.26 Χάρτες cross-correlation για τα ζεύγη ατόμων Ca της Rop. (A) Από την Προσομοίωση 1. (B) Από τα πειραματικά δεδομένα NMR (E: έλικα, Φ: φουρκέτα, C: καρβοξυτελικό άκρο).



Σχ.27 Χάρτες cross-correlation για τα ζεύγη ατόμων Ca της Rop. (A) Από την Προσομοίωση 2. (B) Από τα πειραματικά δεδομένα NMR (E: έλικα, Φ: φουρκέτα, C: καρβοξυτελικό άκρο).



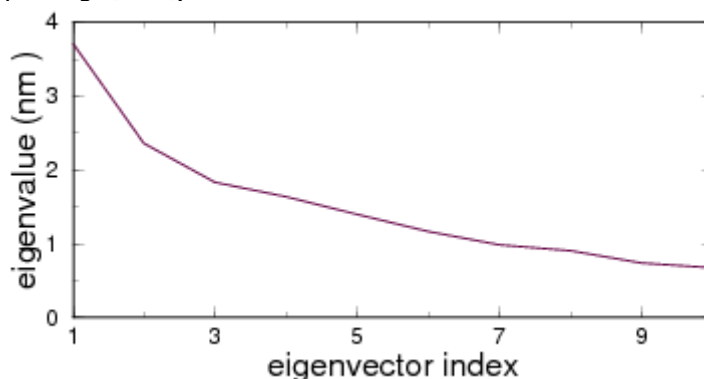
Principal Component Analysis

Η Principal Component Analysis αποτελεί μια χρήσιμη στατιστική τεχνική για την εύρεση μοτίβων σε δεδομένα μεγάλων διαστάσεων. Στην περίπτωση της ανάλυσης των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, με αυτή την τεχνική μπορούν να υπολογιστούν οι χαρακτηριστικότερες κινήσεις της Rop από το σύνολο του τροχιακού. Αυτό γίνεται με τον υπολογισμό των χαρακτηριστικών συναρτήσεων (eigenvectors) και των χαρακτηριστικών τιμών (eigenvalues) του πίνακα συσχέτισης μεταξύ των CA ατόμων της πρωτεΐνης (carma [VI]).

Προσομοίωση 1

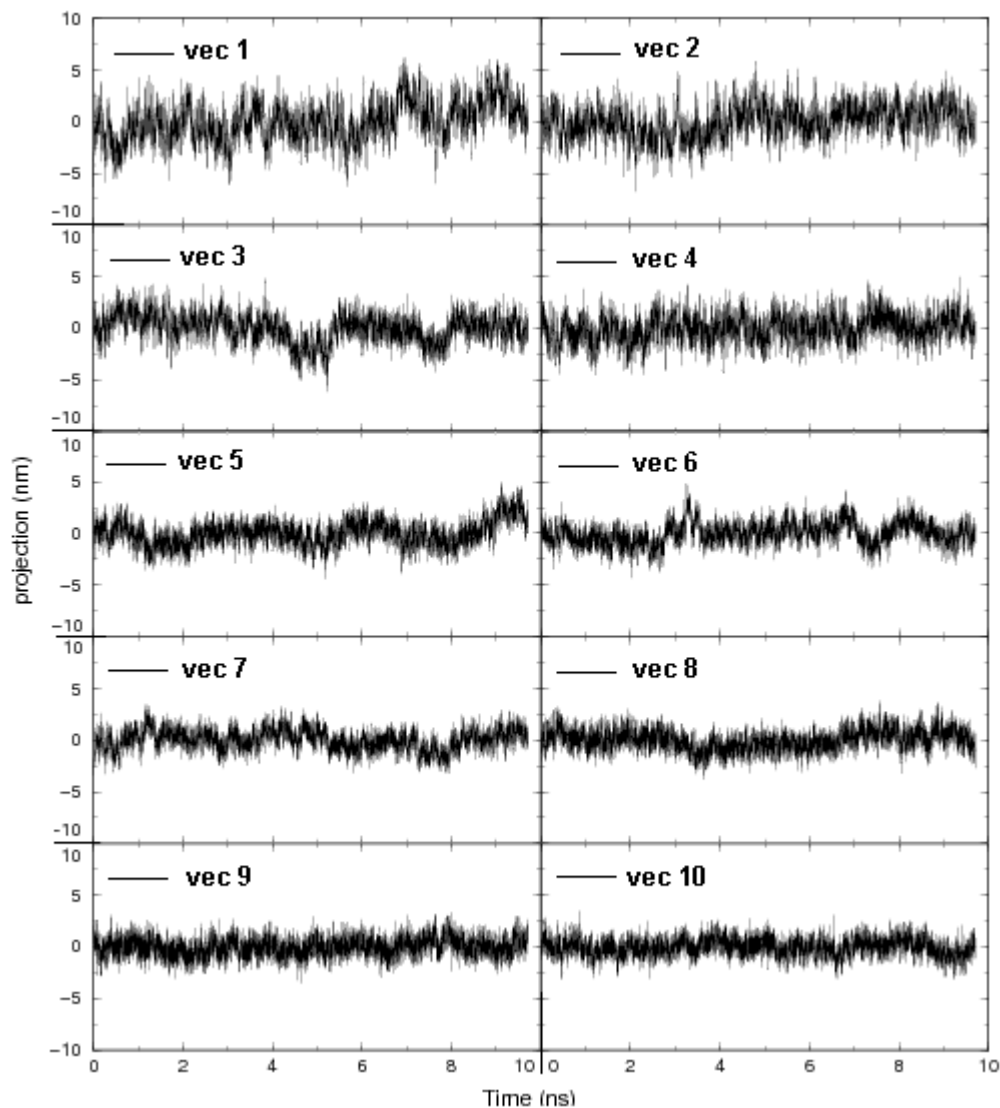
Στο Σχ.28 φαίνονται οι δέκα πρώτες χαρακτηριστικές τιμές σε φθίνουσα σειρά μεγέθους, σε σχέση με τους αντίστοιχους δείκτες χαρακτηριστικών συναρτήσεων. Από τη στιγμή που οι χαρακτηριστικές τιμές αποτελούν μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις, γίνεται φανερό από το Σχ.28 ότι ο χώρος των διαμορφώσεων της πρωτεΐνης δεν είναι ομογενής, από την άποψη της κίνησης κατά μήκος των κατευθύνσεων που αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές κινήσεις.

Σχ.28 Οι δέκα πρώτες χαρακτηριστικές τιμές που αντιστοιχούν στις δέκα πρώτες χαρακτηριστικές συναρτήσεις του covariance matrix της **Προσομοίωσης 1**, σε φθίνουσα σειρά (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).



Για μια καλύτερη άποψη των χαρακτηριστικών κινήσεων της πρωτεΐνης ακολούθησε προβολή του τροχιακού πάνω στις ξεχωριστές χαρακτηριστικές συναρτήσεις. Στο Σχ.29 φαίνονται οι προβολές του τροχιακού των ατόμων CA πάνω στις δέκα πρώτες χαρακτηριστικές συναρτήσεις, κατά την πάροδο του χρόνου. Από αυτό το σχήμα γίνεται φανερό πως όσο αυξάνεται ο αριθμός της χαρακτηριστικής συνάρτησης, τόσο η κίνηση παρουσιάζεται με λιγότερες διακυμάνσεις (sufficient sampling).

Σχ.29 Προβολή του **Τροχιακού 1** πάνω στις δέκα πρώτες χαρακτηριστικές συναρτήσεις (πρόγραμμα xmgr [xiii]).

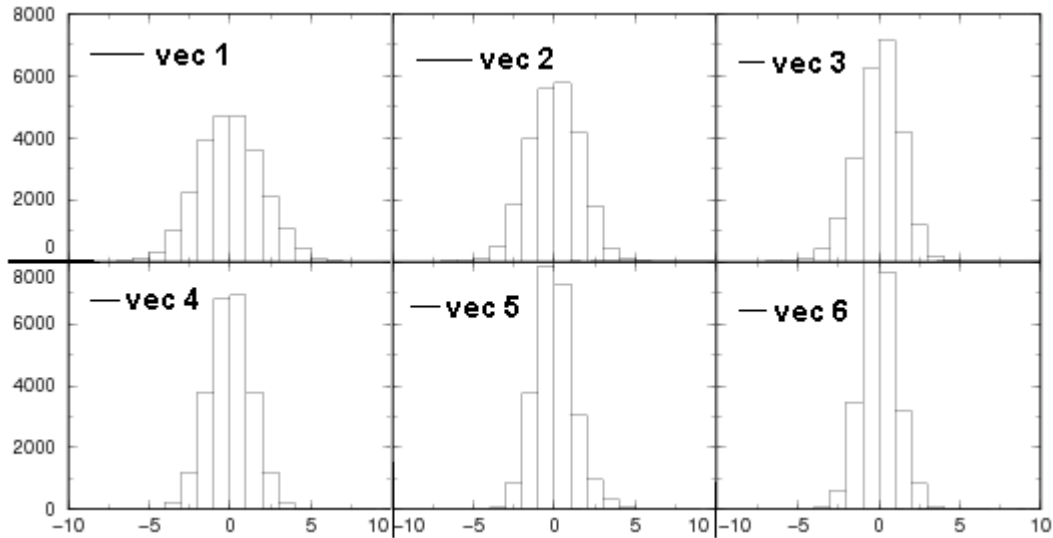


Σε μια προσπάθεια να δειχθεί ότι έχει καλυφθεί επαρκώς ο χώρος διαμορφώσεων του μορίου κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, ετοιμάστηκαν δύο ειδών διαγράμματα (Σχ.30, Σχ.31).

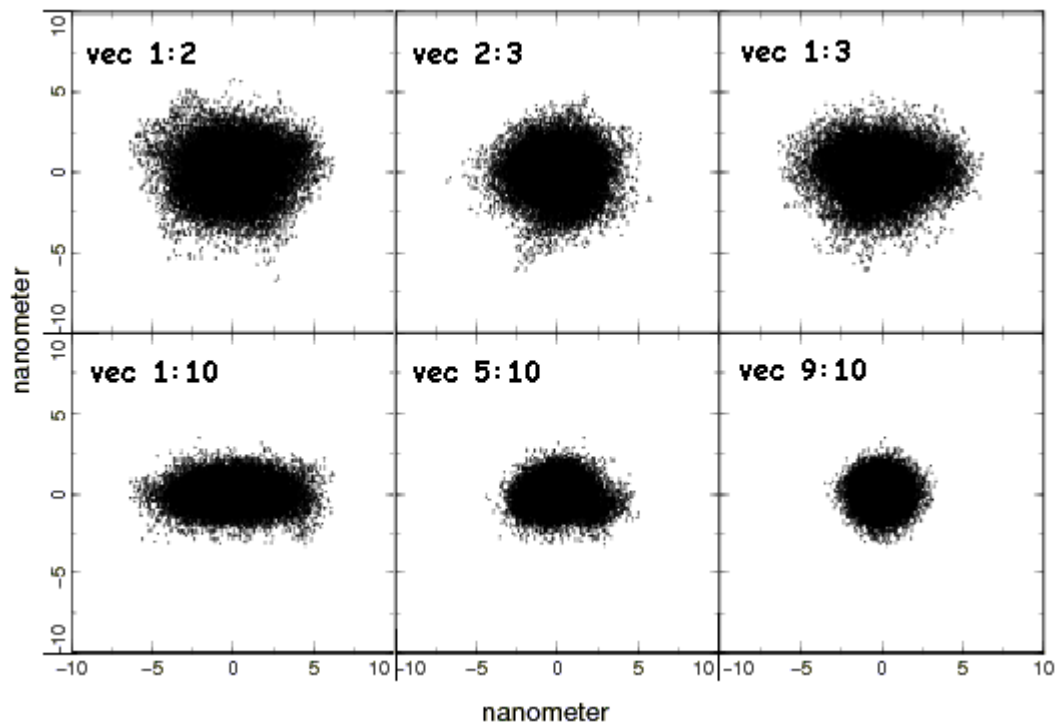
Το πρώτο είδος διαγραμμάτων είναι ιστογράμματα των διακυμάνσεων που αντιστοιχούν στις πρώτες έξι χαρακτηριστικές συναρτήσεις (Σχ.30). Από τη μορφή τους (κεντραρισμένα στο 0 και συμμετρικά) υποδεικνύεται ότι το μόριο καλύπτει επαρκώς το χώρο των δυνατών διαμορφώσεών του.

Το δεύτερο είδος διαγραμμάτων αποτελείται από την προβολή των διακυμάνσεων ζευγών χαρακτηριστικών συναρτήσεων. Το Σχ.31 δείχνει το τροχιακό προβεβλημένο σε έξι επίπεδα, που το καθένα ορίζεται από δύο χαρακτηριστικές συναρτήσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις τα τροχιακά εμφανίζουν εξάπλωση που υποδηλώνει ανεξάρτητη κίνηση (συστάδες σημείων με κέντρο το $(0,0)$).

Σχ.30 Ιστογράμματα των διακυμάνσεων κατά μήκος των πρώτων έξι χαρακτηριστικών συναρτήσεων της **Προσομοίωσης 1** (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).

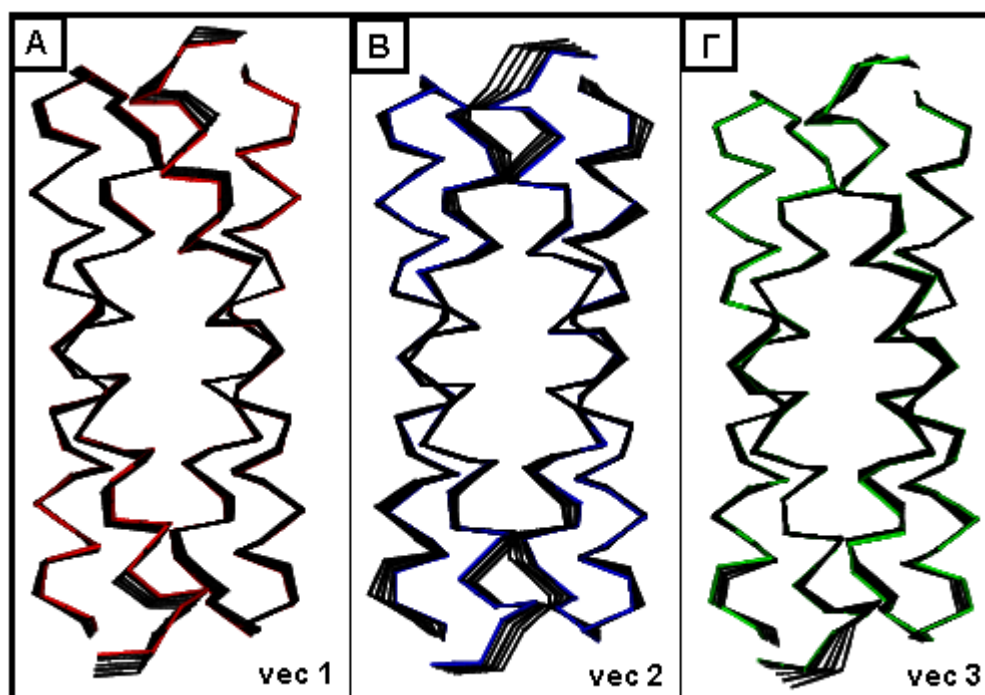


Σχ.31 Προβολή του τροχιακού στα επίπεδα που ορίζονται από δύο χαρακτηριστικές συναρτήσεις από τον πίνακα covariance στην **προσομοίωση 1**. (1) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της πρώτης χαρακτηριστικής συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δεύτερης χαρ. συνάρτησης. (2) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δεύτερης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της τρίτης χαρ. συνάρτησης. (3) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της πρώτης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της τρίτης χαρ. συνάρτησης. (4) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της πρώτης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δέκατης χαρ. συνάρτησης. (5) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της πέμπτης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δέκατης χαρ. συνάρτησης. (6) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της ένατης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δέκατης χαρ. συνάρτησης (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).



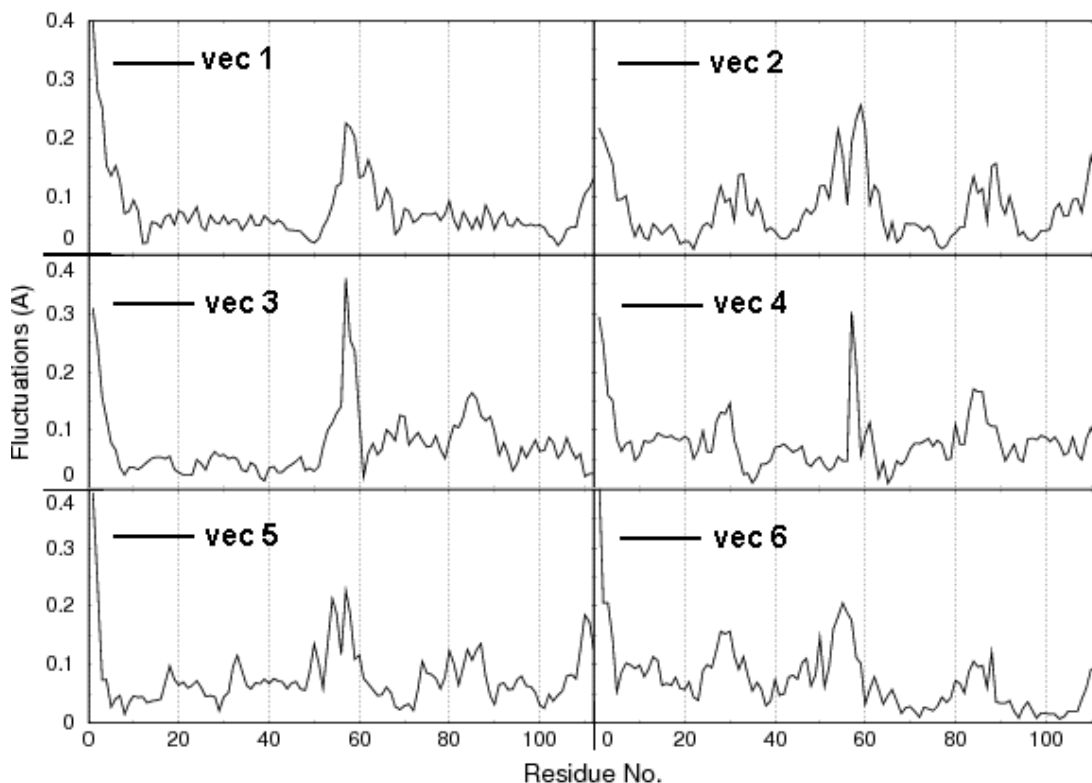
Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν αναγκαίες αλλά όχι επαρκείς ενδείξεις για sufficient sampling.

