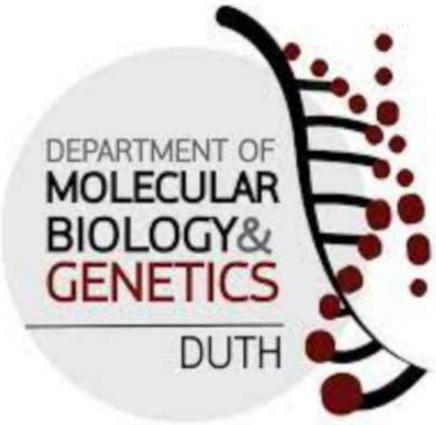




ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ | DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE

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

In silico folding of a three-stranded β-sheet peptide with aromatic cross-links

BSc Thesis

Author: Anastasios Zachariadis
Department Register Number: 2406

Academic Supervisor: Nicholas M. Glykos
Associate Professor of Structural and Computational Biology

Alexandroupolis, Greece
November, 2026





ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Υπολογιστικές μελέτες της αναδίπλωσης ενός τρίκλωνου β-πτυχωτού πεπτιδίου με αρωματικές επαφές

Πτυχιακή Εργασία

Συγγραφέας: Αναστάσιος Ζαχαριάδης
Αριθμός Μητρώου Τμήματος: 2406

Επιβλέπων Καθηγητής: Νικόλας Μ. Γλυκός
Αναπληρωτής Καθηγητής Δομικής και Υπολογιστικής Βιολογίας

Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα
Νοέμβριος, 2026

DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY & GENETICS
ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE

BSc Thesis

In silico folding of a three-stranded β-sheet peptide with aromatic cross-links

Author: Anastasios Zachariadis, 2406
Academic Supervisor: Nicholas M. Glykos
Associate Professor of Structural and Computational Biology

I declare that the present thesis entitled 'In silico folding of a three-stranded β-sheet peptide with aromatic cross-links' is original and was carried out by me personally, as an undergraduate student of the Department of Molecular Biology and Genetics, with Registration Number 2406. I certify that during the preparation and writing of the thesis, all legal requirements were followed, and that the principles of academic ethics and integrity were fully adhered to, which prohibit the falsification of results, the misuse of others' intellectual property, and plagiarism.

Alexandroupolis, Greece
November, 2026

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ | DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE

Πτυχιακή Εργασία

Υπολογιστικές μελέτες της αναδίπλωσης ενός τρίκλωνου β-πτυχωτού πεπτιδίου με αρωματικές επαφές

Συγγραφέας: Αναστάσιος Ζαχαριάδης, 2406
Επιβλέπων Καθηγητής: Νικόλας Μ. Γλυκός
Αναπληρωτής Καθηγητής Δομικής και Υπολογιστικής Βιολογίας

Δηλώνω ότι η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Υπολογιστικές μελέτες της αναδίπλωσης ενός τρίκλωνου β-πτυχωτού πεπτιδίου με αρωματικές επαφές» είναι πρωτότυπη και πραγματοποιήθηκε από εμένα προσωπικά, ως προπτυχιακός φοιτητής του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, με αριθμό μητρώου 2406. Βεβαιώνω ότι κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας και της συγγραφής της εργασίας τηρήθηκαν όλες οι νομικές απαιτήσεις και ότι ακολουθήθηκαν πλήρως οι αρχές της ακαδημαϊκής ηθικής και δεοντολογίας, οι οποίες απαγορεύουν την παραποίηση αποτελεσμάτων, την κατάχρηση της πνευματικής ιδιοκτησίας τρίτων και την λογοκλοπή.

Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα
Νοέμβριος, 2026

Abstract

Molecular dynamics simulations are a tool for studying peptide dynamics and evaluating experimental structures. In this study, we investigate whether these simulations and, more specifically, the folding simulations can accurately characterize the dynamics of two model peptides IYL and LYW in comparison with an experimental structure determined by NMR. These two peptides were studied using two different potential fields from the AMBER ff99SB family: ff99SB-ILDN-P and ff99SB-STAR-ILDN. This resulted in a total of four simulation runs. The analysis was performed using Grcarma software and combined RMSD matrices, secondary structure determination via STRIDE, PCA analysis (cPCA and dPCA), and comparison with the lowest-energy experimental structure derived from the NMR results. The results revealed differences in the behaviors of the two peptides across the different simulation sets. IYL exhibited a wider range of conformations, while LYW tended to retain β-sheet structures to a greater extent. Neither peptide was able to show a very high degree of similarity to the experimental NMR structure. It was observed that IYL exhibited greater structural similarity under the parameters of the ff99SB-ILDN-P potential field, while LYW exhibited greater structural similarity under the parameters of the ff99SB-STAR-ILDN potential field..The results of this study warrant special attention, as the simulation conditions varied in terms of both the dynamic range and the temperature and duration of the simulation. These results highlight the importance of conducting additional analyses on these peptides.

Keywords: Molecular Dynamics simulations (MD), folding, β-sheet peptide, aromatic cross-links.

Περίληψη

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics) αποτελούν ένα μέσο για την μελέτη δυναμικής των πεπτιδίων και την αξιολόγηση των πειραματικών δομών. Στην παρούσα μελέτη ελέγχουμε αν αυτές οι προσομοιώσεις και, πιο συγκεκριμένα, οι προσομοιώσεις αναδίπλωσης είναι σε θέση να χαρακτηρίσουν με ακρίβεια την δυναμική δυο πεπτιδίων - μοντέλων, του IYL και του LYW, σε σύγκριση με μια πειραματική δομή που προέκυψε μέσω NMR. Τα δύο αυτά πεπτίδια μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά δυναμικά πεδία της οικογένειας AMBER ff99SB, το ff99SB-ILDN-P και το ff99SB-STAR-ILDN. Έτσι δημιουργήθηκαν συνολικά 4 σύνολα προσομοίωσης. Η ανάλυση έγινε μέσω του λογισμικού Grcarma και συνδύασε RMSD matrices, προσδιορισμό δευτεροταγούς δομής μέσω STRIDE, ανάλυση PCA (cPCA και dPCA) και σύγκριση με την πειραματική δομή χαμηλότερης ενέργειας από το σύνολο των αποτελεσμάτων της NMR. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν διαφορές στις συμπεριφορές των δύο πεπτιδίων μέσα στα διαφορετικά σύνολα προσομοιώσεων. Το IYL έδειξε μεγαλύτερο εύρος όσον αφορά τις διαμορφώσεις που υιοθετούσε, ενώ το LYW έτεινε να διατηρεί περισσότερο τις δομές τρίκλωνων β-φύλλων. Κανένα από τα δύο πεπτίδια δεν κατάφερε να εμφανίσει πολύ υψηλή ομοιότητα με την πειραματική δομή της NMR. Παρατηρήθηκε ότι το IYL εμφάνισε μεγαλύτερη δομική ομοιότητα υπό τις παραμέτρους του δυναμικού πεδίου ff99SB-ILDN-P, ενώ το LYW εμφάνισε μεγαλύτερη δομική ομοιότητα υπό τις παραμέτρους του δυναμικού πεδίου ff99SB-STAR-ILDN. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής, καθώς οι συνθήκες προσομοίωσης διέφεραν τόσο στο δυναμικό πεδίο, όσο στην θερμοκρασία και την χρονική διάρκεια της προσομοίωσης. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν την σημασία συμπληρωματικών αναλύσεων πάνω στα πεπτίδια αυτά.

Λέξεις-Κλειδιά: Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, αναδίπλωση, πεπτίδιο β-φύλλου, αρωματικές διασταυρωτικές συνδέσεις.

Ευχαριστίες

Σε αυτό το κομμάτι θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον καθηγητή μου Δρ. Νικόλα Μ. Γλυκό για την υπομονή και την υποστήριξη που μου παρείχε καθ'όλη την διάρκεια αυτής της πτυχιακής εργασίας. Τον ευχαριστώ επίσης για την ώθηση που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτόν τον περίπλοκο κόσμο των μοριακών προσομοιώσεων που όσο και να τον μελέτησα σίγουρα δεν έγινε πιο απλός.