Ακολούθησε χαρακτηρισμός της κίνησης που αντιστοιχεί στις 3 σημαντικότερες χαρακτηριστικές συναρτήσεις. Το Σχ.32 δείχνει μια υπέρθεση δέκα σειριακών προβολών της κίνησης των CA ατόμων πάνω στην πρώτη (A), τη δεύτερη (B) και την τρίτη (Γ) χαρακτηριστική συνάρτηση. Μεταξύ τους οι προβολές απέχουν 0.8 ns. Από τα διαγράμματα γίνεται φανερή η έντονη κινητικότητα των άκρων της πρωτεΐνης.



Σχ.32 Υπέρθεση δέκα διαμορφώσεων που προκύπτουν από την προβολή της κίνησης των CA στην πρώτη (A), δεύτερη (B) και τρίτη (Γ) χαρακτηριστική συνάρτηση στην **προσομοίωση 1** (πρόγραμμα VMD [XIX]).

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συνεισφορά των διαφόρων χαρακτηριστικών συναρτήσεων στην κινητικότητα των καταλοίπων. Στα διαγράμματα των διακυμάνσεων των έξι πρώτων χαρακτηριστικών συναρτήσεων κατά μήκος των καταλοίπων της πρωτεΐνης (Σχ.33) παρουσιάζονται διαφορές αλλά γενικά υπάρχει ομοιομορφία ως προς τις κορυφές που εμφανίζονται στις περιοχές των καταλοίπων (0-3), (25-32), (52-59), (82-88) και (107-110). Οι περιοχές αυτές είναι παρόμοιες με τις περιοχές υψηλών τιμών στο διάγραμμα της ρίζας της μέσης τετραγωνικής διακύμανσης των ατόμων CA κατά μήκος της πρωτεΐνης (Σχ.21A) και του διαγράμματος των ατομικών θερμικών παραγόντων (Σχ.21B) και αντιστοιχούν στις φουρκέτες και τα άκρα της πρωτεΐνης.

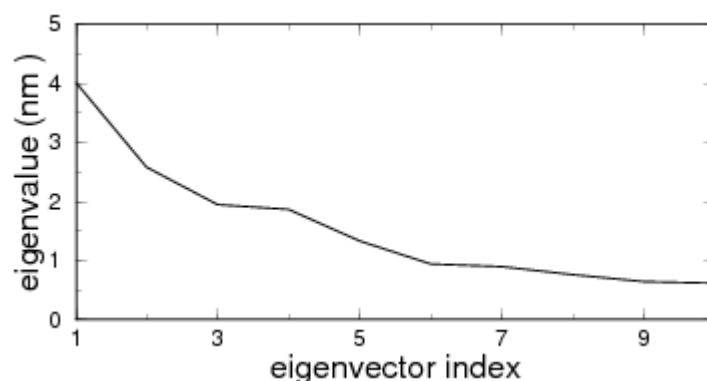


Σχ.33 Οι διακυμάνσεις που προκύπτουν από την κίνηση κατά μήκος των πρώτων έξι χαρακτηριστικών συναρτήσεων στην **προσομοίωση 1**. Κάθετος άξονας: διακυμάνσεις; οριζόντιος άξονας: αριθμός καταλοίπου (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).

Προσομοίωση 2

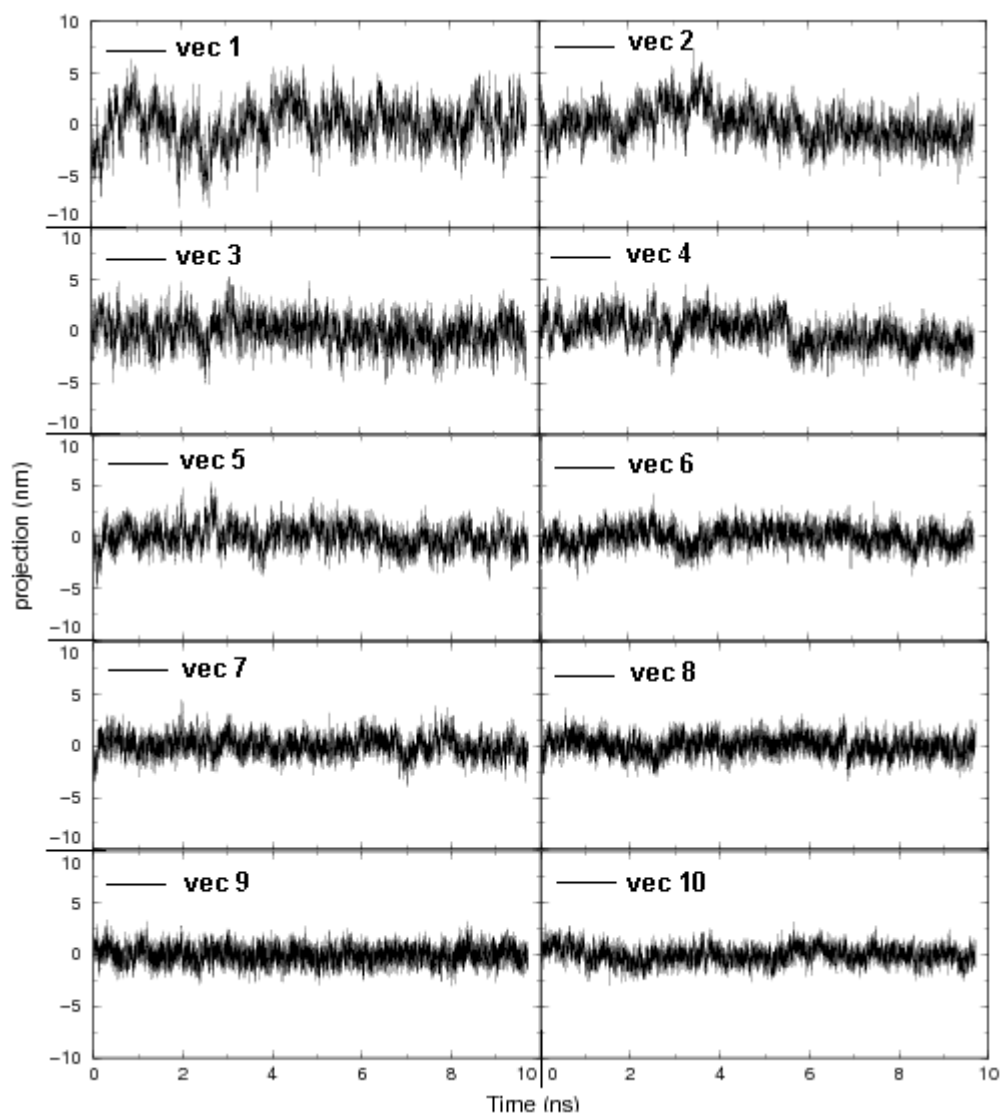
Παρομοίως για την προσομοίωση 2 οι δέκα πρώτες χαρακτηριστικές τιμές σε φθίνουσα σειρά μεγέθους, σε σχέση με τους αντίστοιχους δείκτες χαρακτηριστικών συναρτήσεων δείχνονται στο Σχ.34.

Σχ.34 Οι δέκα πρώτες χαρακτηριστικές τιμές που αντιστοιχούν στις δέκα πρώτες χαρακτηριστικές συναρτήσεις του covariance matrix της **Προσομοίωσης 2**, σε φθίνουσα σειρά (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).



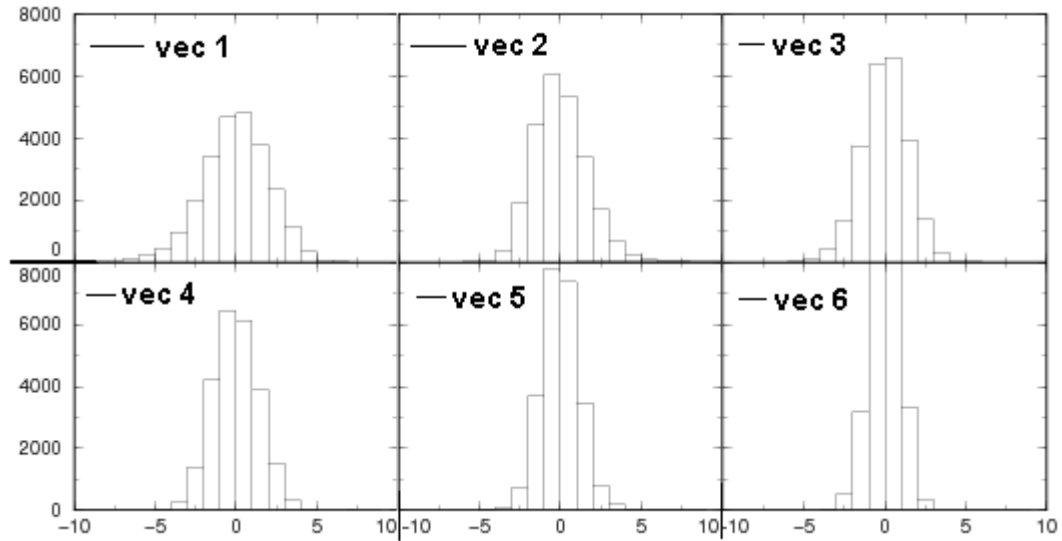
Οι προβολές του τροχιακού κατά μήκος των δέκα πρώτων χαρακτηριστικών συναρτήσεων φαίνονται στο Σχ.35.

Σχ.35 Προβολή του **Τροχιακού 2** πάνω στις δέκα πρώτες χαρακτηριστικές συναρτήσεις (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).

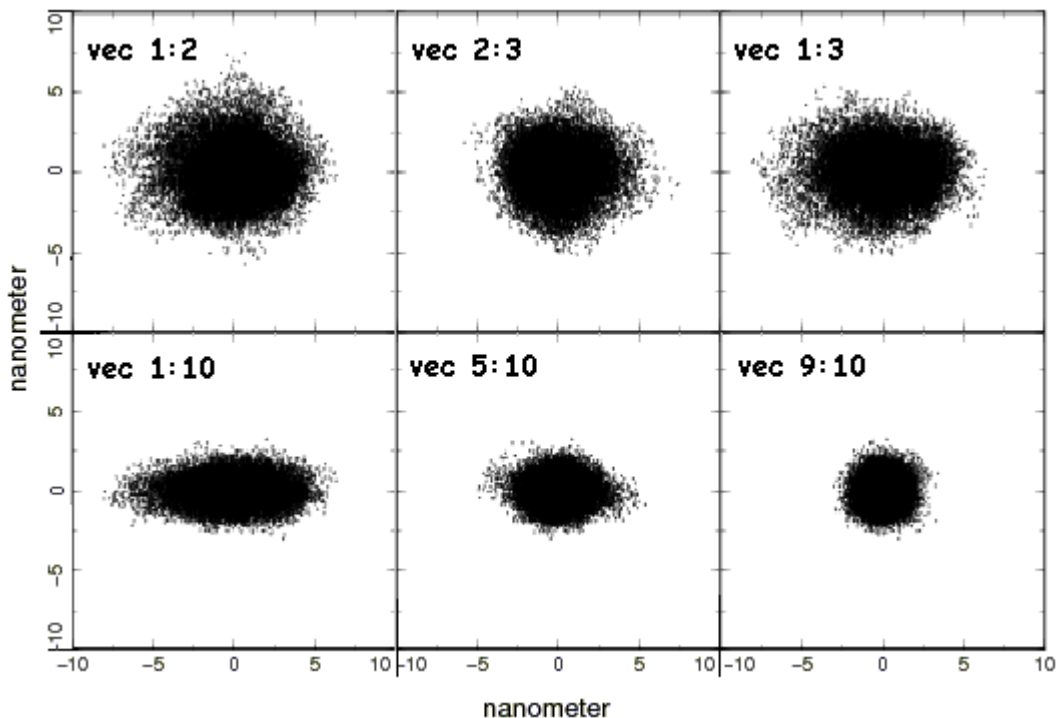


Από τη μορφή των Σχ.36 και Σχ.37 υποδεικνύεται ότι ο χώρος διαμορφώσεων της πρωτεΐνης έχει εκπροσωπηθεί επαρκώς κατά την προσομοίωση 2.

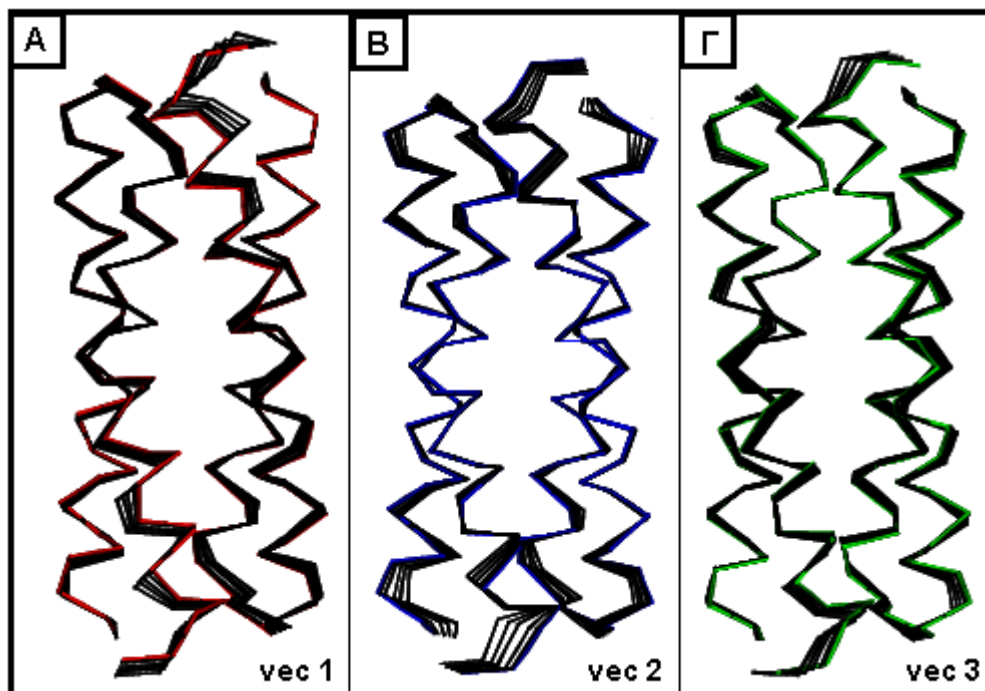
Σχ.36 Ιστόγραμμα των διακυμάνσεων κατά μήκος των πρώτων έξι χαρακτηριστικών συναρτήσεων της **Προσομοίωσης 2** (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).



Σχ.37 Προβολή του τροχιακού στα επίπεδα που ορίζονται από δύο χαρακτηριστικές συναρτήσεις από τον πίνακα covariance στην **προσομοίωση 2**. (1) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της πρώτης χαρακτηριστικής συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δεύτερης χαρ. συνάρτησης. (2) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δεύτερης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της τρίτης χαρ. συνάρτησης. (3) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της πρώτης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της τρίτης χαρ. συνάρτησης. (4) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της πρώτης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δέκατης χαρ. συνάρτησης. (5) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της πέμπτης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δέκατης χαρ. συνάρτησης. (6) Οριζόντιος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της ένατης χαρ. συνάρτησης. Κάθετος άξονας: μετατόπιση κατά μήκος της δέκατης χαρ. συνάρτησης (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).