Ευχαριστώ επίσης πάρα πολύ τους φίλους μου και τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο, οι οποίοι βρισκόντουσαν εκεί για να με στηρίξουν και να ακούσουν τους προβληματισμούς μου κάθε φορά που η εργασία αυτή γινόταν πολύ απαιτητική.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να δώσω επίσης και στην κοπέλα μου, η οποία ήταν δίπλα μου και με στήριζε συνέχεια, ακόμα και αν πολλές φορές δεν καταλάβαινε ποιό ακριβώς ήταν το πρόβλημα που αντιμετώπιζα.

Τέλος αλλά εξίσου πολύ θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδελφό μου για την συνεχής υποστήριξη που μου δίνουν κάθε φορά που προσπαθώ κάτι καινούργιο στην ζωή μου. Είμαι σίγουρος ότι αυτή η εργασία είναι μόνο η αρχή από πολλές νέες αφετηρίες για μένα και τους ευχαριστώ εκ των προτέρων για την κατανόηση και την υποστήριξη που θα μου δείξουν.

Πίνακας Περιεχομένων

Abstract 5
Περίληψη 6
Ευχαριστίες 7
1. Εισαγωγή
1.1 Πρωτεΐνες και μοριακές προσομοιώσεις 9
1.2 Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας 10
1.3 Η πρώτη επαφή με τα πεπτίδια 10
1.4 Η επιλογή των πεπτιδίων και των δυναμικών πεδίων 12
2. Μέθοδοι
2.1 Οι διαφορές μεταξύ των τριών πεπτιδίων που δημιουργήθηκαν 13
2.2 Η δημιουργία των πρωταγωνιστών (των πεπτιδίων) 14
2.3 Η δημιουργία των δομών NMR των πεπτιδίων 14
2.4 Οι συμπρωταγωνιστές (τα δυναμικά πεδία) 15
2.5 Λίγα χαρακτηριστικά των δυναμικών πεδίων 15
2.6 Τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν 16
2.7 Οι αναλύσεις που τρέξαμε 16
3. Αποτελέσματα
3.1 Η ανάλυση δευτεροταγούς δομής και το RMSD matrix 17
3.2 Αποτελέσματα της ανάλυσης δευτεροταγούς δομής και RMSD matrix 18
3.3 Λίγα λόγια για την ανάλυση PCA (cPCA, dPCA) 23
3.4 Αποτελέσματα της ανάλυσης PCA 24
3.5 Λίγα λόγια για την υπέρθεση (superposition) 62
3.6 Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης 64
4. Συμπεράσματα 76
5. Συζήτηση 80
6. Βιβλιογραφία 82

1. Εισαγωγή

1.1 Πρωτεΐνες και μοριακές προσομοιώσεις

Ίσως για αρκετούς η δομική βιολογία να μην είναι και ο πιο ενδιαφέρον τομέας των βιολογικών επιστημών, μας προσφέρει ωστόσο πολύ σημαντικές πληροφορίες για ένα από τα βασικότερα μόρια που γνωρίζουμε, τις πρωτεΐνες. Η δομή των πρωτεϊνών έχει βασικό ρόλο στην κατανόηση της λειτουργίας τους και κατ' επέκταση στην χρήση τους σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας, όπως στα φάρμακα, στην διατροφή ακόμα και στην γεωργία. Για να γίνουν κατανοητές αυτές οι πρωτεϊνικές δομές χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, μεταξύ άλλων ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X (X-ray crystallography) και η κρυοηλεκτρονική μικροσκοπία (cryo-EM) [1][2]. Αρκετές φορές σε συνδυασμό με τις παραπάνω τεχνικές χρησιμοποιούνται και διάφορες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Αυτές οι προσομοιώσεις δίνουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την δυναμική και τις αλλαγές στην διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης κατά την διάρκεια ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος. Έτσι αν και οι πειραματικές τεχνικές προσφέρουν δεδομένα σχετικά με την μορφή της πρωτεΐνης σε ένα μικρό σχετικά χρονικό διάστημα, οι προσομοιώσεις δίνουν πληροφορίες σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σχετικά με τις αλλαγές στην διαμόρφωση της και την ικανότητα της να αλληλεπιδρά με άλλα μόρια. Ο συνδυασμός των δύο αυτών τεχνικών μας προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την λειτουργία μιας πρωτεΐνης.

Αν και η χρησιμότητα των μοριακών προσομοιώσεων δεν αμφισβητείται από κανέναν, τα δεδομένα που δίνουν πολλές φορές δεν είναι ακριβή και δεν συμφωνούν καθόλου με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα. Οι δυσκολίες στην χρήση των μοριακών προσομοιώσεων βρίσκονται στην επιλογή των δυναμικών πεδίων, τα οποία θα πρέπει να είναι σε θέση να αναπαράγουν με ακρίβεια τα πειραματικά δεδομένα. Τα δυναμικά πεδία είναι εμπειρικά υπολογιστικά μοντέλα, τα οποία χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν ενδομοριακές και διαμοριακές δυνάμεις. Ανάλογα με το σκοπό του κάθε πειράματος πρέπει να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικά δυναμικά πεδία τα οποία περιγράφουν καλύτερα την εκάστοτε παράμετρο που ενδιαφέρει τον ερευνητή. Καθώς η επιλογή πεδίου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και η ακρίβεια του δεν είναι πάντα δεδομένη, χρειάζεται να υπάρχει σύγκριση των δεδομένων από το πεδίο με δεδομένα από πειράματα, όπως το NMR [1][3][19].

Όσο περνάει ο καιρός, οι δυνατότητες των υπολογιστικών συστημάτων και τα ίδια τα προγράμματα των προσομοιώσεων γίνονται συνεχώς καλύτερα και πιο ακριβή στους υπολογισμούς τους. Ευελπιστούμε στο μέλλον η ακρίβεια τέτοιων προγραμμάτων να

είναι αρκετά υψηλή, ώστε κάποιος ερευνητής να μπορεί να βγάλει συμπεράσματα για την δομή μιας πρωτεΐνης, χωρίς την ανάγκη να κάνει πειράματα, τα οποία πολλές φορές είναι ακριβά, χρονοβόρα και επιρρεπή σε ανθρώπινα λάθη.

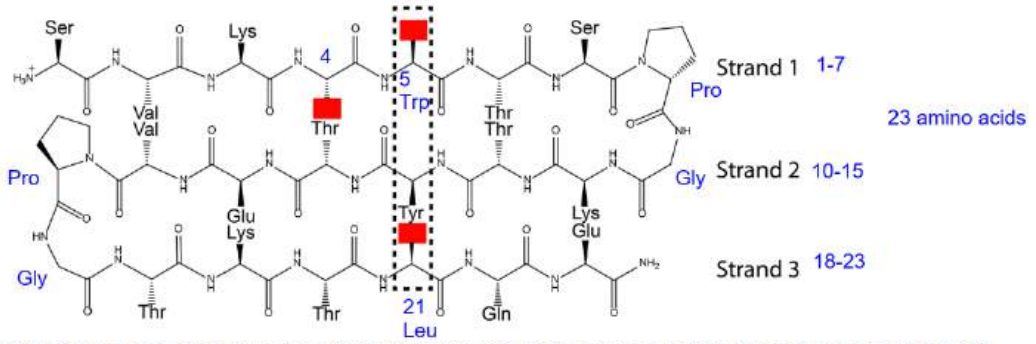
1.2 Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας

Στόχος αυτής της πτυχιακής είναι να συγκρίνουμε πειραματικά δεδομένα της δομής μιας πρωτεΐνης, με δεδομένα μοριακών προσομοιώσεων και να προσπαθήσουμε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα σχετικά με το αν οι υπολογιστές είναι σε θέση να αντικαταστήσουν, έστω και εν μέρη, το πείραμα. Φυσικά και κάτι τέτοιο δεν είναι πολύ πιθανό, καθώς οι μοριακές προσομοιώσεις έχουν ακόμα περιορισμούς σε κομμάτια όπως αφορά την δειγματοληψία και την ακρίβεια ακόμα και για το ίδιο δυναμικό πεδίο [1][3][19]. Αλλά τουλάχιστον αυτή η έρευνα θα παραμείνει στο αρχείο και θα παρουσιάζει την προσπάθεια ενός ακόμα προπτυχιακού φοιτητή να κατανοήσει τον σύνθετο κόσμο των μοριακών προσομοιώσεων και παράλληλα να συνεχίζει να αποφεύγει το wet lab.