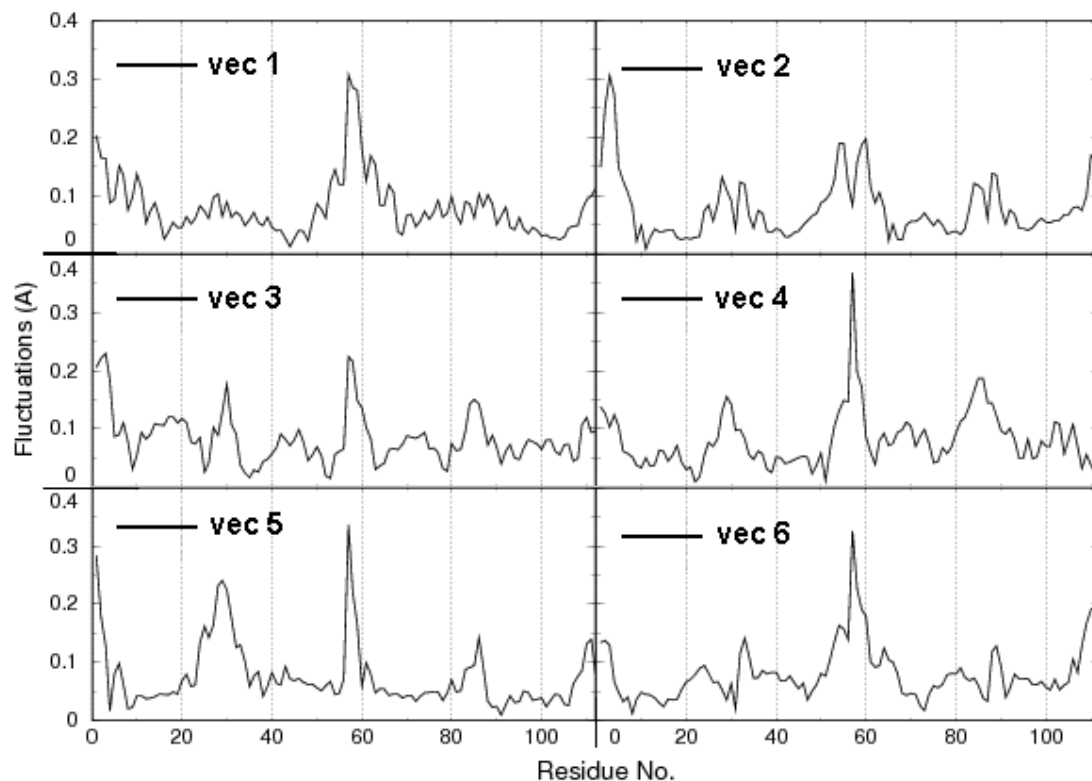


Η κίνηση που αντιστοιχεί στις 3 σημαντικότερες χαρακτηριστικές συναρτήσεις απεικονίζεται στο Σχ.38. Διακρίνεται σαφώς η μεγάλη κινητικότητα των άκρων της πρωτεΐνης.



Σχ.38 Υπέρθεση δέκα διαμορφώσεων που προκύπτουν από την προβολή της κίνησης των CA στην πρώτη (A), δεύτερη (B) και τρίτη (Γ) χαρακτηριστική συνάρτηση στην **προσομοίωση 2** (πρόγραμμα VMD [xvii]).

Από τον υπολογισμό της συνεισφοράς των έξι πρώτων χαρακτηριστικών συναρτήσεων στην κινητικότητα των καταλοίπων παίρνουμε τα διαγράμματα του Σχ.39. Οι τιμές της διακύμανσης παρουσιάζουν αυξημένες τιμές στις περιοχές των καταλοίπων (0-4), (26-30), (53-60), (81-87) και (107-112), που έρχονται σε συμφωνία με τις αντίστοιχες κορυφές των διαγραμμάτων της ρίζας της μέσης τετραγωνικής διακύμανσης των ατόμων CA (Σχ.22A) και του διαγράμματος των ατομικών θερμικών παραγόντων (Σχ.22B).



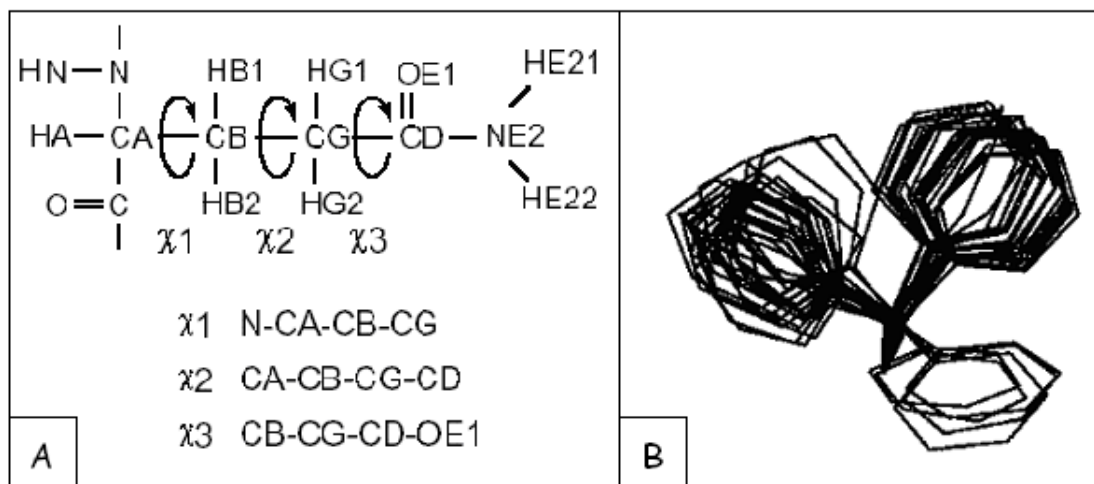
Σχ.39 Οι διακυμάνσεις που προκύπτουν από την κίνηση κατά μήκος των πρώτων έξι χαρακτηριστικών συναρτήσεων στην **προσομοίωση 2**. Κάθετος άξονας: διακυμάνσεις; οριζόντιος άξονας: αριθμός καταλοίπου (πρόγραμμα xmgr [XXIII]).

Ανάλυση κινητικότητας πλευρικών ομάδων

Λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων τα άτομα σε μία πλευρική ομάδα εμφανίζουν περιορισμένη ικανότητα περιστροφής γύρω από τους δεσμούς που τα ενώνουν (κατέχουν ορισμένες τιμές διέδρων χ γωνιών). Έτσι, η κάθε πλευρική ομάδα χαρακτηρίζεται από ακολουθία χ διέδρων γωνιών ($\chi_1, \chi_2, \chi_3, \dots$) ανάλογα με τον αριθμό των ελεύθερων περιστροφικά δεσμών της (Σχ.40A) [66], που περιγράφει τις προτιμώμενες διαμορφώσεις (στροφομερή-rotamers) του καταλοίπου στο χώρο (Σχ.40B).

Οι στροφομερικές προτιμήσεις των πλευρικών ομάδων επηρεάζονται ισχυρά από το περιβάλλον τους (θέση τους στην πρωτεΐνη). Τα αμινοξέα που βρίσκονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης είναι σχετικά ελεύθερα να μεταβούν από μία στροφομερική κατάσταση σε μια άλλη ενώ τα κατάλοιπα στο εσωτερικό της πρωτεΐνης αναμένονται να είναι κάπως πιο περιορισμένα [XVI].

Μελετήθηκαν και παρουσιάζονται τα στροφομερή των καταλοίπων του υδρόφοβου πυρήνα της Rop (xplor [IV]).



Σχ.40 Διέδρες χ γωνίες και στροφομερή πλευρικών ομάδων. (A) Παράδειγμα ορισμού διεδρων χ γωνιών καταλοίπου. Οι τρεις διέδρες γωνίες της αργινίνης (χ_1 - χ_3) αντιστοιχούν στους τρεις ελεύθερους περιστροφικά δεσμούς της πλευρικής ομάδας (βέλη στο σχήμα). (B) Μία τυχαία δειγματοληψία των διαμορφώσεων μιας πλευρικής αλυσίδας όταν υπερτίθενται πέφτουν σε συγκεκριμένο αριθμό τάξεων που ονομάζονται στροφομερή και αντιστοιχούν σε ενεργειακά ελάχιστα.

Προσομοίωση 1

Τα στροφομερή των καταλοίπων με μία ή τρεις διέδρες γωνίες φαίνονται στον Πιν.2 (χ_{mgr} [XIII]). Οι διαμορφώσεις των καταλοίπων με δύο διέδρες γωνίες δείχνονται σε διαγράμματα χ_1 - χ_2 (Σχ.41) (χ_{mgr} [XIII]). Οι τιμές έχουν υπολογιστεί και για τα δύο όμοια μονομερή της πρωτεΐνης, A και B. Στις παρενθέσεις είναι οι συντεταγμένες των κεντροϊδών (φανταστικά σημεία με συντεταγμένες τον μέσο όρο των συντεταγμένων όλων των σημείων κάθε ομάδας) της κάθε ομάδας σημείων και δίπλα το ποσοστό των διαμορφώσεων που ανήκουν σε κάθε ομάδα σημείων (R [V]). Τα περισσότερα κατάλοιπα βρίσκονται σε μία μόνο στροφομερική κατάσταση καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, γεγονός που δικαιολογείται από την περιορισμένη ικανότητα κίνησής τους στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο στροφομερή, ούτε ακόμα και ως προς τη θέση των κεντροϊδών.

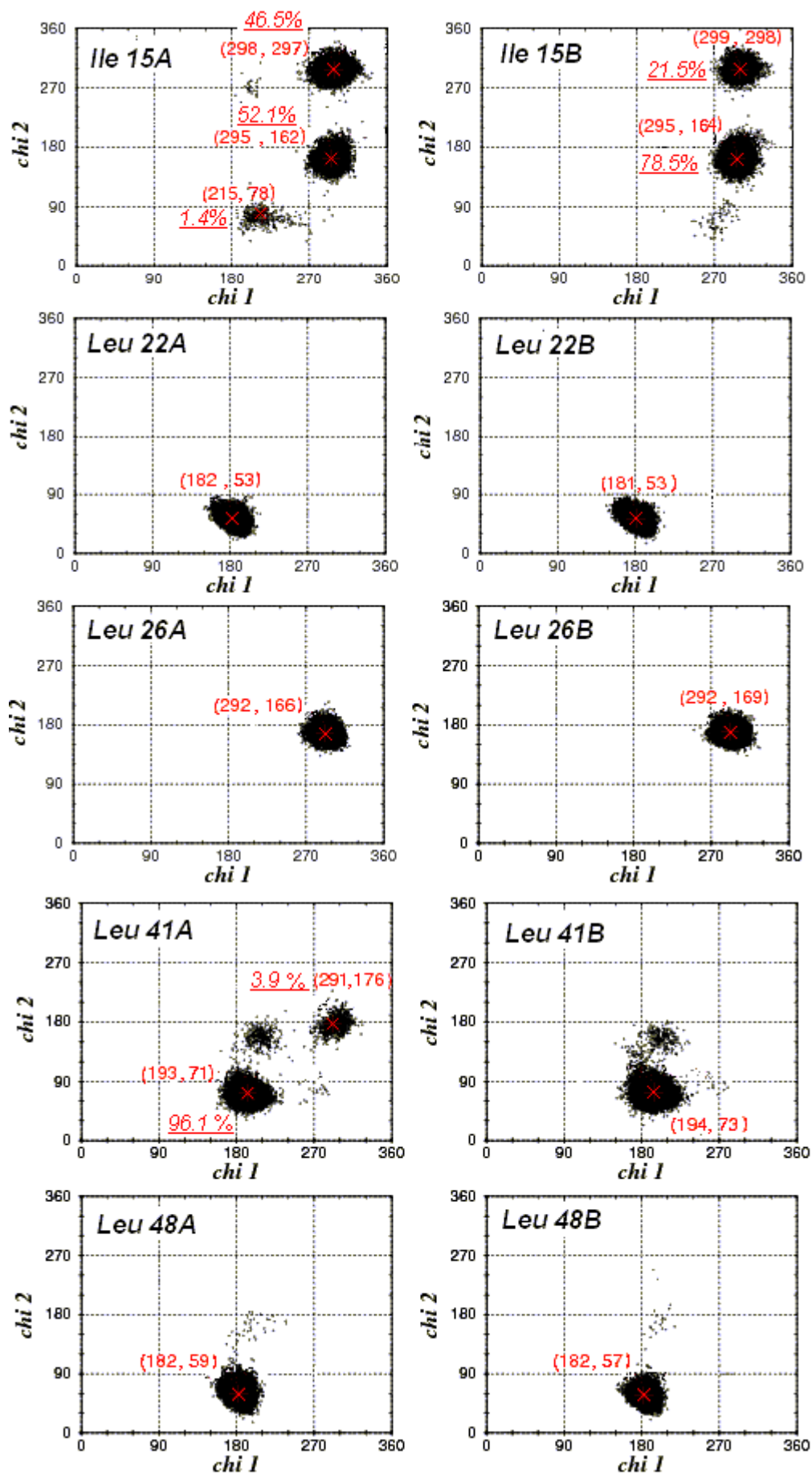
Στη συνέχεια συγκρίθηκαν τα στροφομερή όλων των λευκινών και των ισολευκινών του εσωτερικού της Rop με τα στροφομερή όλων των αντίστοιχων καταλοίπων του εξωτερικού της πρωτεΐνης (Σχ.42). Αυτό έγινε για να ελεγχθεί το κατά πόσο τα επιφανειακά αμινοξέα λαμβάνουν περισσότερες στροφομερικές διαμορφώσεις από τα εσωτερικά αμινοξέα. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν παρατηρείται. Στην περίπτωση μάλιστα των ισολευκινών συμβαίνει το αντίθετο (Σχ.42A). Το γεγονός αυτό, ίσως οφείλεται στη μικρή διάρκεια της προσομοίωσης, κατά την οποία πιθανώς τα κατάλοιπα δεν πρόλαβαν να μεταβούν σε όλες τις στροφομερικές καταστάσεις. Ακόμα μία πιθανή εξήγηση, είναι ότι τα κατάλοιπα λαμβάνουν ορισμένες μόνο διαμορφώσεις εξαιτίας του

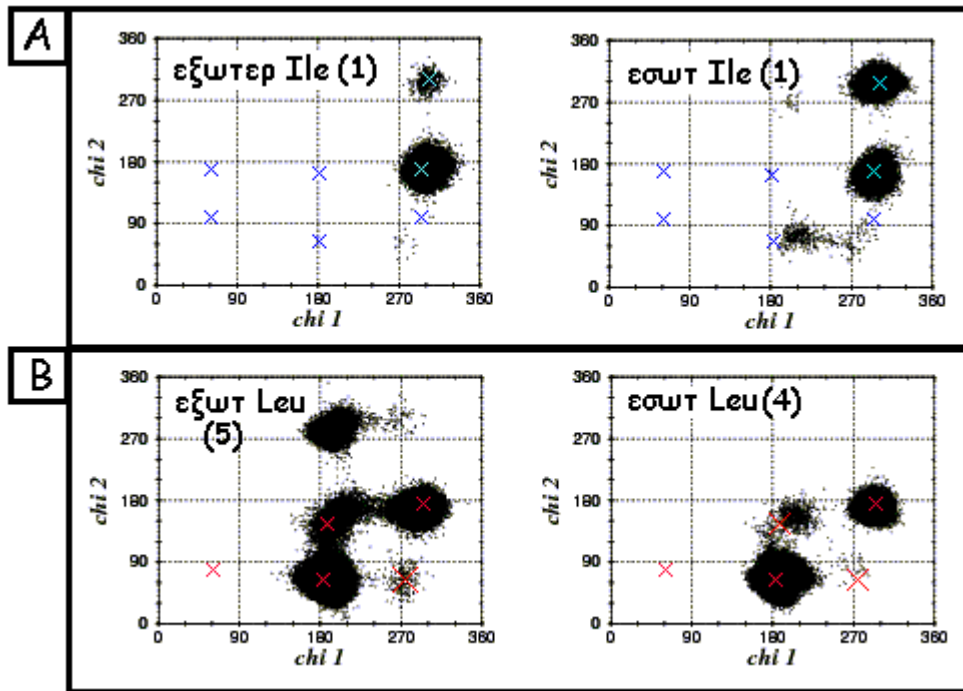
σηματισμού του δεματίου των 4 α-ελίκων, άσχετα από τη θέση τους σε αυτό. Οι συντεταγμένες που σημαδεύονται με X αποτελούν τις συνήθεις τιμές στροφομερών που παίρνει γενικά το κάθε αμινοξύ, προερχόμενες από τη βιβλιογραφία [43]. Καθώς παρατηρείται συμφωνία, γενικά, των τιμών που προέρχονται από την προσομοίωση με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα, τα αποτελέσματα της προσομοίωσης κρίνονται αξιόπιστα. Αδρή συμφωνία επίσης συναντάται και κατά τη σύγκριση με καταγραφή στροφομερών πλευρικών αλυσίδων σε δεμάτια τεσσάρων α-ελίκων [19]. Εξαίρεση συμφωνίας κατά τη σύγκριση με βιβλιογραφικές τιμές αποτελεί η συστάδα διαμορφώσεων της λευκίνης με συντεταγμένες κέντρου $\sim(195,295)$ (Σχ.42B). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε λάθος κατά την προσομοίωση ή σε ανεπαρκή επεξεργασία των γωνιών των στροφομερών (πρόσθεση/αφαίρεση $90^\circ/180^\circ$ μοιρών) ώστε να είναι συγκρίσιμες με τις βιβλιογραφικές τιμές.

Πιν.2 Στατιστικά στοιχεία των στροφομερών των καταλοίπων του υδρόφοβου πυρήνα, που έχουν μία ή τρεις διέδρες γωνίες, κατά την προσομοίωση 1.

Κατάλοιπο	Μονομερές	Μέση Chi 1	Τυπική απόκλιση Chi 1	Μέση Chi 2	Τυπική απόκλιση Chi 2	Μέση Chi 3	Τυπική απόκλιση Chi 3
Thr 19	A	50	6	-	-	-	-
	B	49	7	-	-	-	-
Gln 34	A	295	7	71	19	46	47
	B	296	7	70	9	67	82
Cys 38	A	198	8	-	-	-	-
	B	198	8	-	-	-	-
Cys 52	A	292	13	-	-	-	-
	B	293	9	-	-	-	-

Σχ.41 Διαγράμματα χ_1 - χ_2 των καταλοίπων του υδρόφοβου πυρήνα της Rop όπου διακρίνονται τα στροφομερή κάθε καταλοίπου κατά την **προσομοίωση 1** (A: μονομερές Α, B: μονομερές Β).





Σχ.42 Σύγκριση των διαγραμμάτων χ_1 - χ_2 των ισολευκινών και των λευκινών που βρίσκονται στον υδρόφοβο πυρήνα της Rop με αυτά των αντίστοιχων καταλοίπων που εντοπίζονται στο εξωτερικό της πρωτεΐνης (προσομοίωση 1). Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των καταλοίπων σε κάθε περίπτωση. Με X σημαδεύονται οι συντεταγμένες που αποτελούν τις συνήθεις τιμές στροφομερών που παίρνει το κάθε αμινοξύ στη βιβλιογραφία [43].

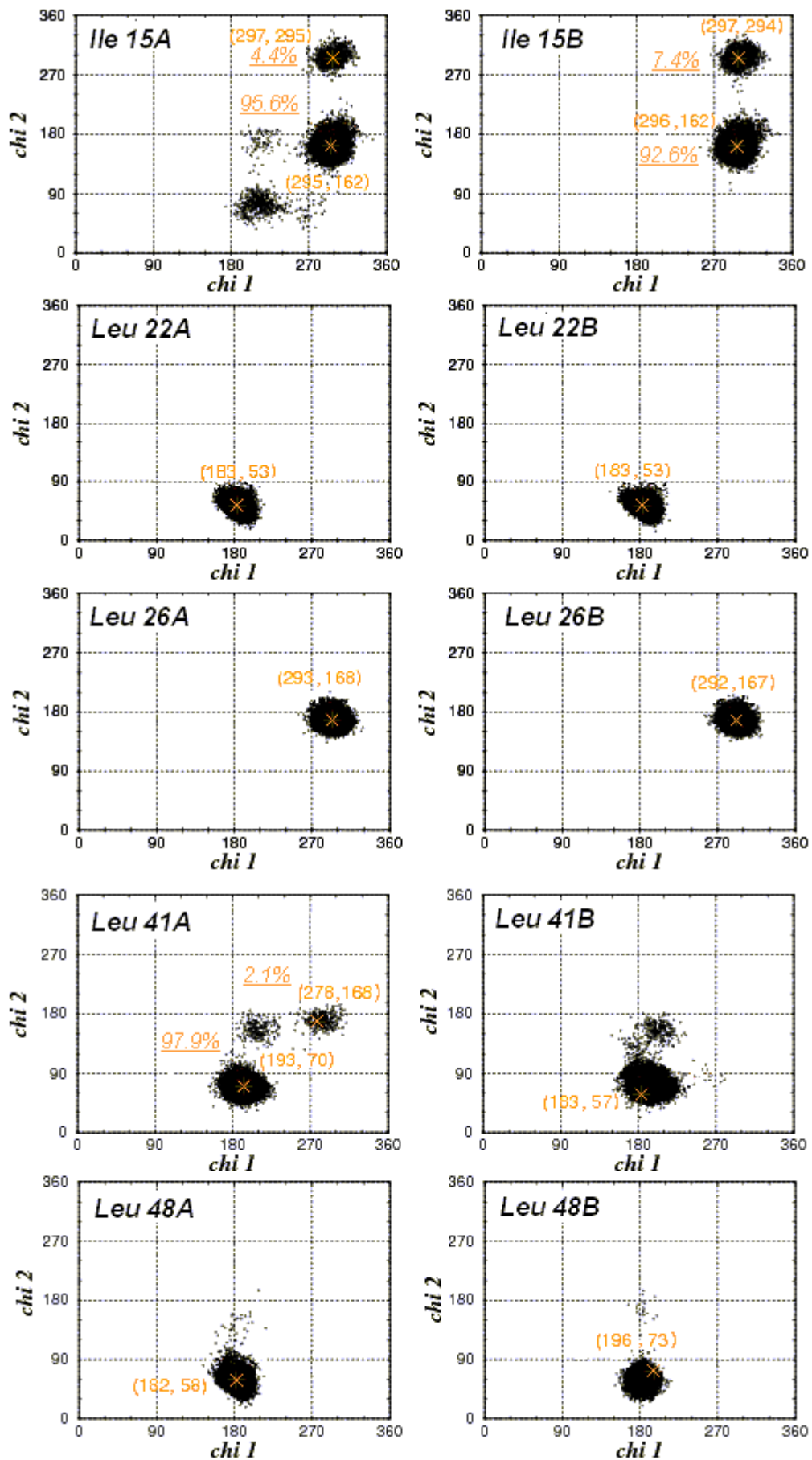
Προσομοίωση 2

Με αντίστοιχο τρόπο παρουσιάζονται και τα στροφομερή των πλευρικών ομάδων των καταλοίπων του υδρόφοβου πυρήνα κατά την προσομοίωση 2 (Πιν.3, Σχ.43). Οι στροφομερικές διαμορφώσεις που λαμβάνονται από τα κατάλοιπα είναι περιορισμένες (στις περισσότερες περιπτώσεις μονάχα μία) και οι αποκλίσεις ανάμεσα στα δύο μονομερή μικρές.

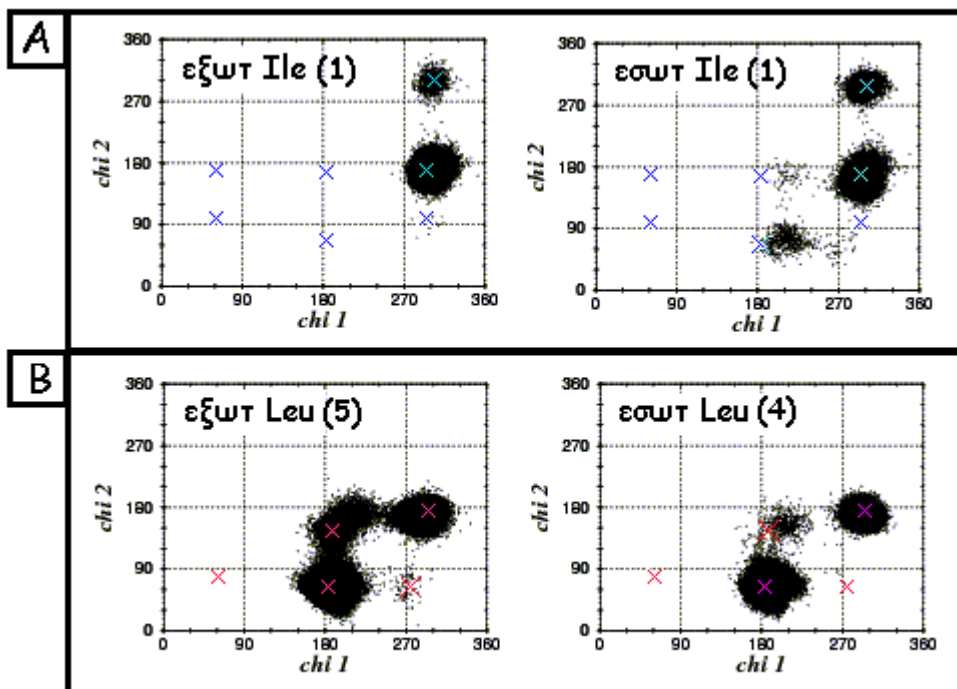
Τα συγκριτικά διαγράμματα χ_1 - χ_2 μεταξύ των εσωτερικών και εξωτερικών ισολευκινών και λευκινών (Σχ.44) δεν εμφανίζουν κάποια αξιοσημείωτη διαφορά, εκτός από την περίπτωση των ισολευκινών, όπου οι πλευρικές ομάδες των εσωτερικών καταλοίπων αποκτούν περισσότερες διαμορφώσεις από αυτές των εξωτερικών (Σχ.44Α). Από τις θέσεις των σημείων X συμπεραίνεται ότι οι παρατηρούμενες στροφομερικές διαμορφώσεις δεν αποκλίνουν από τις καταγεγραμμένες τιμές της βιβλιογραφίας [19,43].

Πιν.3 Στατιστικά στοιχεία των στροφομερών των καταλοίπων του υδρόφοβου πυρήνα, που έχουν μία ή τρεις δίεδρες γωνίες, κατά την προσομοίωση 2.

Κατάλοιπο	Μονομερές	Μέση Chi 1	Τυπική απόκλιση Chi 1	Μέση Chi 2	Τυπική απόκλιση Chi 2	Μέση Chi 3	Τυπική απόκλιση Chi 3
Thr 19	A	49	6	-	-	-	-
	B	49	6	-	-	-	-
Gln 34	A	295	6	69	11	41	28
	B	295	7	69	8	41	32
Cys 38	A	197	8	-	-	-	-
	B	199	10	-	-	-	-
Cys 52	A	292	12	-	-	-	-
	B	293	8	-	-	-	-



Σχ.43 Διαγράμματα χ_1 - χ_2 των καταλοίπων του υδρόφοβου πυρήνα της Rop όπου διακρίνονται τα στροφωμερή κάθε καταλοίπου κατά την **προσομοίωση 2** (A: μονομερές A, B: μονομερές B).



Σχ.44 Σύγκριση των διαγραμμάτων χ_1 - χ_2 των ισολευκινών και των λευκινών που βρίσκονται στον υδρόφοβο πυρήνα της Rop με αυτά των αντίστοιχων καταλοίπων που εντοπίζονται στο εξωτερικό της πρωτεΐνης (προσομοίωση 2). Στις παρενθέσεις φαίνεται ο αριθμός των καταλοίπων σε κάθε περίπτωση. Με X σημαδεύονται οι συντεταγμένες που αποτελούν τις συνήθεις τιμές στροφομερών που παίρνει το κάθε αμινοξύ στη βιβλιογραφία [43].

Σύγκριση των δύο προσομοιώσεων

Εφόσον οι δύο προσομοιώσεις έχουν διεξαχθεί κάτω από τις ίδιες συνθήκες, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν οι διαφορές των αποτελεσμάτων της ανάλυσής τους.

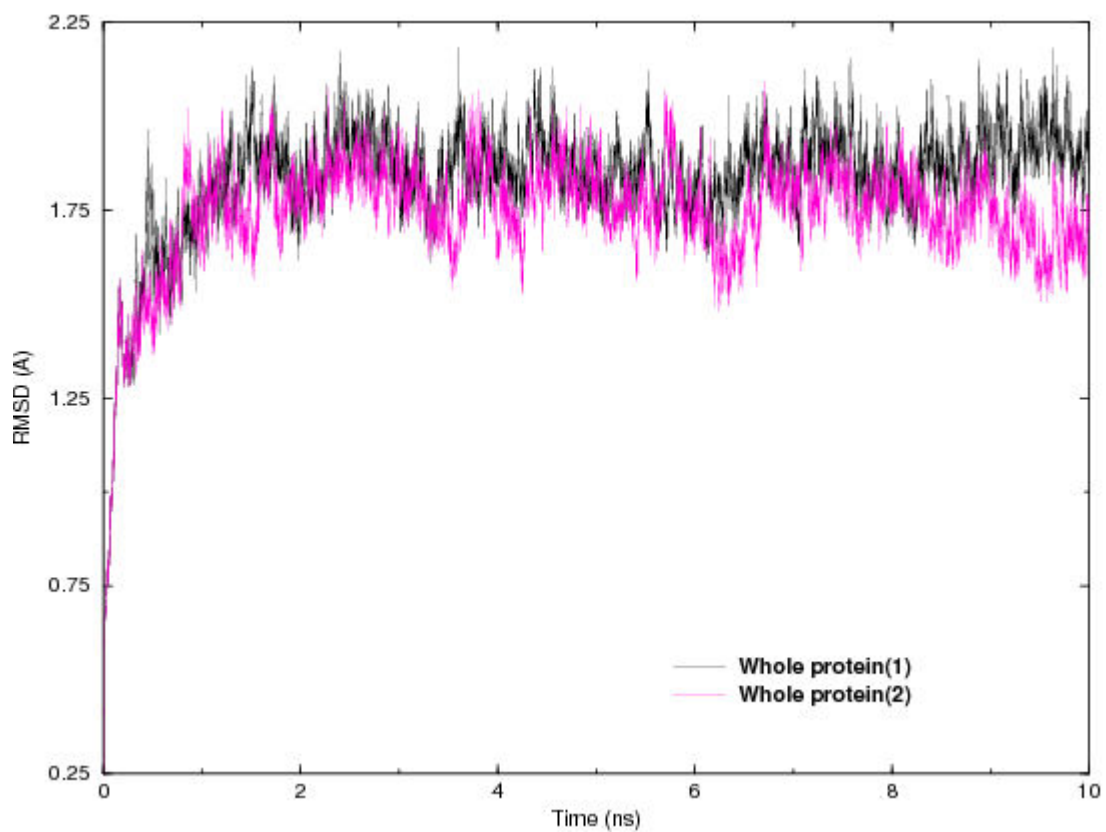
Σύγκριση σταθερότητας αρχικής δομής & δομών τροχιακού

Αρχικά συγκρίθηκαν οι τιμές της RMSD της Rop από την αρχική της δομή κατά μήκος των δύο τροχιακών (Σχ.45). Όπως ήταν αναμενόμενο δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες αποκλίσεις ανάμεσα στις δύο προσομοιώσεις.

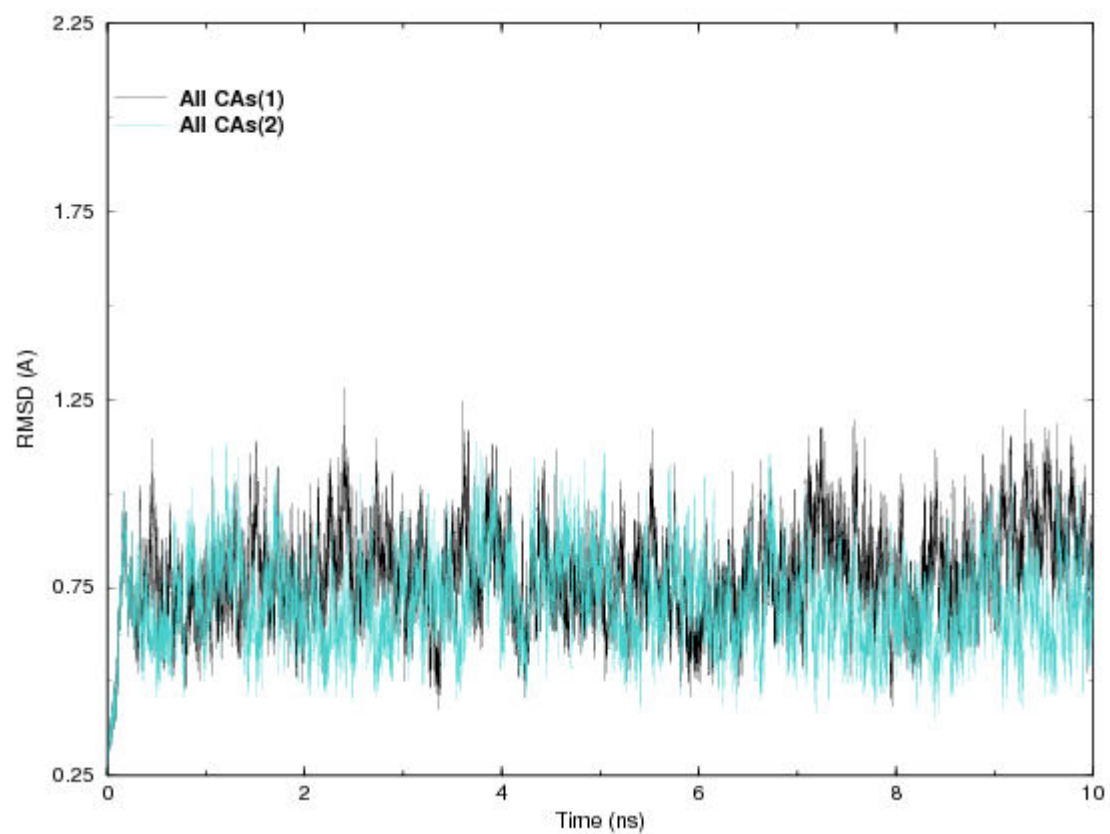
Ανάλογες επίσης είναι οι διακυμάνσεις της RMSD της Rop από τη μέση της δομή κατά τη διάρκεια των δύο προσομοιώσεων (Σχ.46A-Δ).

Σχ.45 Σύγκριση της εξέλιξης της RMSD της Rop από την αρχική της δομή μεταξύ των **2 τροχιακών**: (A) για ολόκληρη την πρωτεΐνη, (B) για τα CA άτομα.