1.3 Η πρώτη επαφή με τα πεπτίδια

Ήρθε η ώρα λοιπόν να κάνουμε τις συστάσεις. Τα πεπτίδια που θα χρησιμοποιήσουμε συντέθηκαν με σκοπό να μελετηθούν οι επιπτώσεις της αλληλεπίδρασης αρωματικών δακτυλίων στις ιδιότητες των πεπτιδίων. Η ομάδα του D. Scheerer κατασκεύασε τρία τρίκλωνα αντιπαράλληλα β-φύλλα με δύο στροφές $_{D}$Pro-Gly [4]. Οι διαφορές των τριών πεπτιδίων εντοπίζονται στο κομμάτι των αρωματικών αλληλεπιδράσεων. Το πεπτίδιο 1W-2Y-3L παρουσιάζει αρωματική αλληλεπίδραση μεταξύ πρώτου και δεύτερου κλώνου, το πεπτίδιο 1L-2Y-3W παρουσιάζει αρωματική αλληλεπίδραση μεταξύ του δεύτερου και τρίτου κλώνου και τέλος, το πεπτίδιο 1I-2Y-3L δεν παρουσιάζει καμία αρωματική αλληλεπίδραση (λειτουργεί ως control). Οι εικόνες παρακάτω (Εικόνα 1.1 και 1.2) πάρθηκαν από την έρευνα του D. Scheerer και της ομάδας του.

Scheme 1. Generic Layout of the Three-Stranded Sheet Model[a]



[a]Red boxes indicate residues interchanged, dashed black frame shows the location of possible aromatic crosslinks. Positions 5 and 21 are Trp and Leu for **1W-2Y-3L** and vice versa for **1L-2Y-3W**. To place the aromatics on opposite sides, so there can be no interaction, three changes are needed, where positions 4, 5, and 21 are Phe, Ile, and Leu, respectively, for **1I-2Y-3L**. The component hairpins make up either the N-terminal strands 1 and 2 or the C-terminal strands 2 and 3 of the corresponding three-stranded β-sheet.

Εικόνα 1.1: Χρησιμοποιήθηκε χωρίς άδεια από David Scheerer, Heng Chi, Dan McElheny, Ayesha Samer, Timothy A. Keiderling, Karin Hauser; Role of Aromatic Cross-Links in Structure and Dynamics of Model Three-Stranded β-Sheet Peptides.

Η πρώτη αυτή εικόνα (Εικόνα 1.1) δείχνει την θεωρητική δομή του πεπτιδίου που έχουν φτιάξει. Τα κόκκινα τετραγωνάκια δείχνουν τις θέσεις όπου τα αμινοξέα διαφέρουν μεταξύ των παραλλαγών του πεπτιδίου, αλλά αυτό θα το αναλύσουμε καλύτερα στο κομμάτι των μεθόδων. Όπως γράφει και η περιγραφή της Εικόνας 1.1 από την έρευνα του D. Scheerer: «Στις θέσεις 5 και 21 βρίσκονται αμινοξέα τρυπτοφάνης και λευκίνης αντίστοιχα για τον πεπτίδιο 1W-2Y-3L και αντιστρόφως για το πεπτίδιο 1L-2Y-3W. Για να δημιουργηθεί το πεπτίδιο 1I-2Y-3L, όπου δεν υπάρχει αρωματική αλληλεπίδραση, χρειάστηκε οι αρωματικοί δακτύλιοι να βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του πεπτιδίου. Αυτό έγινε τοποθετώντας στις θέσεις 4, 5 και 21 τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, ισολευκίνη και λευκίνη αντίστοιχα». Τα μπλε γράμματα στην παραπάνω εικόνα είναι δικές μου προσθέσεις, όπου φαίνονται ο αριθμός των αμινοξέων που αποτελούν κάθε κλώνο καθώς και τα τέσσερα αμινοξέα που δημιουργούν τις δύο ᴅPro-Gly στροφές.

Η Εικόνα 1.2 δείχνει τα αποτελέσματα από ανάλυση NMR (αριστερά βρίσκονται τα 10 καλύτερα αποτελέσματα από κάθε παραλλαγή και δεξιά η «καλύτερη» διαμόρφωση με βάση τις παραμέτρους της ανάλυσης). Από αυτές τις δύο εικόνες η μόνη πληροφορία που θέλω να κρατήσετε είναι η μορφή των πεπτιδίων αυτών, όλα τα υπόλοιπα θα τα αναλύσουμε στην συνέχεια. Και σε αυτήν την περίπτωση τα μπλε γράμματα είναι δική μου προσθήκη για να υπάρχει πιο ξεκάθαρη εικόνα ως το ποιά εικόνα είναι ποιό πεπτίδιο.

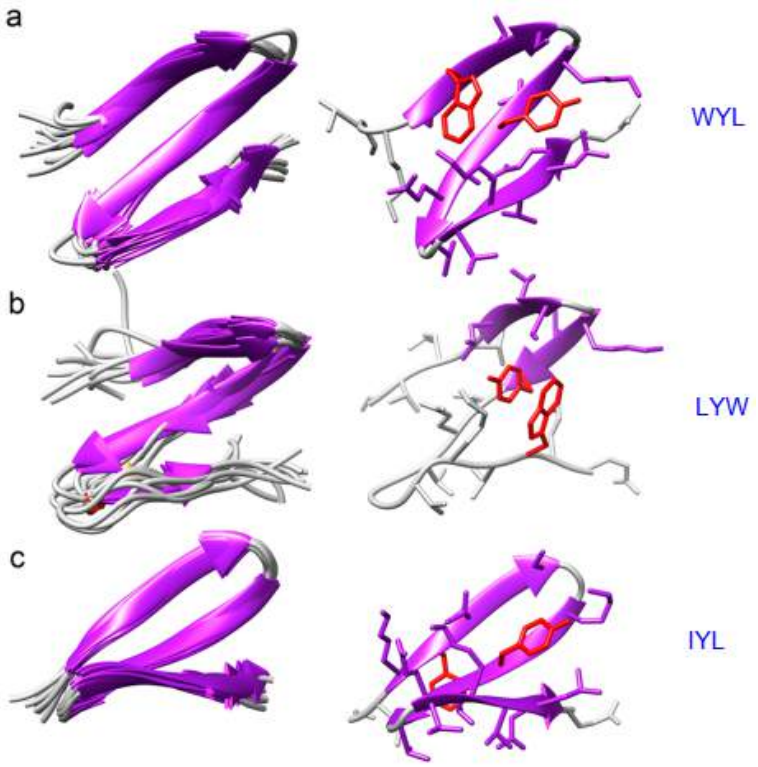


Figure 1. NMR structures of the three-stranded β-sheet peptides. (a) **1W-2Y-3L** (aromatic contact strand 1−2); (b) **1L-2Y-3W** (aromatic contact strand 2−3); (c) **1I-2Y-3L** (no aromatic contact). Ten solution structures are overlaid in the left column, and the best-fit representative structure is shown in the right column, together with the aromatic side chains highlighted in red.

Εικόνα 1.2: Χρησιμοποιήθηκε χωρίς άδεια από David Scheerer, Heng Chi, Dan McElheny, Ayesha Samer, Timothy A. Keiderling, Karin Hauser; Role of Aromatic Cross-Links in Structure and Dynamics of Model Three-Stranded β-Sheet Peptides.

1.4 Η επιλογή των πεπτιδίων και των δυναμικών πεδίων

Για την συγκεκριμένη εργασία επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε τα πεπτίδια 1I-2Y-3L και 1L-2Y-3W στα δυναμικά πεδία 99SB-ILDN-P στους 360K και 99SB-STAR-ILDN στους 340K. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε συνολικά τέσσερις ομάδες δεδομένων:

- IYL_99SB-ILDN-P_360K
- IYL_99SB-STAR-ILDN_340K
- LYW_99SB-ILDN-P_360K
- LYW_99SB-STAR-ILDN_340K

Σε αυτές τις τέσσερις ομάδες δεδομένων τρέξαμε RMSD matrix, χαρακτηρισμό δευτεροταγούς δομής μέσω του STRIDE [12], principal component analysis (Cartesian και Dihedral, cPCA και dPCA) και τέλος εφαρμόσαμε και τεχνικές υπέρθεσης των πειραματικών δομών και αυτών των προσομοιώσεων. Αυτές οι αναλύσεις περιμένουμε

να μας δώσουν μια γενική εικόνα της δομής και της δυναμικής των πεπτιδίων κάτω από τα συγκεκριμένα δυναμικά πεδία.

2. Μέθοδοι

2.1 Οι διαφορές μεταξύ των τριών πεπτιδίων που δημιουργήθηκαν

Ας πιάσουμε λοιπόν το θέμα από την αρχή. Το βασικό στοιχείο αυτής της πτυχιακής είναι τα πεπτίδια και τα δυναμικά πεδία στα οποία τα μελετάμε, οπότε οφείλω να αφιερώσω λίγες γραμμές για να αναφερθώ σε αυτά.

Όπως αναφέρθηκε, η ομάδα του D. Scheerer κατασκεύασε τρία πεπτίδια που έφεραν αμινοξέα με αρωματικούς δακτύλιους, με σκοπό να μελετήσει τις αλλαγές που προκαλούν οι αρωματικές αλληλεπιδράσεις στις ιδιότητες των πεπτιδίων, όπως την δυναμική των πεπτιδίων, την σταθερότητα, την ικανότητα τους να αναδιπλωθούν και την δευτεροταγή τους δομή [4]. Και τα τρία πεπτίδια που δημιουργήθηκαν αποτελούνται από 23 αμινοξέα τα οποία δημιουργούν ένα τρίκλωνο αντιπαράλληλο β-φύλλο με δύο στροφές DPro-Gly. Οι διαφορές μεταξύ των τριών πεπτιδίων παρατηρούνται στην παρουσία αρωματικών αλληλεπιδράσεων. Το πρώτο πεπτίδιο (WYL) παρουσιάζει αρωματική αλληλεπίδραση μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου κλώνου, το δεύτερο πεπτίδιο (LYW) παρουσιάζει αρωματική αλληλεπίδραση μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου κλώνου και τέλος, το τρίτο πεπτίδιο (IYL) δεν παρουσιάζει καμία αρωματική αλληλεπίδραση, καθώς οι αρωματικοί δακτύλιοι προεκτείνονται εξωτερικά του μορίου και λειτουργεί ως control. Αν και τα πεπτίδια έχουν την ίδια βασική αλληλουχία αμινοξέων, παρουσιάζουν διαφορές στις θέσεις 4, 5 και 21.

Πιο συγκεκριμένα:

- στο πεπτίδιο WYL έχουμε Ile(I) στη θέση 4, Trp(W) στη θέση 5 και Leu(L) στη θέση 21,
- στο πεπτίδιο LYW έχουμε Ile(I) στη θέση 4, Leu(L) στη θέση 5 και Trp(W) στη θέση 21 και
- στο πεπτίδιο IYL έχουμε Phe(F) στη θέση 4, Ile(I) στη θέση 5 και Leu(L) στη θέση 21

Οι διαφορές αυτές παρουσιάζονται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2.1) από την έρευνα του D. Scheerer και της ομάδας του.

Table 1. Sequences of the Studied Three-Stranded and Two-Stranded Peptides

type	peptide[b]	sequence[a] strand 1 - turn 1	strand 2	turn 2 - strand 3	side-chain variation
three-stranded	**1W-2Y-3L**	SVK**I**W**T**S-pG	KTYTEV	pG-TKT**L**Q**E**-NH_2	aromatic contact strand 1−2
	1L-2Y-3W	SVK**I**L**T**S-pG	KTYTEV	pG-TKT**W**Q**E**-NH_2	aromatic contact strand 2−3
	1I-2Y-3L	SVK**F**I**T**S-pG	KTYTEV	pG-TKT**L**Q**E**-NH_2	no aromatic contact
two-stranded[c]	**1W-2Y**	SVK**I**W**T**S-pG	KTYTEV-NH_2		strand 1−2 of 1W-2Y-3L
	2Y-3L		KTYTEV	pG-TKT**L**Q**E**-NH_2	strand 2−3 of 1W-2Y-3L/1I-2Y-3L
	1L-2Y	SVK**I**L**T**S-pG	KTYTEV-NH_2		strand 1−2 of 1L-2Y-3W
	2Y-3W		KTYTEV	pG-TKT**W**Q**E**-NH_2	strand 2−3 of 1L-2Y-3W
	1I-2Y	SVK**F**I**T**S-pG	KTYTEV-NH_2		strand 1−2 of 1I-2Y-3L

[a]Strand 2 is the same for all variants, the amino acids interchanged in the strands 1 and 3 are underlined, and residues responsible for the nomenclature are marked in bold font. [b]Nomenclature used emphasizes the strand on which the interacting/exchanged hydrophobic group is located. [c]The 2-stranded peptides are the constituent hairpins of the three-stranded ones.

Εικόνα 2.1: Χρησιμοποιήθηκε χωρίς άδεια από David Scheerer, Heng Chi, Dan McElheny, Ayesha Samer, Timothy A. Keiderling, Karin Hauser; Role of Aromatic Cross-Links in Structure and Dynamics of Model Three-Stranded β-Sheet Peptides.

2.2 Η δημιουργία των πρωταγωνιστών (των πεπτιδίων)

Για να είμαστε τυπικοί, οφείλω να αναφέρω και τον τρόπο δημιουργίας αυτών των πεπτιδίων. Σύμφωνα λοιπόν με τον D. Scheerer και την ομάδα του τα πεπτίδια αυτά κατασκευάστηκαν με βάση τις αρχές σχεδιασμού αλληλουχιών του Gellman και της ομάδας του. Έτσι περιείχαν σταθεροποιημένες φουρκέτες DPro-Gly με επιπρόσθετη σταθεροποίηση από διακλωνικές αλληλεπιδράσεις Trp-Tyr, σύμφωνα με τα σχέδια των Cochran και Waters. Όπως αναφέρει στο paper του ο D.Scheerer και η ομάδα του, τα πεπτίδια συντέθηκαν χρησιμοποιώντας τυπικές fluorenyl-methyloxy-carbonyl (FMOC) μεθόδους, διαχωρίστηκαν και καθαρίστηκαν με HPLC (95-99%) και χαρακτηρίστηκαν με matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy (MALDI-MS). Για τις μελέτες υπερύθρων, για να εξαλειφθούν τα TFA counterions, τα πεπτίδια διαλύθηκαν σε 0.1 M DCl και λυοφιλοποιήθηκαν (lyophilized) τρεις φορές. Έπειτα επαναδιαλύθηκαν σε D_2O σε συγκέντρωση ~10 mg/mL [4].

2.3 Η δημιουργία των δομών NMR των πεπτιδίων

Καθώς στο paper αυτό θα αναφερθώ στην δομή NMR των πεπτιδίων, είναι σημαντικό να αναφέρω επιγραμματικά πως προέκυψαν αυτές οι δομές, σύμφωνα με τις σημειώσεις του D. Scheerer και της ομάδας του. Τα πεπτίδια διαλύθηκαν σε 90:10 H_2O/D_2O σε 6 mg/mL στους 360K για NMR, προέκυψαν 1D και 2D φάσματα (COSY, TOCSY, NOESY) και τέλος τα φάσματα αναλύθηκαν μέσω του NMRPipe και προβλήθηκαν/ανατέθηκαν στο NMRView. Οι δομές των πεπτιδίων υπολογίστηκαν με τον CYANA 2.0 χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία του AMBER8 με το δυναμικό πεδίο ff99sb [4].