(A)

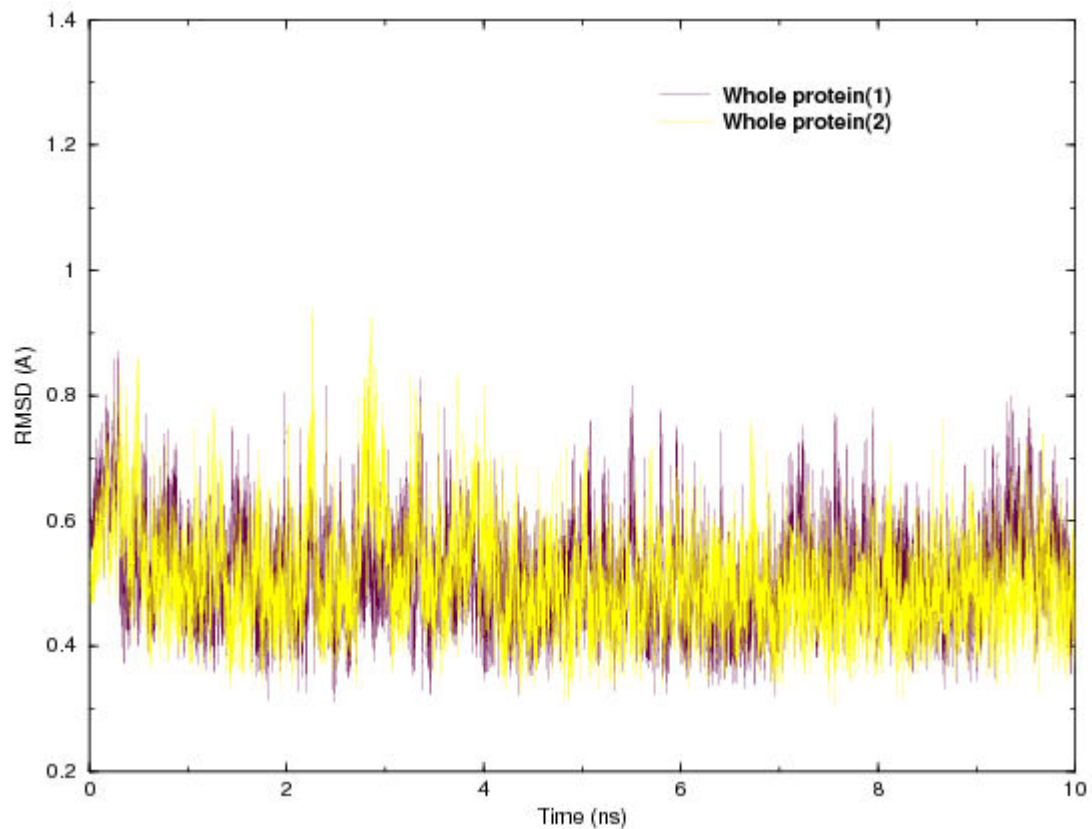


(B)

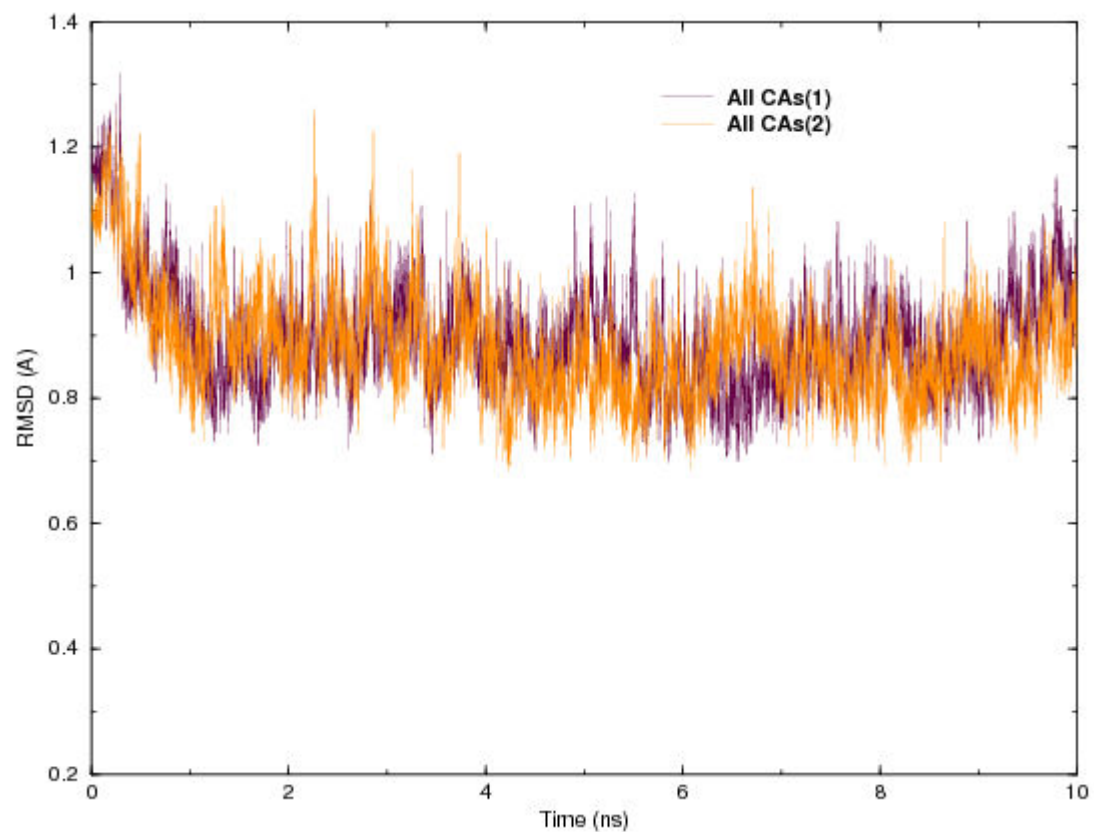


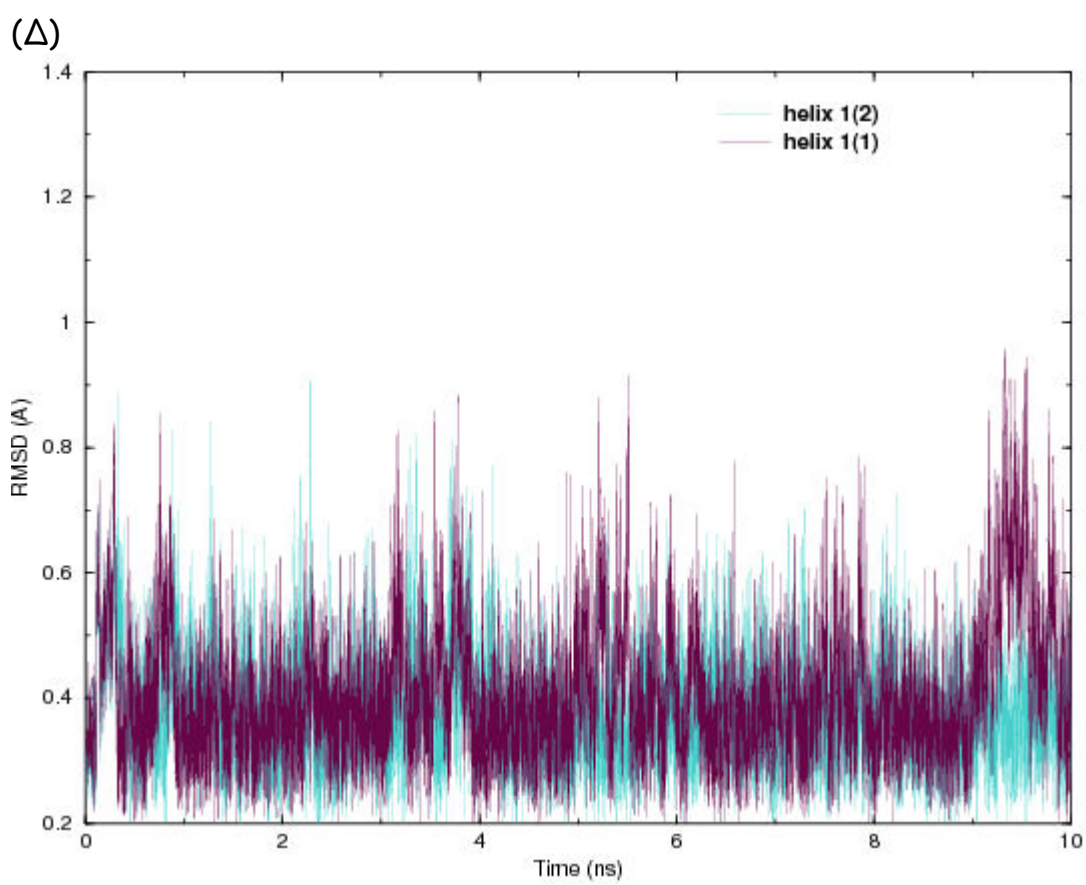
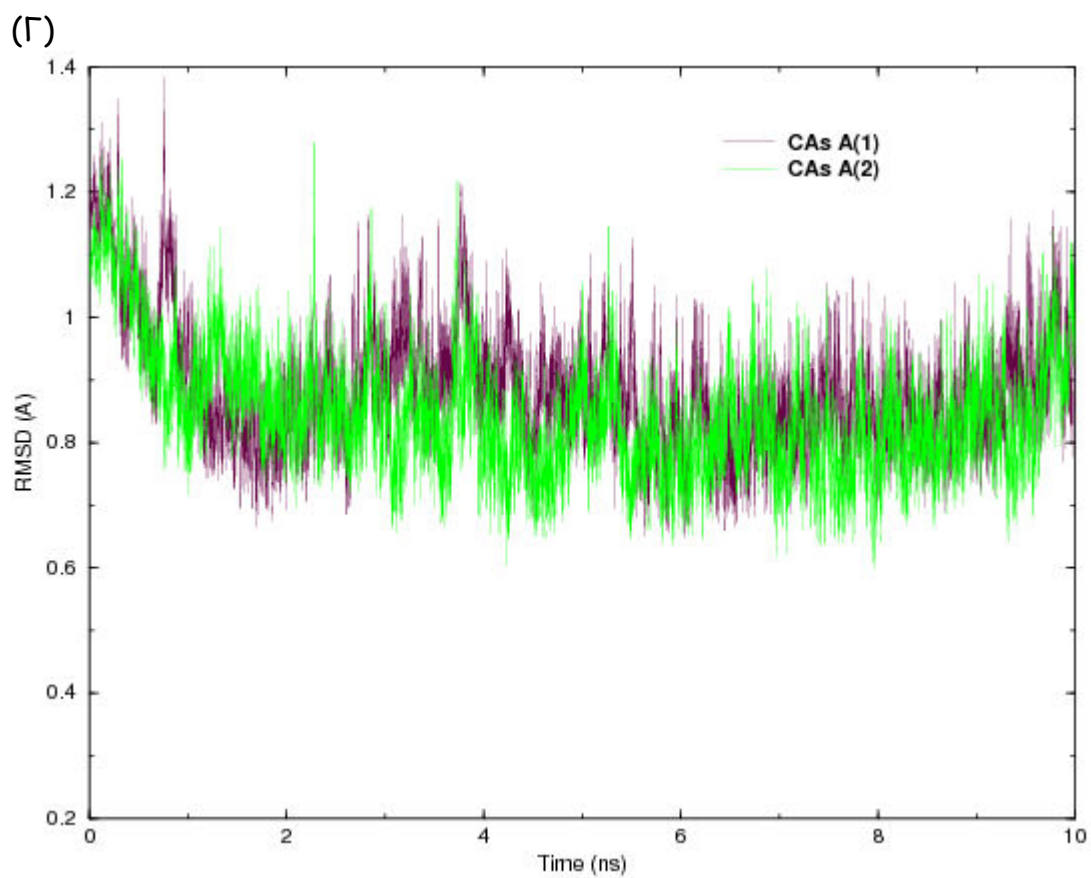
Σχ.46 Σύγκριση της εξέλιξης της RMSD της Rop από τη μέση της δομή μεταξύ των **2 τροχιακών**: (A) για ολόκληρη την πρωτεΐνη, (B) για τα άτομα CA ολόκληρης της πρωτεΐνης, (Γ) για τα άτομα CA του ενός μονομερούς, (Δ) για τα άτομα CA της μιας έλικας.

(A)



(B)

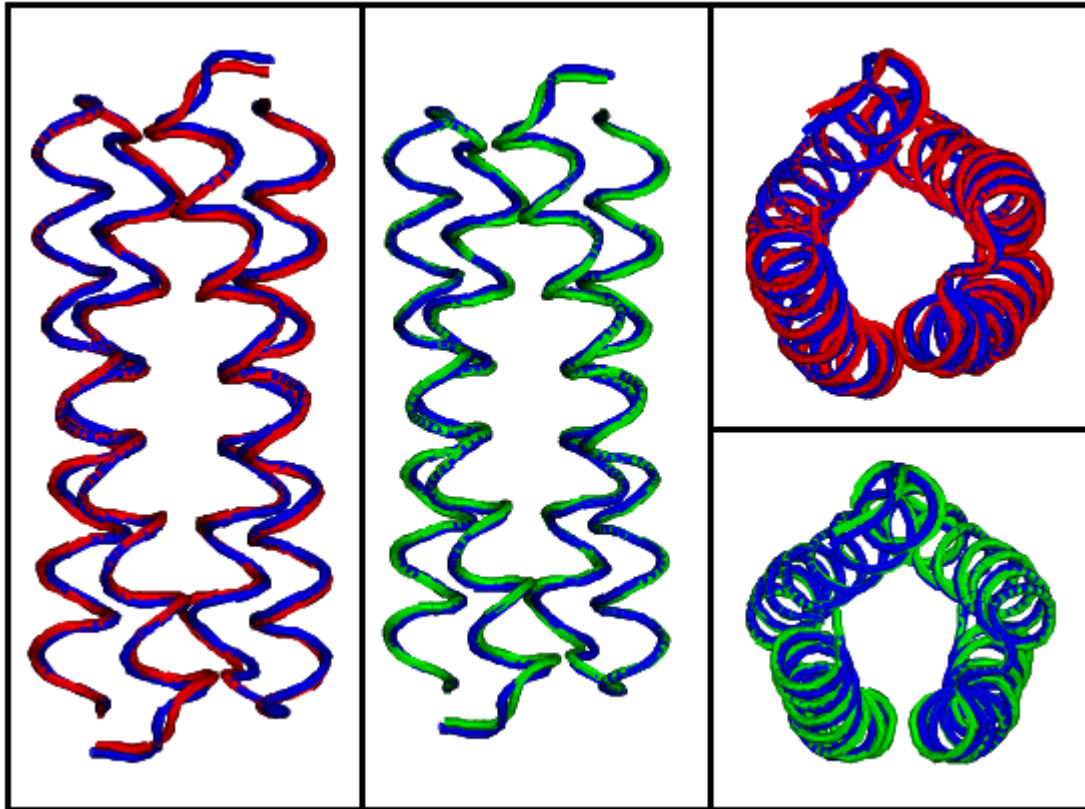




Σύγκριση των δομικών αλλαγών από την αρχική δομή

Από τη σύγκριση της διαφοράς της αρχικής από τη μέση δομή των δύο προσομοιώσεων με ειδικό πρόγραμμα (Σχ.47) συμπεραίνουμε ότι η κατανομή των αποκλίσεων από την αρχική δομή παρουσιάζεται ίδια στα κατάλοιπα και των δύο περιπτώσεων (σελ.32,37), ενώ στην προσομοίωση 2 οι δομικές αλλαγές είναι γενικά λίγο μεγαλύτερες.

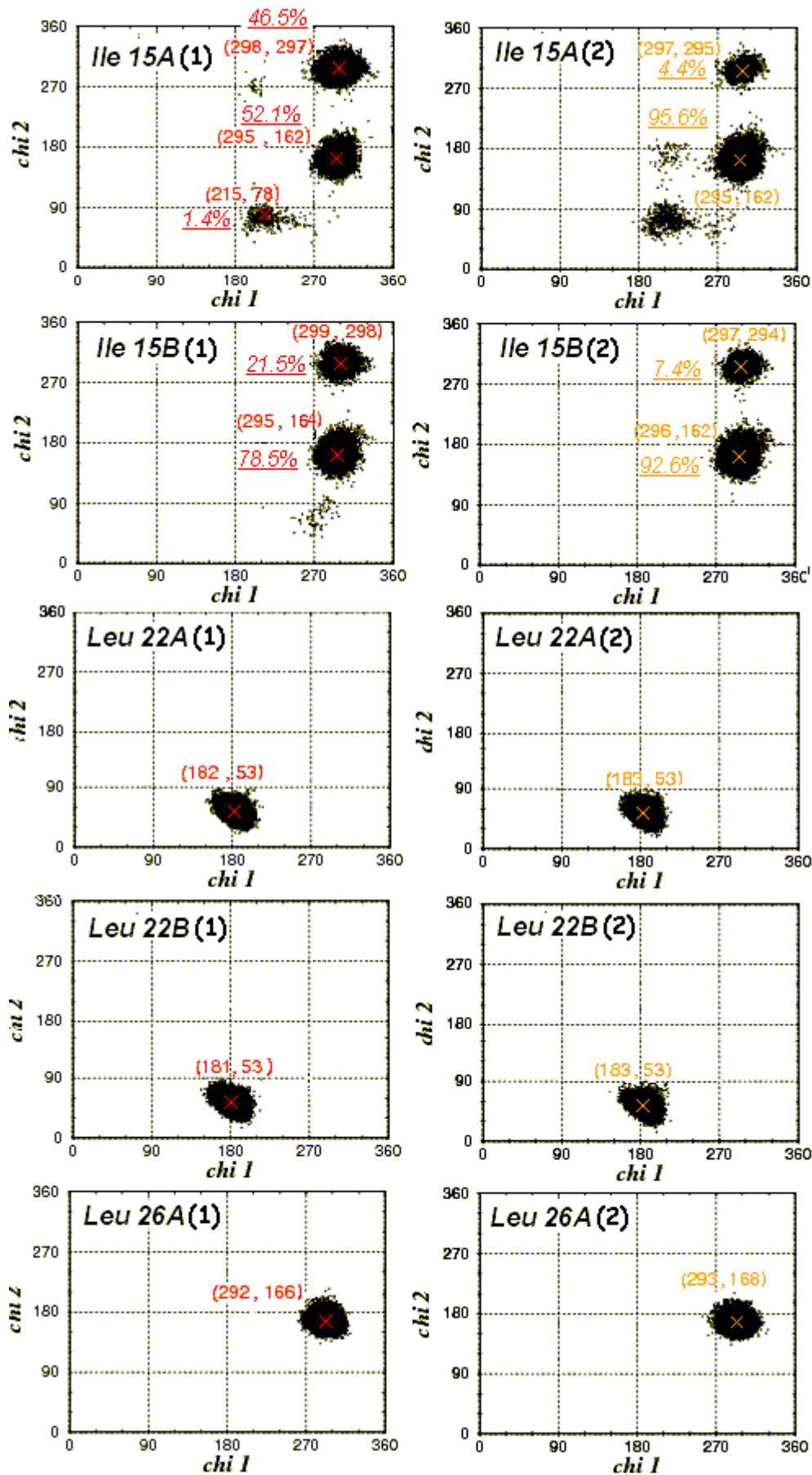
Σχ.47 Σύγκριση των δομικών αλλαγών της μέσης από την αρχική δομή (μπλε χρώμα) για τα τροχιακά 1 (κόκκινο χρώμα) και 2 (πράσινο χρώμα) (πρόγραμμα VMD [χιχ]).