2.4 Οι συμπρωταγωνιστές (τα δυναμικά πεδία)

Τέλος το μόνο κομμάτι που δεν καλύψαμε είναι αυτό των δυναμικών πεδίων. Τα δυναμικά πεδία χρησιμοποιούνται στις μοριακές προσομοιώσεις για να μπορέσουν να γίνουν με μεγαλύτερη ακρίβεια οι υπολογισμοί που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων και μορίων. Μέσω αυτών των υπολογισμών είμαστε έπειτα σε θέση να προσομοιώσουμε και να εκτιμήσουμε διάφορες παραμέτρους ενός πεπτιδίου, όπως την δομή του, την σταθερότητά του και την ελεύθερη του ενέργεια. Στην συγκεκριμένη εργασία αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε τα δυναμικά πεδία ff99SB-ILDN-P (99SB-ILDN-P) στους 360K και ff99SB-ILDN* (99SB-STAR-ILDN) στους 340K [5][6]. Ο λόγος που στα δυναμικά πεδία θα χρησιμοποιηθούν τέτοιες υψηλές θερμοκρασίες είναι γιατί οι μοριακές προσομοιώσεις που θα λάβουν μέρος στην εργασία αυτή είναι προσομοιώσεις αναδίπλωσης. Αυτού του είδους οι προσομοιώσεις απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες έτσι ώστε το πεπτίδιο να αναδιπλώνεται και να αποδιατάσσεται συνέχεια, οδηγώντας έτσι να υιοθετεί περισσότερες διαμορφώσεις σε λιγότερο χρόνο. Το σημαντικό λοιπόν είναι ότι στις αναλύσεις που θα ακολουθήσουν θα δούμε την συμπεριφορά των πεπτιδίων όσο αυτά αποδιατάσσονται και αναδιπλώνονται ξανά και ξανά.

2.5 Λίγα χαρακτηριστικά των δυναμικών πεδίων

Τα δύο αυτά πεδία βασίζονται στις παραμέτρους AMBER ff99SB [7] για υπολογισμούς στην κύρια αλυσίδα τους και παράλληλα έχουν διορθώσεις για τα κατάλοιπα Ισολευκίνης (Ile), Λευκίνης(Leu), Ασπαρτικού οξέος (Asp) και Ασπαραγίνης (Asn), οι οποίες διορθώσεις τα κάνουν και πιο ακριβή [5][6]. Πιο συγκεκριμένα το δυναμικό πεδίο ff99SB-ILDN-P έχει επικαιροποιημένες παραμέτρους προλίνης και υδροξυπρολίνης, με αποτέλεσμα να αναπαράγει με μεγαλύτερη ακρίβεια την αλληλομετατροπή του δακτυλίου της προλίνης.

Το δυναμικό πεδίο ff99SB-ILDN* (που θα το αναφέρουμε ως 99SB-STAR-ILDN) αποτελεί μια βελτίωση του βασικού πεδίου ff99SB-ILDN. Πέρα από τις τροποποιήσεις του βασικού δυναμικού πεδίου, περιέχει επιπλέον τροποποιήσεις στις παραμέτρους στροφής της κύριας αλυσίδας (στις παραμέτρους των φ/ψ γωνιών), γεγονός που του επιτρέπει να προσδώσει καλύτερη ισορροπία μεταξύ α-έλικας και σπειράματος [8]. Ένα μειονέκτημα του βασικού πεδίου ff99SB-ILDN που εμφανίστηκε σε ορισμένα πειράματα ήταν η υποσταθεροποιήση των α-ελίκων, με αποτέλεσμα τα πεπτίδια να εμφανίζεται να έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε έλικες απ’ότι στην πραγματικότητα [9]. Οι τροποποιήσεις του 99SB-STAR-ILDN λύνουν έως ένα βαθμό αυτό το πρόβλημα,

καθώς όπως είπαμε το συγκεκριμένο πεδίο υπολογίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τις γωνίες στροφής φ/ψ. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι το 99SB-STAR-ILDN είναι το καλύτερο πεδίο και δίνει τα πιο ακριβή αποτελέσματα για όλα τα συστήματα και πειραματικά δεδομένα [5][6]. Μέσω αυτής της εργασίας λοιπόν θα μπορέσουμε να δούμε και πως συμπεριφέρονται αυτά τα δύο πεδία στα δικά μας συστήματα και πειραματικά δεδομένα, χωρίς να ξεφύγουμε βέβαια από τον σκοπό της πτυχιακής.

Πριν προχωρήσουμε πρέπει να αναφέρουμε ότι πέρα από τα διαφορετικά πεδία, οι προσομοιώσεις έγιναν και σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (360K και 340K αντίστοιχα για το κάθε πεδίο) και για διαφορετικό χρονικό διάστημα (10μs και 8μs αντίστοιχα για το κάθε πεδίο). Η θερμοκρασία και η χρονική διάρκεια της προσομοίωσης λοιπόν αποτελούν άλλες δύο παραμέτρους που θα πρέπει να λάβουμε υπόψη κατά την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Περαιτέρω μελέτες των πεπτιδιων στα ίδια δυναμικά πεδία, στις ίδιες θερμοκρασίες και για το ίδιο χρονικό διάστημα, θα έδιναν μια καλύτερη και πιο ακριβή εικόνα για την επιρροή των δυναμικών πεδίων στα πεπτίδια αυτά.

2.6 Τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν

Οι αναλύσεις των τροχιακών έγιναν με χρήση του λογισμικού Grcarma [10], το οποίο βασίζεται στο λογισμικό carma [11][17], αλλά με την προσθήκη γραφικών. Τα δύο αυτά λογισμικά που ήταν πολύ βασικά για αυτήν την πτυχιακή δημιουργήθηκαν από τον Koukos, P.I. και τον Glykos, N.M. αντίστοιχα. Το grcarma παίρνει ως δεδομένα αρχεία PSF, DCD και PDB, αρχεία τα οποία παράγονται ως αποτέλεσμα των μοριακών προσομοιώσεων. Τέτοια αρχεία παράγουν μηχανές προσομοιώσεων όπως η NAMD και CHARMM. Το grcarma δεν δημιουργεί από μόνο του προσομοιώσεις, είναι ένα λογισμικό ανάλυσης τροχιακών που προκύπτουν μετά από αυτές τις προσομοιώσεις. Για την ανάλυση δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STRIDE [12][17].

2.7 Οι αναλύσεις που τρέξαμε

Και τώρα ήρθε η ώρα να ξεκινήσουμε να μπαίνουμε σιγά σιγά στο ενδιαφέρον κομμάτι της εργασίας. Για να καταφέρουμε λοιπόν να βγάλουμε συμπεράσματα για τα πεπτίδια μας τρέξαμε, μέσω του Grcarma [10], ορισμένες αναλύσεις: RMSD matrix για να μπορέσουμε να δούμε την σταθερότητα του πεπτιδίου, δευτεροταγής δομή μέσω του STRIDE [12][17] που σε συνδυασμό με το RMSD [17] θα μας βοηθήσει να έχουμε μια καλύτερη εικόνα σχετικά με τις βασικές δευτεροταγείς δομές που υιοθετεί το πεπτίδιο

μας κατά την διάρκεια της προσομοίωσης. Η επόμενη ανάλυση που αποφασίσαμε να κάνουμε είναι PCA, μέσω της οποίας μπορούμε να παρατηρήσουμε την δυναμική του πεπτιδίου μας, κατά πόσο το πεπτίδιο υιοθετεί σταθερές διαμορφώσεις και κατά πόσο είναι σε θέση να μεταβεί από την μια διαμόρφωση στην άλλη. Τέλος αποφασίσαμε να κάνουμε και υπέρθεση του πεπτιδίου που «δημιούργησαν» οι μοριακές προσομοιώσεις με την πειραματική δομή που προέκυψε από NMR, για να δούμε κατά πόσο μπόρεσαν τελικά οι προσομοιώσεις να έρθουν κοντά στην πραγματικότητα.

3. Αποτελέσματα

3.1 Η ανάλυση δευτεροταγούς δομής και το RMSD matrix

Οι πρώτες αναλύσεις που επιλέξαμε να κάνουμε ήταν το RMSD (Root-Mean-Square Deviation) matrix [16] και η ανάλυση δευτεροταγούς δομής. Αυτές οι αναλύσεις θα παρουσιαστούν μαζί, καθώς η μια συμπληρώνει την άλλη και έτσι μπορούμε να βγάλουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τα πεπτίδια μας στα εκάστοτε δυναμικά πεδία. Με λίγα λόγια το RMSD matrix μας δείχνει πόσο διαφορετικές ή όμοιες είναι οι διαμορφώσεις μεταξύ τους κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, άρα και κατ'επέκταση δείχνει την επιμονή του πεπτιδίου να υιοθετεί αυτές τις παρόμοιες διαμορφώσεις. Η ανάλυση δευτεροταγούς δομής μας δείχνει πολύ απλά τοπικά τι μοτίβα δευτεροταγούς δομής υιοθετούνται και ποιά κατάλοιπα συμμετέχουν σε αυτά. Αξίζει σε αυτό το σημείο να κάνουμε μια μικρή παρένθεση και να εξηγήσουμε σε γενικές γραμμές τι μας εξηγούν οι εικόνες που θα δούμε.

Στο RMSD matrix τα δύο τρίγωνα που σχηματίζονται είναι πανομοιότυπα και οι άξονες αφορούν μόνο τον χρόνο της προσομοίωσης. Οι μπλε και σκούρες μπλε περιοχές υποδηλώνουν ότι το πεπτίδιο σε εκείνη την χρονική περίοδο έχει υιοθετήσει διαμορφώσεις που έχουν μικρές μορφολογικές αποκλίσεις μεταξύ τους. Το αντίθετο συμβαίνει με τα κίτρινα σημεία, όπου το πεπτίδιο υιοθετεί διαδοχικές διαμορφώσεις με μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους. Ουσιαστικά το RMSD matrix μας δείχνει κατά πόσο το πεπτίδιο υιοθετεί γεωμετρικά παρόμοιες περιοχές κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, χωρίς αυτό να είναι ένδειξη χαμηλής ενέργειας και θερμοδυναμικής σταθερότητας. Οι χαμηλές ενέργειες είναι χαρακτηριστικά των πεπτιδίων που υιοθετούν σταθερές διαμορφώσεις, αλλά τέτοιο συμπέρασμα δεν μπορούμε να εξάγουμε από το RMSD matrix.

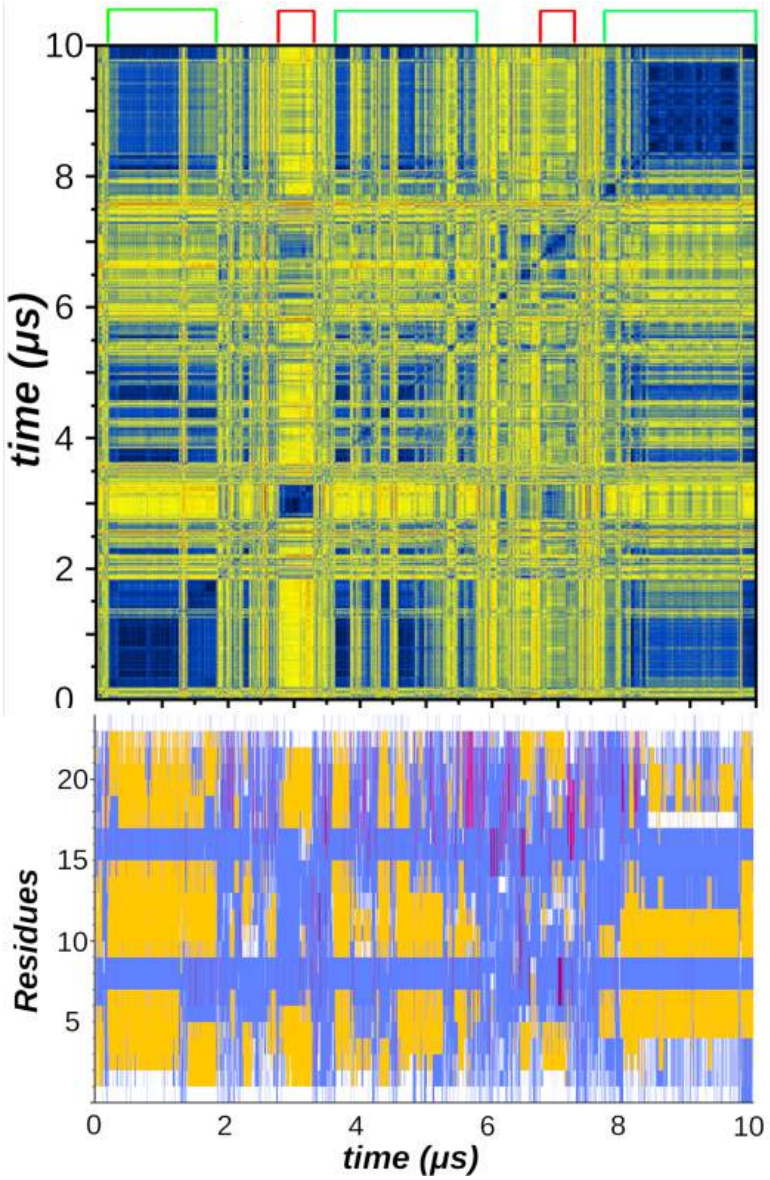
Στην εικόνα δευτεροταγούς δομής ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τον χρόνο της προσομοίωσης και ο κατακόρυφος τον αριθμό του καταλοίπου στην αλληλουχία.

Μέσω του προγράμματος grcarma [10] παίρνουμε και τις πληροφορίες σχετικά με το τι σημαίνει κάθε χρώμα που βλέπουμε στην εικόνα. Τα χρώματα που μας ενδιαφέρουν στην περίπτωση μας είναι:

- Κίτρινο → β-φύλλο
- Μπλε → β/γ στροφή
- Ροζ → α-έλικα
- Σκούρο ροζ → 3_{10}-έλικα
- Μωβ → π-έλικα
- Λευκό → σπείραμα/μη διαθέσιμο (coil/unassigned)

3.2 Αποτελέσματα της ανάλυσης δευτεροταγούς δομής και RMSD matrix

Ας ξεκινήσουμε από το πεπτίδιο **IYL** στο πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K**.

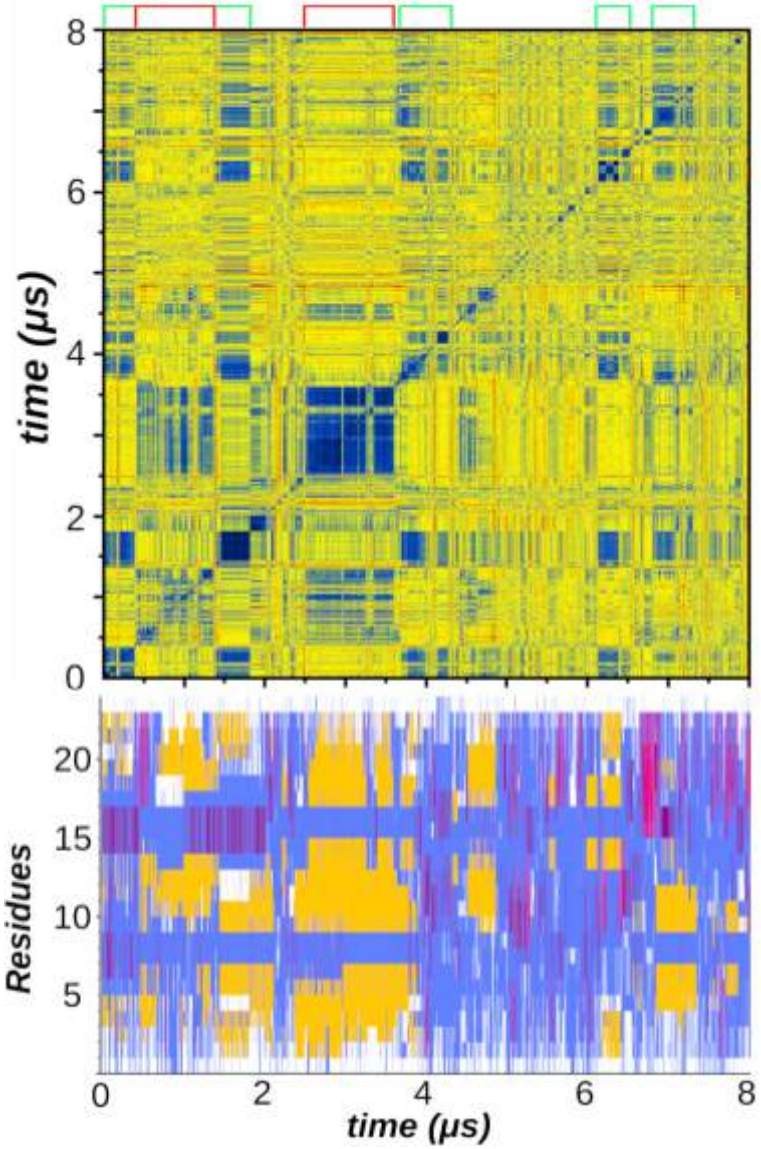


Εικόνα 3.1: (α) RMSD matrix και (β) ανάλυση δευτεροταγούς δομής, οι εικόνες πάρθηκαν από το Grcarma και STRIDE αντίστοιχα.