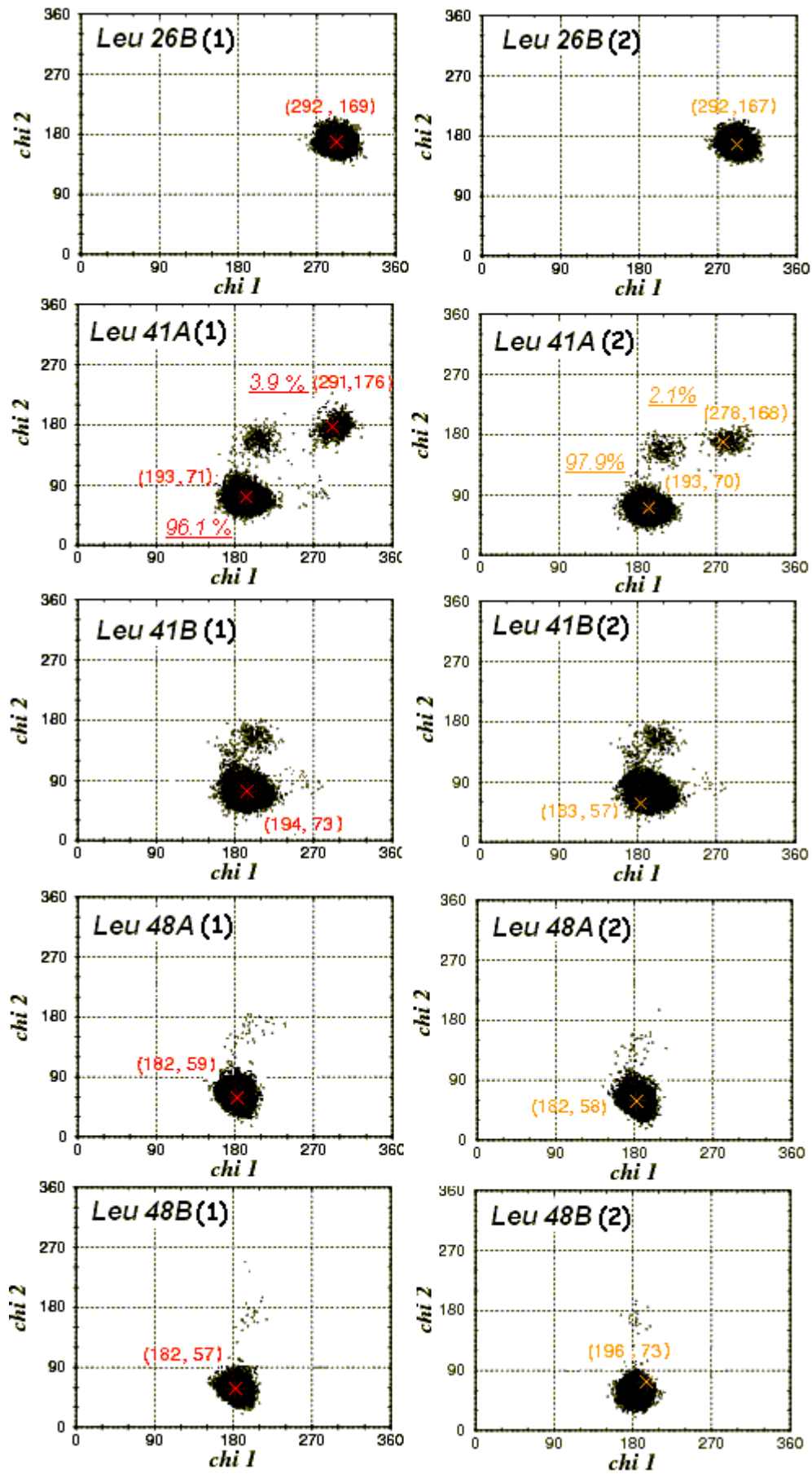


Σύγκριση της κατανομής των στροφομερών

Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των στροφομερικών διαμορφώσεων των καταλοίπων της πρωτεΐνης των δύο τροχιακών (Σχ.48). Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα η πρωτεΐνη και στις δύο περιπτώσεις αποκτά παρόμοιες διαμορφώσεις και δεν υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις όσον αφορά τη θέση των κεντροϊδών των συστάδων. Κάπως πιο σημαντική διαφορά παρατηρείται στα ποσοστά των διαφορετικών διαμορφώσεων που ανήκουν στα κεντροϊδή των καταλοίπων της Ile15. Αυτό υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη «περνά» διαφορετικό χρονικό διάστημα στις διαμορφώσεις των διαφορετικών συστάδων, γεγονός που οφείλεται στον τυχαίο χαρακτήρα των προσομοιώσεων.

Σχ.48 Παράπλευρη σύγκριση των διαγραμμάτων χ_1 - χ_2 των καταλοίπων του υδρόφοβου πυρήνα της Rop για τις **προσομοιώσεις 1 και 2** (A: μονομερές A, B: μονομερές B, 1: προσομοίωση 1, 2: προσομοίωση 2).

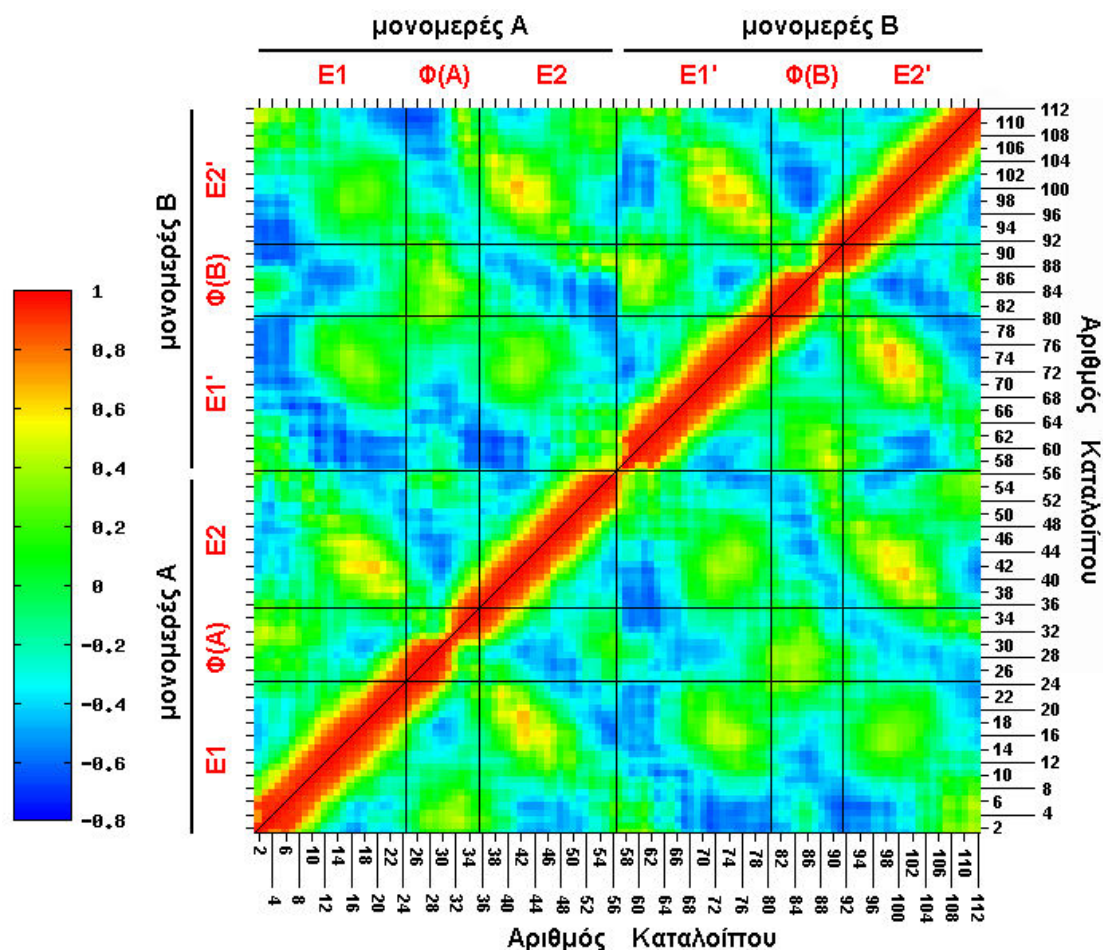




Σύγκριση της cross-correlation

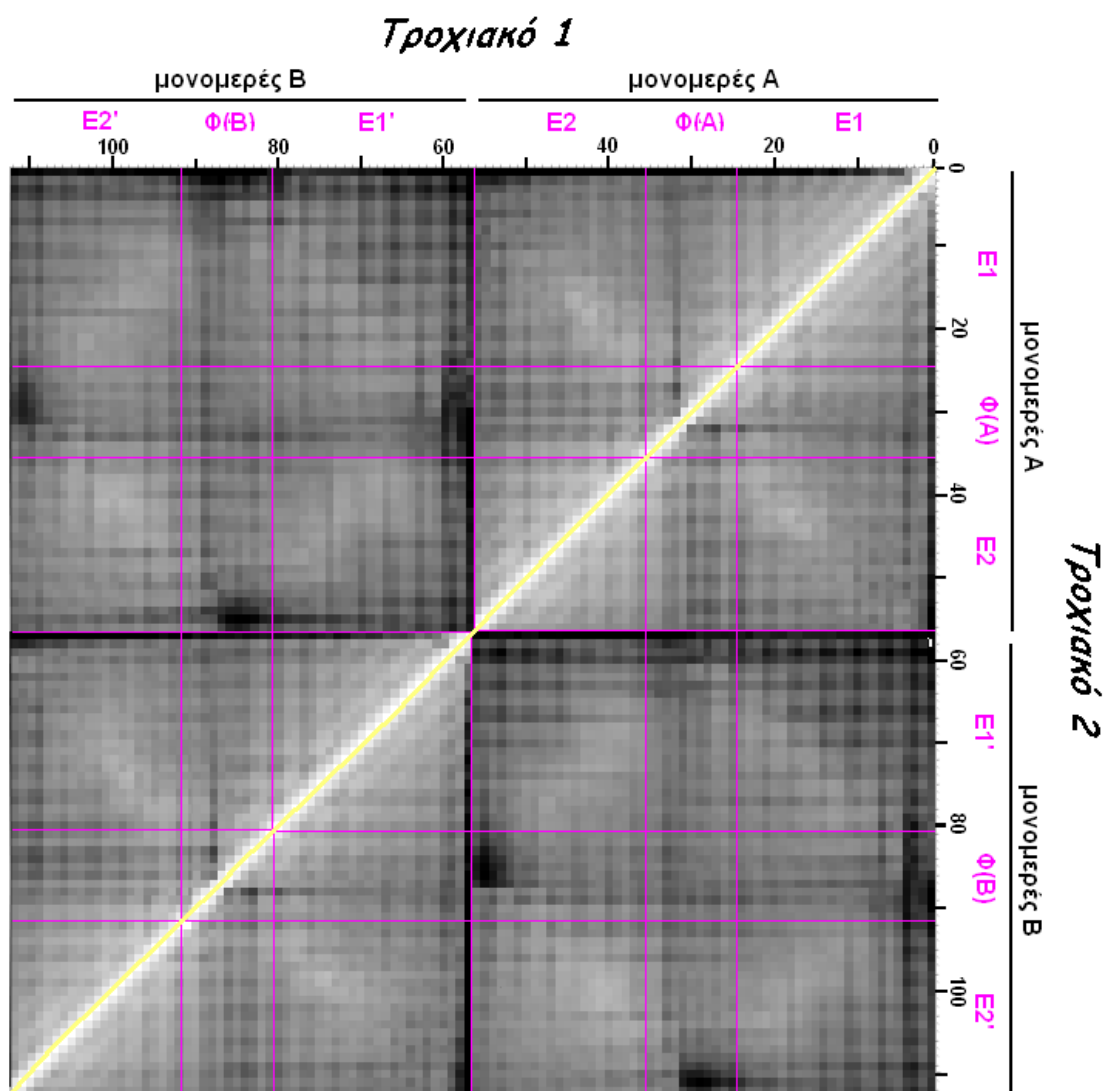
Η σύγκριση των χαρτών cross-correlation των ατόμων CA των δύο τροχιακών δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις, όπως φαίνεται από τη σχεδόν κατοπτρική μορφή του χάρτη συνένωσης των δύο αρχικών χαρτών (Σχ.49). Επομένως τα άτομα άνθρακα κινούνται με τον ίδιο τρόπο σχετικά το ένα με το άλλο και στις δύο προσομοιώσεις.

Σχ.49 Αντιπαραβολή των χαρτών cross-correlation των ατόμων CA για τις προσομοιώσεις **1** (κάτω δεξιά της διαγωνίου) και **2** (πάνω αριστερά της διαγωνίου).



Σύγκριση του χάρτη απόστασης CA-CA RMSD

Σύγκριση των χαρτών απόστασης CA-CA RMSD μεταξύ των δύο τροχιακών αποκαλύπτει προφανή ομοιότητα στον τρόπο που κινούνται οι έλικες και τα λοιπά δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια των δύο προσομοιώσεων (Σχ.50).

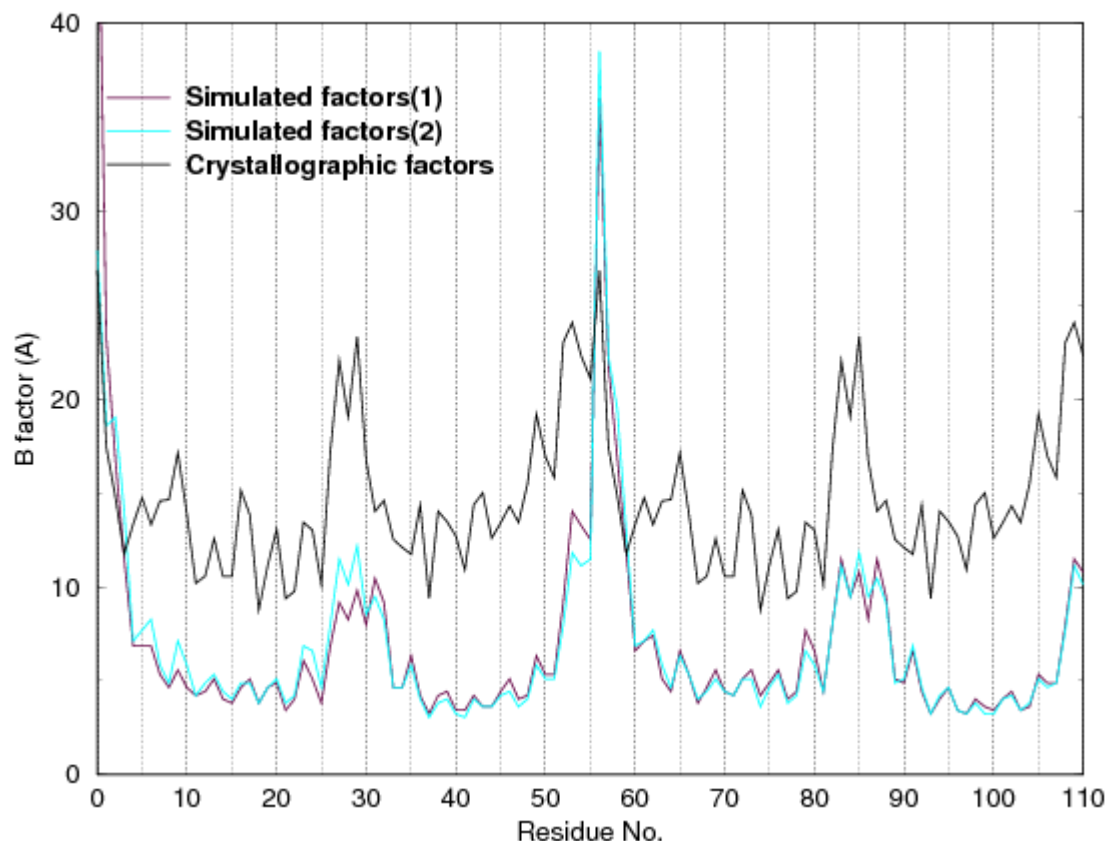


Σχ.50 Ενοποίηση των χαρτών Ca-Ca RMSD της **προσομοίωσης 1** (πάνω αριστερά της κίτρινης διαγωνίου) και της **προσομοίωσης 2** (κάτω δεξιά της κίτρινης διαγωνίου). Οι αριθμοί δείχνουν τον αριθμό των καταλοίπων ενώ με ροζ οριοθετούνται οι διαφορετικές δευτεροταγείς δομές της πρωτεΐνης. E: έλικες, Φ: στροφές φουρκέτας.

Σύγκριση των ατομικών διακυμάνσεων

Για τη σύγκριση των ατομικών διακυμάνσεων των δύο τροχιακών παραβάλλονται σε διάγραμμα οι ατομικοί θερμοκοί παράγοντες που υπολογίστηκαν για τις δύο προσομοιώσεις (Σχ.51) (σελ.40). Η ομοιότητα είναι εξαιρετική, ειδικά στις περιοχές των ελίκων. Στις περιοχές των φουρκετών και των άκρων της πρωτεΐνης παρουσιάζονται μικρές αποκλίσεις, αλλά οι κορυφές και τα ελάχιστα των τιμών παρατηρούνται στα ίδια κατάλοιπα.

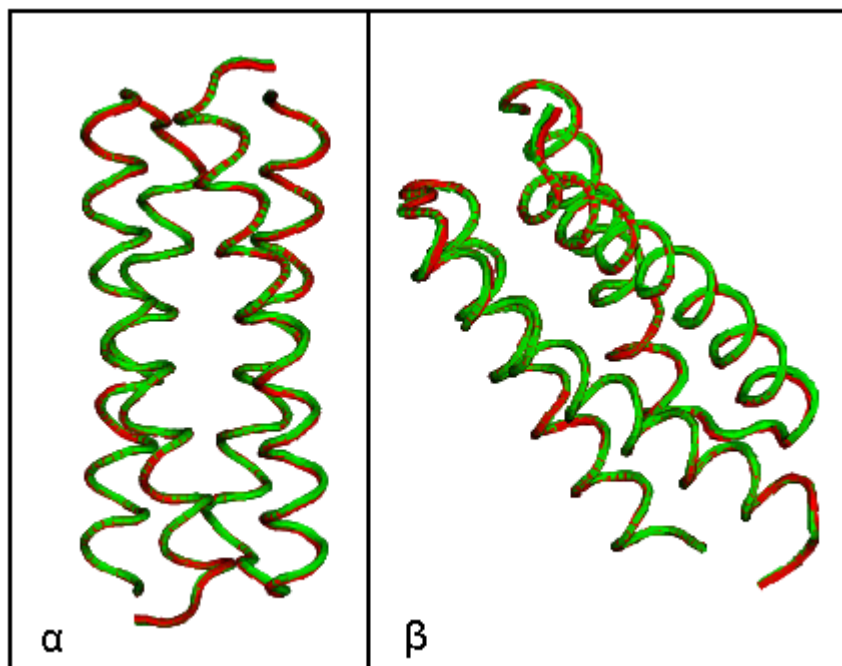
Σχ.51 Σύγκριση των ατομικών θερμικών παραγόντων που υπολογίστηκαν από την **προσομοίωση 1** (μελιτζανί χρώμα) & **2** (γαλάζιο χρώμα) σε σχέση με τους κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένους παράγοντες (μαύρο χρώμα).



Σύγκριση της μέσης δομής

Για τη σύγκριση των μέσων δομών των δύο τροχιακών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα VMD [xix] (Σχ.52). Οι δύο μέσες δομές είναι σχεδόν πανομοιότυπες με μέση απόκλιση (RMSD) μεταξύ των CA ατόμων τους 0.17\AA . Οι μεγαλύτερες αποκλίσεις παρατηρούνται, όσον αφορά το μονομερές A, σε ένα κατάλοιπο της φουρκέτας (29), πέντε κατάλοιπα των άκρων (1-4, 56) και τέσσερα κατάλοιπα της έλικας (10, 24, 25, 28). Για το μονομερές B της πρωτεΐνης τα αντίστοιχα κατάλοιπα είναι τέσσερα στην ουρά (1-4), τρία στην έλικα (7, 10, 11) και έξι στην περιοχή της φουρκέτας (27-31, 33).

Σχ.52 Σύγκριση των μέσων δομών των δύο τροχιακών μετά από βέλτιστη χωρική υπέρθεση (κόκκινο: μέση δομή **προσομοίωσης 1**, πράσινο: μέση δομή **προσομοίωσης 2**).



Συζήτηση

Δύο ανεξάρτητα τροχιακά δείχνουν πάρα πολύ καλή μεταξύ τους συμφωνία τόσο όσον αφορά τη δομή, όσο και τη δυναμική της Rop. Οι ενδείξεις από αυτά τα τροχιακά υποδεικνύουν ότι έχει επιτευχθεί *sufficient sampling* το οποίο επιτρέπει τη λεπτομερή ανάλυση των δυναμικών ιδιοτήτων της Rop. Η διαθεσιμότητα αυτών των τροχιακών είναι ένα σημαντικό και αναγκαίο βήμα για τη συγκριτική ανάλυση με τροχιακά από μεταλλάγματα και παραλλαγές της Rop. Τέτοιες συγκρίσεις (σε επίπεδο μοριακής δυναμικής) ίσως βοηθήσουν στην κατανόηση του μηχανισμού αναδίπλωσης αυτής της πρωτεΐνης και στη μελέτη της σχέσης αλληλουχίας-δομής.

Βιβλιογραφία

1. Actis L., Tolmasky M.E., Crosa J.H. (1999): Bacterial Plasmids: Replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Frontiers in Bioscience* **3**: 43-62.
2. Allen M.P. (2004): Introduction to Molecular Dynamics Simulation. *NIC Series* **23**: 1-28.
3. Banner D.W., Kokkinidis M., Tsernoglou D. (1987): Structure of the ColE1 Rop Protein at 1.7Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **196**: 657-675.
4. Betz S.F., Liebman P.A., DeGrado W.F. (1997): *De Novo* Design of Native Proteins: Characterization of Proteins Intended to Fold into Antiparallel, Rop-like, Four-Helix Bundles. *Biochem.* **36**: 2450-2458.
5. Brooks C.L., Karplus M., Pettitt B.M. (1988): Proteins: A theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics. *Wiley*, USA.
6. Castagnoli L., Scarpa M., Kokkinidis M., Banner D.W., Tsernoglou D., Cesareni G. (1989): Genetic and structural analysis of the ColE1 Rop (Rom) protein. *EMBO J.* **8**: 621-629.
7. Castagnoli L., Vertiani C., Cesareni G. (1994): Linking an Easily Detectable Phenotype to the Folding of a Common Structural Motif. Selection of Rare Turn Mutations that Prevent the Folding of Rop. *J. Mol. Biol.* **237**: 378-387.
8. Ceruso M.A., Grottesi A., Di Nola A. (1999): Effects of core packing on the structure, function, and mechanics of a four-helix-bundle protein Rop. *Proteins* **36**: 436-446.
9. Chou K-C., Maggiora G.M., Nemethy G., Sceraga H.A. (1988): Energetics of the structure of the four- α -helix bundle in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4295-4299.
10. Cohen C., Parry D.A.D. (1986): α -Helical coiled-coils- A widespread motif in proteins. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 245-248.
11. Comolli L.R., Pelton J.G., Tinoco I. (1998): Mapping of a protein-RNA kissing hairpin interface: Rom and Tar-Tar*. *Nucl. Acids Research* **26**: 4688-4695.
12. Dalal S., Balasubramanian S., Regan L. (1997): Protein alchemy: Changing β -sheet into α -helix. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 548-552.
13. Dalal S., Regan L. (2000): Understanding the sequence determinants of conformational switching using protein design. *Prot. Sci.* **9**: 1651-1659.
14. Darden T., York D., Pedersen L. (1993): Particle mesh Ewald: An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**: 10089-10092.
15. Deserno M., Holm C. (1998): How to mesh up Ewald sums (I): A theoretical and numerical comparison of various particle mesh routines. *J. Chem. Phys.* **109**: 7678-7693.
16. Eberle W., Klaus W., Cesareni G., Sander C., Rosch P. (1990): Proton Nuclear Magnetic Resonance Assignments and Secondary Structure Determination of the ColE1 rop (rom) *Protein. Biochem.* **29**: 7402-7407.
17. Eberle W., Pastore A., Sander C., Rosch P. (1991): The structure of the ColE1 rop in solution. *J. Biomol. NMR* **1**: 71-82.

18. Eguchi Y., Tomizawa J.I. (1991): Complex formed by complementary RNA stem-loops: their formations, structures and interaction with ColE1 Rom protein. *J. Mol. Biol.* **220**: 831-842.
19. Fadouloglou V.E., Glykos N.M., Kokkinidis M. (2001): Side-chain conformations in 4- α -helical bundles. *Protein Engineering* **14**: 321-328.
20. Feller S.E., Zhang Y., Pastor R.W., Brooks B.R. (1995): Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *J.Chem.Phys.* **103**: 4613-4621.
21. Glykos N.M., Cesareni G., Kokkinidis M. (1999): Protein plasticity to the extreme: changing the topology of a 4- α -helical bundle with a single amino acid substitution. *Struct.* **7**: 597-603.
22. Glykos N.M., Kokkinidis M. (2004): Structural Polymorphism of a Marginally Stable 4- α -Helical Bundle. Images of a Trapped Molten Globule? *Proteins Struct. Funct. Genet.* **56**: 420-425.
23. Gorfe A.A., Caflisch A., Jelesarov Ilian. (2004): The role of flexibility and hydration on the sequence-specific DNA recognition by the Tn916 integrase protein: a molecular dynamics analysis. *J. Mol. Recognit.* **17**: 120-131.
24. Guimaraes C.R.W., Barreiro G., Fernandes C.A., Bicca R. (2003): On the Application of Simple Explicit Water Models to the Simulations of Biomolecules. *Brazilian Journal of Physics* **34**: 126-136.
25. Haile J.M. (1997): Molecular Dynamics Simulation: Elementary Methods. *Wiley, USA*.
26. Harris N.L., Presnell S.R., Cohen F.E. (1994): Four Helix Bundle Diversity in Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* **236**: 1356-1368.
27. Helmer-Citterich M., Anceschi M.M., Banner D.W., Cesareni G. (1988): Control of ColE1 replication: low affinity specific binding of Rop (Rom) to RNAI and RNAII. *EMBO J.* **7**: 557-566.
28. Hoffmann D., Knapp E-W. (1997): Folding pathways of a helix-turn-helix model protein. *J. Phys. Chem.* **101**: 6734-6740.
29. Hub J.S., Salditt T., Rheinstädter M.C., de Groot B.L.(2007): Short range order and collective dynamics of DMPC bilayers. A comparison between molecular dynamics simulations, x-ray, and neutron scattering experiments. *Biophys. J.*
30. Hünenberger P.H., Mark A.E., Gunsteren W.F. (1995): Fluctuation and Cross-correlation Analysis of Protein Motions Observed in Nanosecond Molecular Dynamics Simulations. *J.Mol.Biol.* **252**: 492-503.
31. Ibragimova G.T., Wade R.C. (1998): Importance of Explicit Salt Ions for Protein Stability in Molecular Dynamics Simulation. *Biophys. Journ.* **74**: 2906-2911.
32. Itoh T., Tomizawa J.I. (1980): Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2450-2454.
33. Kamtekar S., Hecht M.H. (1995): The four-helix bundle: what determines a fold? *FASEB J.* **9**: 1013-1022.
34. Koehl P., Levitt M. (2002): Sequence Variations within Protein Families are Linearly Related to Structural Variations. *J. Mol. Biol.* **323**: 551-562.
35. Kolinski A., Skolnick J. (1994): Monte Carlo Simulations of Protein Folding. II. Application to Protein A, ROP, and Crambin. *Proteins: Struct, Funct. and Genet.* **18**: 353-366.

36. Kresse H.P., Czubayko M., Nyakatura G., Vriend G., Sander C., Bloecker H. (2001): Four-helix bundle topology re-engineered: monomeric Rop protein variants with different loop arrangements. *Prot. Engineer.* **14**: 897-901.
37. Kutzner C. (2005): Towards an efficient implementation of the Particle-Mesh-Ewald (PME) method on low-bandwidth linux clusters. Workshop on Fast Algorithms for Long-Range Interactions, Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry Theoretical and Computational Biophysics Department, Gottingen.
38. Lacatena R.M., Banner D.W., Cesareni G. (1983): In Mechanisms of DNA Replication and Recombination. Alan R. Liss, Inc., New York: 327-336.
39. Lassalle M., Hinz H-J, Wenzel H., Vlasi M., Kokkinidis M., Cesareni G. (1998): Dimer-to-Tetramer Transformation: Loop Excision Dramatically Alters Structure and Stability of the ROP Four α -helix Bundle Protein. *J. Mol. Biol.* **279**: 987-1000.
40. Lassalle M.W., Hinz H-J. (1999): Refolding studies on the tetrameric loop deletion mutant RM6 of ROP protein. *Biol. Chem.* **4**: 459-72.
41. Levy Y., Caflisch A., Onuchic J.N., Wolynes P.G. (2004): The Folding and Dimerization of HIV-1 Protease: Evidence for a Stable Monomer from Simulations. *J.Mol.Biol.* **340**: 67-79.
42. Levy Y., Cho S.S., Shen T., Onuchic J.N., Wolynes P.G. (2005): Symmetry and frustration in protein energy landscapes: A near degeneracy resolves the Rop dimer-folding mystery. *Biophys.* **102**: 2373-2378.
43. Lovell S.C., Word J.M., Richardson J.S., Richardson D.C. (2000): The Penultimate Rotamer Library. *Proteins: Structure, Function and Genetics.* **40**: 389-408.
44. Magliery T.J., Regan L. (2004): A cell-based screen for function of the four-helix bundle protein Rop: a new tool for combinatorial experiments in biophysics. *Prot. Engin. Des. and Selection* **17**: 77-83.
45. Magliery T.J., Regan L. (2004): Combinatorial approaches to protein stability and structure. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1595-1608.
46. Magliery T.J., Regan L. (2004): Library approaches to biophysical problems. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1593-1594.
47. Marino J.P., Gregorian R.S., Csankovszki G., Crothers D.M. (1995): Bent helix formation with complementary loops. *Science* **268**: 1448-1454.
48. Masukata H., Tomizawa J. (1986): Control of primer formation for ColE1 plasmid replication: conformational change of the primer transcript. *Cell* **44**: 125-136.
49. Munson M., Anderson K.S., Regan L. (1997): Speeding up protein folding: mutations that increase the rate at which Rop folds and unfolds by over four orders of magnitude. *Fold. & Des.* **2**: 77-87.
50. Munson M., Balasubramanian S., Fleming K.G., Nagi A.D., O'Brien R., Sturtevant J.M., Regan L. (1996): What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. *Protein Sci.* **5**: 1584-1593.
51. Munson M., O'Brien R., Sturtevant J.M., Regan L. (1994): Redesigning the hydrophobic core of a four-helix-bundle protein. *Protein Sci.* **3**: 2015-2022.

52. Nagi A.D., Anderson K.S., Regan L. (1999): Using Loop Length Variants to Dissect the Folding Pathway of a Four-helix-bundle Protein. *J. Mol. Biol.* **286**: 257-265.
53. Nagi A.D., Regan L. (1997): An inverse correlation between loop length and stability in a four-helix-bundle protein. *Fold.& Des.* **2**: 67-75.
54. Norberg J., Nilsson L. (2000): On the Truncation of Long-Range Electrostatic Interactions in DNA. *Biophys. J.* **79**: 1537-1553.
55. Paliakasis C.D., Kokkinidis M. (1992): Relationships between sequence and structure for the four- α -helix bundle tertiary motif in proteins. *Prot. Engineering* **5**: 739-748.
56. Paul F., Predki L., Nayak M., Morris B.C. Gottlieb, Regan L. (1995): Dissecting RNA-protein interactions: RNA-RNA recognition by ROP. *Cell* **80**: 41-50.
57. 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. *Biol. Chem.* **10**: 1141-52.
58. Polisky B. (1988): ColE1 Replication Control Circuitry: Sense from Antisense. *Cell* **55**: 929-932.
59. Predki P.F., Agrawal V., Brunger A.T., Regan L. (1996): Amino-acid substitutions in a surface turn modulate protein stability. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 54-58.
60. Predki P.F., Nayak L.M., Gottlieb M.B.C., Regan L. (1995): Dissecting RNA-Protein Interactions: RNA-RNA Recognition by Rop. *Cell* **80**: 41-50.
61. Predki P.F., Regan L. (1995): Redesigning the Topology of a Four-Helix-Bundle Protein: Monomeric Rop. *Biochem.* **34**: 9834-9839.
62. Reddy B.V.B., Li W.W., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2001): Conserved Key Amino Acid Positions (CKAAPs) Derived From the Analysis of Common Substructures in Proteins. *Prot. Struct, Funct. and Genet.* **42**: 148-163.
63. Rhee Y.M., Sorin E.J., Jayachandran G., Lindahl E., Pande V.S. (2004): Simulations of the role of water in the protein-folding mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 6456-6461.
64. Rist M., Marino J. (2001): Association of an RNA kissing complex analyzed using 2-aminopurine fluorescence. *Nucl. Acids Research* **29**: 2401-2408.
65. Rosengarth A., Rosgen J., Hinz H-J. (1999): Slow unfolding and refolding kinetics of the mesophilic Rop wild-type protein in the transition range. *Eur. J. Biochem.* **264**: 989-995.
66. Schlick T. (2002): Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide, Springer-Verlag, New-York.
67. Steif C., Hinz H-J., Cesareni J. (1995): Effects of Cavity-Creating Mutations on Conformational Stability and Structure of the Dimeric 4- α -Helical Protein ROP: Thermal Unfolding Studies. *Proteins: Struct, Funct. and Genetics.* **23**: 83-96.
68. Steif C., Weber P., Hinz H.-J. (1993): Subunit Interactions Provide a Significant Contribution to the Stability of the Dimeric Four- α -Helical-Bundle Protein ROP. *Biochem.* **32**: 3867-3876.
69. Tomizawa J.I., Itoh T. (1981): The importance of RNA secondary structure in ColE1 primer formation. *Cell* **31**: 575-583.

70. Tomizawa J.I., Som T. (1984): Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein. *Cell* **38**: 871-878.
71. Vlassi M., Cesareni G., Kokkinidis M. (1999): A correlation between the loss of hydrophobic core packing interactions and protein stability. *J. Mol. Biol.* **2**: 817-27.
72. Vlassi M., Steif C., Weber P., Tsernoglou D., Wilson K.S., Hinz H-J, Kokkinidis M. (1994): Restored heptad pattern continuity does not alter the folding of a four- α -helix bundle. *Struct. Biol.* **1**: 706-716.
73. Willis M.A., Bishop B., Regan L., Brunger A.T. (2000): Dramatic Structural and Thermodynamic Consequences of Repacking a Protein's Hydrophobic Core. *Struct.* **8**: 1319-1328.