Στο πεπτίδιο αυτό, μέσω του δεύτερου διαγράμματος (Εικόνα 3.1(β)), παρατηρούμε ότι οι 3 «πράσινες» περιοχές αποτελούνται από διαμορφώσεις που εμφανίζουν τρεις β-δομές (κατάλοιπα 1~6, 9~15 και 17~23 για κάθε κλώνο αντίστοιχα). Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια της προσομοίωσης ο τρίτος κλώνος φαίνεται να γίνεται όλο και πιο ασταθής και να χάνει έως ένα βαθμό τα χαρακτηριστικά β-φύλλου. Σε μικρότερο βαθμό φαίνεται να αλλάζει και ο δεύτερος κλώνος, καθώς στην τρίτη «πράσινη» περιοχή μόνο τα μισά του κατάλοιπα φαίνεται να εμφανίζουν χαρακτηριστικά β-φύλλου.

Όσον αφορά τις «κόκκινες» περιοχές παρατηρούμε ότι από αυτές απουσιάζει ο δεύτερος β-κλώνος, καθώς τα κατάλοιπα 9~15 υιοθετούν μια δομή σαν στροφή και έλικα. Άρα οι «κόκκινες» περιοχές περιέχουν διαμορφώσεις, οι οποίες αποτελούνται από μόνο δύο β-κλώνους.

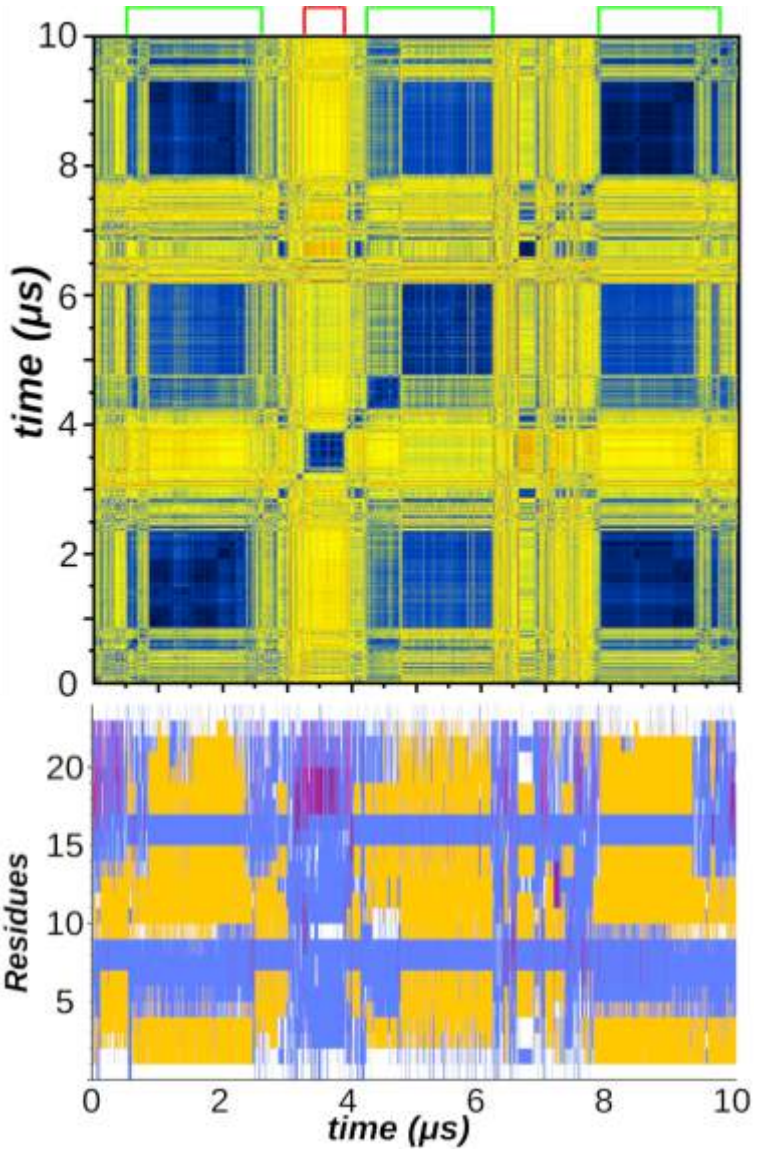
Για το ίδιο πεπτίδιο, αλλά αυτή τη φορά στο δυναμικό πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K**, παρατηρούμε ότι το πεπτίδιο δεν είναι σε θέση να υιοθετήσει μια τόσο σταθερή διαμόρφωση όπως προηγουμένως (από άποψη ομοιότητας των διαφορετικών διαμορφώσεων).



Εικόνα 3.2: (α) RMSD matrix και (β) ανάλυση δευτεροταγούς δομής, οι εικόνες πάρθηκαν από το Grcarma και STRIDE αντίστοιχα.

Εδώ μόνο στην δεύτερη «πράσινη» και στην δεύτερη «κόκκινη» περιοχή εμφανίζονται διαμορφώσεις που αποτελούνται από τρεις β-κλώνους. Στην πρώτη «κόκκινη» περιοχή οι κλώνοι είναι αρκετά παραμορφωμένοι, ενώ απουσιάζει ολόκληρος ο πρώτος κλώνος. Οι υπόλοιπες «πράσινες» περιοχές αποτελούνται κυρίως από μικρότερες β-δομές, στροφές και έλικες.

Ήρθε λοιπόν η στιγμή να περάσουμε στο πεπτίδιο **LYW**, που και αυτό με την σειρά του θα το μελετήσουμε αρχικά στο δυναμικό πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K**.