Ηλεκτρονική βιβλιοθήκη

- I. Bernstein H.J. (1998-9): Rasmol 2.7.1, molecular graphics visualization tool.
<http://www.openrasmol.org/>
- II. Bhandarkar M., Brunner R., Chipot C., et al. (2003): NAMD User's Guide, Version 2.5. Theoretical Biophysics Group, University of Illinois and Beckman Institute, Urbana.
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.5/ug/>
- III. Brookhaven Protein Data Bank –καταχώρηση ROP
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1ROP>
- IV. Brunger A.T.: Xplor: A System for X-ray Crystallography and NMR. Howard Hughes Medical Institute & Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University.
<http://nmr.cit.nih.gov/xplor-nih/xplorMan/>
- V. Gentleman R., Ihaka R.: The R project for statistical computing, Statistics Department , University of Auckland.
<http://www.r-project.org/>
- VI. Glykos N.M. (2006): Carma: a molecular dynamics analysis program. *J. Comput. Chem.* **27**: 1765-1768.
<http://utopia.duth.gr/~glykos/>
- VII. Gullingsrud J., Saam J., Phillips J. (2006): Psfgen User's Guide, Version 1.4.5. Theoretical Biophysics Group, University of Illinois and Beckman Institute, Urbana.
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/psfgen/ug.pdf>
- VIII. Kleywegt G.J. (2005): Moleman manual, Version 041001. Dept. of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Sweden.
http://alpha2.bmc.uu.se/usf/moleman_man.html
- IX. Ko A.N., Izaguirre J.A., Matthey T.: Evaluation of Fast Electrostatics Algorithms. Department of Computer Science and Engineering University of Notre Dame, USA & department of Informatics University of Bergen, Norway.
http://www.nd.edu/~izaguirr/papers/Evaluation_Fast_Elect_CSE03_files/frame.htm
- X. Matthey T. (2005): Plain Ewald and PME.
<http://protomol.sourceforge.net/ewald.pdf>

- XI. MBG cluster, Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace.
<http://www.mbg.duth.gr/~glykos/cluster/index.html>
- XII. Molecular Dynamics Tutorial at EMBnet.
http://www.ch.embnet.org/MD_tutorial/index.html
- XIII. Protein Data Bank, Rop NMR structures.
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1RPR>
- XIV. Ransom G. Molecular Dynamics Simulation (a brief introduction). Department of computer science, University of North Carolina.
<http://www.cs.unc.edu/~lin/COMP259-S06/LEC/MD.ppt>
- XV. Robinson J. Molecular Dynamics Simulation: Overview. School of Health Information Sciences, University of Texas.
<http://biomachina.org/people/jrobinson/documents/presentations/molecularDynamics/MD2.ppt>
- XVI. Schleif R.: Analysis of Protein Structure and Function: A Beginner's Guide to CHARMM Biology Department Johns Hopkins University.
<http://gene.bio.jhu.edu/book.pdf>
- XVII. Smith L.I.(2002): A tutorial on Principal Component Analysis.
http://csnet.otago.ac.nz/cosc453/student-tutorials/principal_components.pdf
- XVIII. Steinbach P.J.: Introduction to Macromolecular Simulation. Center for Molecular Modeling, Center for Information Technology, National Institutes of Health.
http://cmm.cit.nih.gov/intro_simulation
- XIX. Stone J.E. (2006): VMD User's Guide, Version 1.8.5. Theoretical Biophysics Group, University of Illinois and Beckman Institute, Urbana.
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/current/ug/>
- XX. Theoretical and Computational Biophysics Group: Theory of Molecular Dynamics Simulations. UIUC, Illinois.
<http://www.ks.uiuc.edu/>
- XXI. Theoretical Biophysics Group: NAMD tutorial. University of Illinois and Beckman Institute, Urbana.
<http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-html/node6.html>
- XXII. Williams T., Kelley C.: Gnuplot, an Interactive Plotting Program.
<http://www.gnuplot.info/>
- XXIII. Xmgr.
<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Xmgr>
- XXIV. Zhou R.: Biophysical Chemistry G4170: Introduction to Molecular Dynamics. Thomas Watson Research Center Yorktown Heights, NY.
<http://mcdermott.chem.columbia.edu/biophys/Biophys-FF-Web.pdf>

Παράρτημα

{1} Μεθοδοι αποκοπής:

Η μέθοδος του Διακόπτη (SWITCH): Το δυναμικό αλληλεπίδρασης μειώνεται κατά μήκος ενός προκαθορισμένου εύρους αποστάσεων. Η δυναμική ενέργεια παίρνει την κανονική της τιμή μέχρι το πρώτο κατώφλι και μετά «διακόπτεται» σταδιακά μέχρι μηδενισμού μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου κατωφλιού (Σχ.13).

Μοντέλο ζευγαρώματος (pairwise model): Για να επιταχυνθούν οι υπολογισμοί, αγνοούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων που απέχουν κατά μία προκαθορισμένη απόσταση, τη λεγόμενη απόσταση-κατώφλι. Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τρόποι τερματισμού της αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο ατόμων.

Κολόβωση (truncation): Οι αλληλεπιδράσεις απλά μηδενίζονται για διατομικές αποστάσεις πάνω από την απόσταση-κατώφλι. Αυτή η μέθοδος δε χρησιμοποιείται ευρέως.

Η μέθοδος της Αλλαγής (SHIFT): Τροποποιείται ολόκληρη η δυναμική ενέργεια καθόλη την έκταση της έτσι ώστε η αλληλεπίδραση δυναμικού στην απόσταση-κατώφλι να είναι μηδενική.

{2} Περιορισμοί λόγω χρήσης εμπειρικών δυναμικών πεδίων:

- Δεν επιτρέπονται δραστικές αλλαγές στην ηλεκτρονική δομή (π.χ. δε μπορούν να αναπαρασταθούν γεγονότα όπως η δημιουργία ή το σπάσιμο δεσμών).
- Γίνεται χρήση καθορισμένων ατομικών τύπων κατά τον προσδιορισμό των παραμέτρων του δυναμικού πεδίου. Οι ατομικοί τύποι χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό ενός ατόμου σε μια συγκεκριμένη δεσμική κατάσταση, για παράδειγμα ένα αλειφατικό άτομο άνθρακα σε έναν sp^3 δεσμό έχει διαφορετικές ιδιότητες από ένα άτομο άνθρακα που βρίσκεται σε δακτύλιο ιστιδίνης. Αντί να αναπαρίσταται κάθε άτομο στο μόριο ως μοναδικό με μοναδική σειρά παραμέτρων να το περιγράφουν, υφίσταται ορισμένη ομαδοποίηση για να μειωθεί ο αριθμός των ατομικών τύπων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λάθη. Οι ιδιότητες ορισμένων ατόμων (π.χ. αλειφατικοί άνθρακες ή άτομα υδρογόνου) είναι λιγότερο ευαίσθητες σε σχέση με το περιβάλλον τους και μια απλή σειρά παραμέτρων μπορεί να δουλέψει αρκετά καλά, ενώ άλλα άτομα (όπως το οξυγόνο και το άζωτο) επηρεάζονται κατά πολύ περισσότερο από τα γειτονικά τους άτομα. Αυτά τα άτομα απαιτούν

περισσότερους τύπους και παραμέτρους για τα διαφορετικά δεσμικά περιβάλλοντα.

- Η κατά-ζεύγη προσθετική προσέγγιση. Η ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός ατόμου και του υπόλοιπου συστήματος υπολογίζεται ως άθροισμα των κατά-ζευγών (άτομο με άτομο) αλληλεπιδράσεων, σαν να είναι απομονωμένο το εκάστοτε ζεύγος ατόμων από τα άλλα άτομα του συστήματος. Η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση μεταξύ τριών ή περισσότερων ατόμων δεν υπολογίζεται, και ως εκ τούτου ορισμένα φαινόμενα πόλωσης δεν περιλαμβάνονται σαφώς στο δυναμικό πεδίο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λεπτές διαφορές μεταξύ υπολογισθέντων και πειραματικών αποτελεσμάτων (π.χ. διαφορά στην τιμή της pK).
- Η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας δεν περιλαμβάνει εντροπικά φαινόμενα. Έτσι, μία ελάχιστη τιμή E που
- υπολογίζεται ως άθροισμα των δυναμικών συναρτήσεων δεν αντιστοιχεί απαραίτητα στην ισορροπία, την πιο πιθανή κατάσταση του συστήματος· αυτό αντιστοιχεί στην ελάχιστη τιμή της ελεύθερης ενέργειας. Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα πειράματα διεξάγονται γενικώς υπό ισόθερμες-ισοβαρείς συνθήκες (σταθερή πίεση, θερμοκρασία και μέγεθος του συστήματος) η θέση ισορροπίας αντιστοιχεί στο ελάχιστο της ελεύθερης ενέργειας του Gibbs, G . Ενώ, δηλαδή, οι ενεργειακοί υπολογισμοί αγνοούν τα εντροπικά φαινόμενα, αυτά περιλαμβάνονται στις μοριακές δυναμικές προσομοιώσεις.

{3} Κινήσεις βιολογικών μορίων [5]

Τα βιολογικά μόρια επιδεικνύουν μια σειρά κινήσεων που συμβαίνουν σε διαφορετική χρονική κλίμακα.

I. Τοπικές Κινήσεις (0.01 με 5 Å, 10^{-15} με 10^{-1} s)

(α) Ατομικές διακυμάνσεις

1. Μικρές εκτοπίσεις απαιτούμενες για πρόσδεση υποστρώματος (πολλά ένζυμα)
2. Ελαστικότητα απαιτούμενη για κινήσεις «σταθερού σκελετού» (λυσοζύμη, ηπατική αλκοολική αφυδρογονάση, 1-arabinose binding protein)
3. Ενεργειακή «πηγή» για υπέρβαση ορίων και λοιπών ενεργοποιημένων διαδικασιών)
4. Εντροπική «πηγή» για δέσμευση προσδέτη και δομικές αλλαγές

(β) Κινήσεις πλευρικών αλυσίδων

1. Άνοιγμα μονοπατιών για την είσοδο και την έξοδο του προσδέτη
2. Κλείσιμο της ενεργούς περιοχής (καρβοξυπεπτιδάση)

(γ) Κινήσεις φουρκετών

1. Μετάβαση ενεργοποίησης-απενεργοποίησης μέσω κάλυψης της ενεργούς περιοχής (τριόζη της φωσφορικής ισομεράσης, πενικιλοπεψίνη)
2. Αναδιάταξη μέρος της κίνησης σταθερού σκελετού (ηπατική αλκοολική αφυδρογονάση)
3. Μετάβαση ενεργοποίησης-απενεργοποίησης μέρος της ενζυμικής ενεργοποίησης (τρυψινογόνο-τρυψίνη)
4. Μετάβαση ενεργοποίησης-απενεργοποίησης μέρος του ιϊκού σχηματισμού (tobacco mosaic virus, tomato bush stunt virus)

(δ) Κινήσεις βραχίονα

1. Εξειδίκευση της πρόσδεσης (αλληλεπίδραση λ-καταστολέα-χειριστή)

II. Κινήσεις Σταθερού Σκελετού (1 με 10 \AA , 10^{-9} με 1s)

(α) Κινήσεις έλικας

1. Επαγωγή μεγαλύτερης κλίμακας δομικών αλλαγών (ινσουλίνη)
2. Μεταβάσεις μεταξύ καταστάσεων (μυογλοβίνη)

(β) Κινήσεις δομικών μονάδων

1. Άνοιγμα και κλείσιμο της επικράτειας της ενεργούς περιοχής (εξωκινάση, ηπατική αλκοολική δεϋδρογονάση, 1-arabinose binding protein)
2. Άυξηση της περιοχής πρόσδεσης των αντιγόνων (αντισώματα)

(γ) Κινήσεις υπομονάδων

1. Αλλοστερικές μεταπτώσεις που ελέγχουν την πρόσδεση και την ενεργότητα (αιμοσφαιρίνη, ασπαρτική τρανσκαρβαμοϋλάση)

III. Μεγάλης Κλίμακας Κινήσεις ($>5 \text{ \AA}$, 10^{-7} με 10^4s)

(α) Μεταθέσεις ελικοειδούς σπειράματος

1. Ενεργοποίηση ορμονών (γλουκαγόνο)
2. Αναδίπλωση πρωτεϊνών

(β) Συνδέσεις/Αποσυνδέσεις και Δομικές Αλλαγές κατά

Ζεύγη

1. Σχηματισμός ιών (tobacco mosaic virus, tomato bush stunt virus)
2. Ενεργοποίηση κυτταρικών πρωτεϊνών διάχυσης (αιμαγλουτινίνη)

(γ) Άνοιγμα και Διακυμάνσεις Συστροφής

1. Πρόσδεση και ενεργοποίηση (πρωτεΐνες πρόσδεσης ασβεστίου)

(δ) Αναδίπλωση και Ξετύλιγμα

1. Σύνθεση και αποδόμηση πρωτεϊνών

{4} Τα αρχεία εκτέλεσης (scripts) των προσομοιώσεων (πρόγραμμα NAMD [II]).

- ελαχιστοποίηση (minimization) και προθέρμανση (heating):

```
#
# Input files
#
structure           ionized.psf
coordinates         ionized.pdb
parameters          par_all27_prot_na.inp
paraTypeCharmm     on

#
# Output files & writing frequency for DCD
# and restart files
#
outputname          output/heat_out
binaryoutput        off
restartname         output/restart
restartfreq         1000
binaryrestart       yes
dcdFile             output/heat_out.dcd
dcdFreq             200

#
# Frequencies for logs and the xst file
#
outputEnergies      20
outputTiming        200
xstFreq             200

#
# Timestep & friends
#
timestep            2.0
stepsPerCycle       8
nonBondedFreq       2
fullElectFrequency  4

#
# Simulation space partitioning
#
switching           on
switchDist          10
cutoff              12
pairlistdist        13.5

#
# Basic dynamics
#
temperature         0
COMmotion           no
```

```

dielectric          1.0
exclude            scaled1-4
1-4scaling         1.0
rigidbonds        all

#
# Particle Mesh Ewald parameters.
#
Pme                on
PmeGridsizeX      80
PmeGridsizeY      64
PmeGridsizeZ      60

#
# Periodic boundary things
#
wrapWater          on
wrapNearest       on

cellBasisVector1   78.60   00.00   00.00
cellBasisVector2   00.00   60.10   00.00
cellBasisVector3   00.00   00.00   56.83
cellOrigin         0.00    0.00    2.44

#
# Fixed atoms for initial heating-up steps
#
fixedAtoms         on
fixedAtomsForces   on
fixedAtomsFile     fix_backbone.pdb
fixedAtomsCol      B

#
# Restrained atoms for initial heating-up steps
#
constraints        on
consRef            restrain_ca.pdb
consKFile          restrain_ca.pdb
consKCol           B

#
# Langevin dynamics parameters
#
langevin           on
langevinDamping    10
langevinTemp       320
langevinHydrogen   on

langevinPiston     on
langevinPistonTarget 1.01325
langevinPistonPeriod 200
langevinPistonDecay 100
langevinPistonTemp 320

useGroupPressure   yes

#
# run one step to get into scripting mode
#
minimize           0

#
# turn off pressure control until later
#
langevinPiston     off

```

```

#
# minimize nonbackbone atoms
#
minimize          2000
output            output/min_fix

#
# min all atoms
#
fixedAtoms        off
minimize          2000
output            output/min_all

#
# heat with CAs restrained
#
set temp 20;
while { $temp < 321 } {
  langevinTemp     $temp
  run              2000
  output           output/heat_ca
  set temp [expr $temp + 20]
}

#
# equilibrate volume with CAs restrained
#
langevinPiston    on
run              10000
output            output/equil_ca

#
# equilibrate volume without restraints
#
constraintScaling 0
run              100000

```

- εξισορρόπηση (equilibration):

```

#
# Input files
#
structure          ionized.psf
coordinates        heat_out.coor
velocities         heat_out.vel
extendedSystem     heat_out.xsc
parameters         par_all27_prot_na.inp
paraTypeCharmm    on

#
# Output files & writing frequency for DCD
# and restart files
#
outputname         output/equi_out
binaryoutput      off
restartname        output/restart
restartfreq       1000
binaryrestart      yes
dcdFile           output/equi_out.dcd
dcdFreq           200

#
# Frequencies for logs and the xst file

```



```

#
outputEnergies          20
outputTiming            200
xstFreq                 200

#
# Timestep & friends
#
timestep                2.0
stepsPerCycle           8
nonBondedFreq           2
fullElectFrequency      4

#
# Simulation space partitioning
#
switching               on
switchDist              10
cutoff                  12
pairlistdist            13.5

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

#
# Particle Mesh Ewald parameters.
#
Pme                     on
PmeGridsizeX            80
PmeGridsizeY            64
PmeGridsizeZ            60

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

#
# Langevin dynamics parameters
#
langevin                on
langevinDamping         1
langevinTemp            320
langevinHydrogen        on

langevinPiston          on
langevinPistonTarget    1.01325
langevinPistonPeriod    200
langevinPistonDecay     500
langevinPistonTemp      320

useGroupPressure        yes

firsttimestep           146000
run                     5000000

```

Βεβαίωση

Βεβαιώνω ότι πραγματοποίησα τη συγκεκριμένη εργασία αυτόνομα και δε χρησιμοποίησα άλλες πηγές και βοηθήματα από όσα έχουν προαναφερθεί.

Ημερομηνία

Υπογραφή