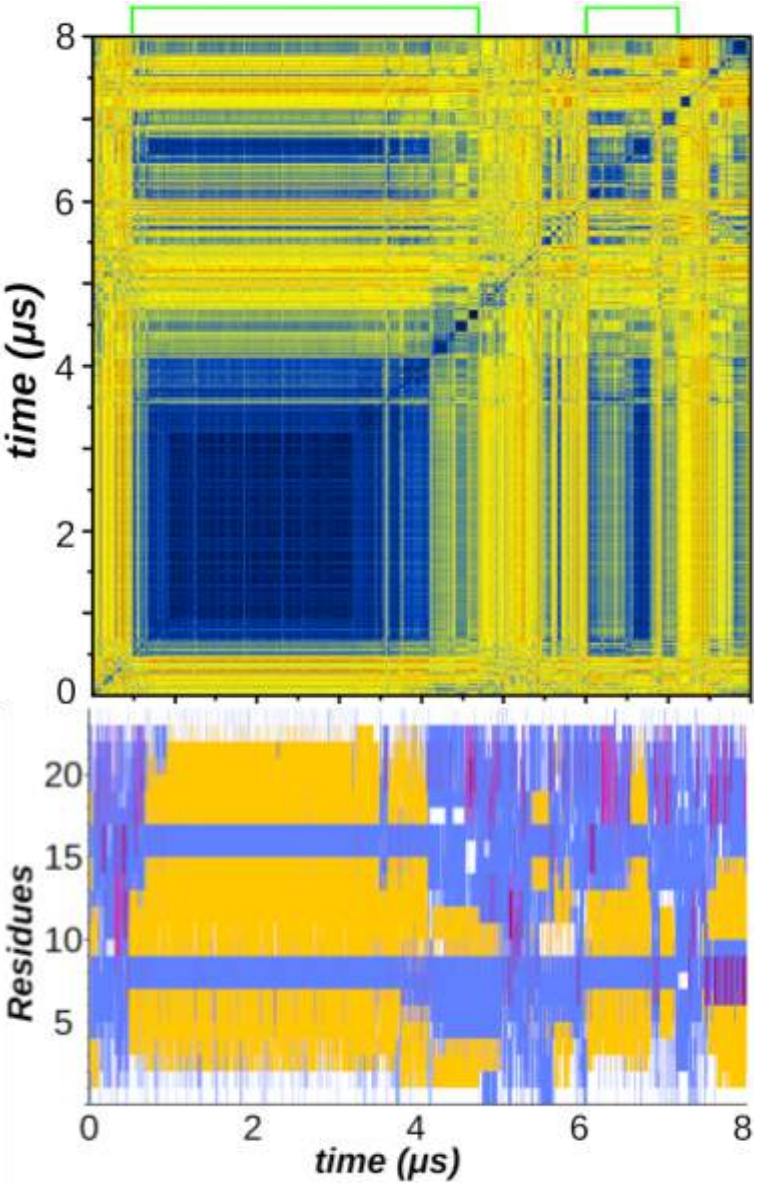


Εικόνα 3.3: (α) RMSD matrix και (β) ανάλυση δευτεροταγούς δομής, οι εικόνες πάρθηκαν από το Grcarma και STRIDE αντίστοιχα.

Από τις παραπάνω εικόνες (Εικόνα 3.3(α) και (β)) συμπεραίνουμε ότι στην μεγαλύτερη διάρκεια της προσομοίωσης, το πεπτίδιο υιοθετεί διαμορφώσεις β-φύλλου με τρεις κλώνους. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι και στις τρεις «πράσινες» περιοχές εμφανίζονται διαμορφώσεις που αποτελούνται από τρεις β-κλώνους, αν και ίσως κάποιοι αποτελούνται από λιγότερα κατάλοιπα. Όσον αφορά την «κόκκινη» περιοχή, αυτή αποτελείται από διαμορφώσεις που εμφανίζουν εξ'ολοκλήρου στροφές και έλικες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι μόνο στα τελευταία κυρίως κατάλοιπα (16~21, τα κατάλοιπα που αντιστοιχούν στον 3ο β-κλώνο) εμφανίζονται α και 3_{10} έλικες (cluster_04). Γενικά το πεπτίδιο εδώ παρουσιάζει σταθερές δομές που αποτελούνται από 3 β-κλώνους.

Το ίδιο πεπτίδιο στο δυναμικό πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K**, εμφανίζει αυτή την παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 3.4: (α) RMSD matrix και (β) ανάλυση δευτεροταγούς δομής, οι εικόνες πάρθηκαν από το Grcarma και STRIDE αντίστοιχα.

Το τροχιακό λοιπόν σε διαφορετικό δυναμικό πεδίο υιοθετεί και εδώ διαμορφώσεις που εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους και μάλιστα για την μισή χρονική διάρκεια της προσομοίωσης, (~4μs). Αυτές οι διαμορφώσεις αποτελούνται από τρεις β-κλώνους, ενώ σε επόμενες διαμορφώσεις ο τρίτος β-κλώνος αποδιοργανώνεται.

Η δεύτερη«πράσινη» περιοχή αποτελείται μόνο από διαμορφώσεις που εμφανίζουν τους δύο πρώτους β-κλώνους, καθώς στην θέση του τρίτου (κατάλοιπα 17~23) εμφανίζονται στροφές και έλικες.

Γενικά φαίνεται ότι οι πρώτοι δύο κλώνοι προσπαθούν να υιοθετήσουν μια σταθερή διαμόρφωση β-φύλου κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, ενώ ο τρίτος το καταφέρνει αυτό μόνο για την μισή προσομοίωση.

3.3 Λίγα λόγια για την ανάλυση PCA (cPCA, dPCA)

Η επόμενη ανάλυση που πραγματοποιήσαμε είναι το Principal Component Analysis ή PCA όπως είναι και πιο γνωστή [13]. Με λίγα λόγια το PCA χρησιμοποιείται για να μειώσουμε το μέγεθος των δεδομένων κατά έναν βαθμό έτσι ώστε να είναι ευκολότερο να τα μελετήσουμε και να βγάλουμε συμπεράσματα. Επιπλέον μας βοηθάει να παρατηρήσουμε κινήσεις μορίων και μεγάλες αλλαγές στην διαμόρφωση των πεπτιδίων, οι οποίες μπορεί να μην είναι ξεκάθαρες από το RMSD μόνο. Να υπενθυμίσω εδώ ότι το RMSD matrix μας δείχνει μόνο ομοιότητες μεταξύ διαδοχικών διαμορφώσεων. Για τις αναλύσεις μας χρησιμοποιήσαμε **cartesian PCA (cPCA)** και **dihedral PCA (dPCA)** [14]. Τα δύο αυτά είδη PCA έχουν αρκετές διαφορές τις οποίες δεν αξίζει να αναφέρω εδώ (πχ διαφορές στην μορφή των εισαγόμενων δεδομένων ή τρόπος που ερμηνεύονται κατά την ανάλυση αυτά τα δεδομένα).

Αυτό που χρειάζεται να ξέρουμε για την πτυχιακή αυτή είναι, ότι η cPCA εφαρμόζεται στις καρτεσιανές συντεταγμένες των ατόμων των πεπτιδίων, με αποτέλεσμα να αναλύει μεγάλης κλίμακας, συλλογικές κινήσεις ενός μορίου. Την χρησιμοποιούμε όταν θέλουμε να μελετήσουμε μεγάλες αλλαγές στην διαμόρφωση ενός πεπτιδίου, όπως είναι η κίνηση μιας επικράτειας, οι μεταβολές στην διαμόρφωση μεγάλων μακρομορίων και οι κινήσεις σε μια ομάδα μορίων.

Η dPCA σε αντίθεση, εφαρμόζεται στις δίεδρες γωνίες των πεπτιδίων, δηλαδή επικεντρώνεται στις γωνίες στροφής φ/ψ της κύριας αλυσίδας και την χρησιμοποιούμε όταν θέλουμε να μελετήσουμε αλλαγές σε μικρότερη κλίμακα που σχετίζονται με την ελαστικότητα και την αναδίπλωση ενός πεπτιδίου, τέτοια παραδείγματα εκτός από τις γωνίες στροφής φ/ψ, είναι η ανάλυση ροταμερών της πλευρικής αλυσίδας (σημαντικά για την κατανόηση της ποικιλίας στις διαμορφώσεις ενός πεπτιδίου) και οι διαμορφώσεις μικρών μορίων και ελαστικών συνδετών (linkers). Οι δύο αυτές αναλύσεις λειτουργούν συμπληρωματικά και συνδυάζοντας τες θα μπορέσουμε να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με τις κινήσεις και κατ'επέκταση τις αλλαγές στην διαμόρφωση του κάθε πεπτιδίου στο κάθε δυναμικό πεδίο.

Κάποια πράγματα που θα πρέπει να ξέρουμε για τις εικόνες της PCA είναι, ότι στο free energy landscape οι περιοχές υψηλής πυκνότητας αντιπροσωπεύονται από μπλε και σκούρο μπλε χρώμα, ενώ αυτές χαμηλής πυκνότητας από καφέ και κίτρινο. Από την ανάλυση της PCA μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα όπως αν το πεπτίδιο υιοθετεί πολλές ή λίγες διαμορφώσεις, αν αυτές υιοθετούνται για εκτεταμένο χρόνο κατά την διάρκεια της προσομοίωσης, αν υπάρχουν άλλες διαμορφώσεις που συνδέουν τις σταθερές διαμορφώσεις μεταξύ τους και κατά πόσο οι διαμορφώσεις αυτές έχουν

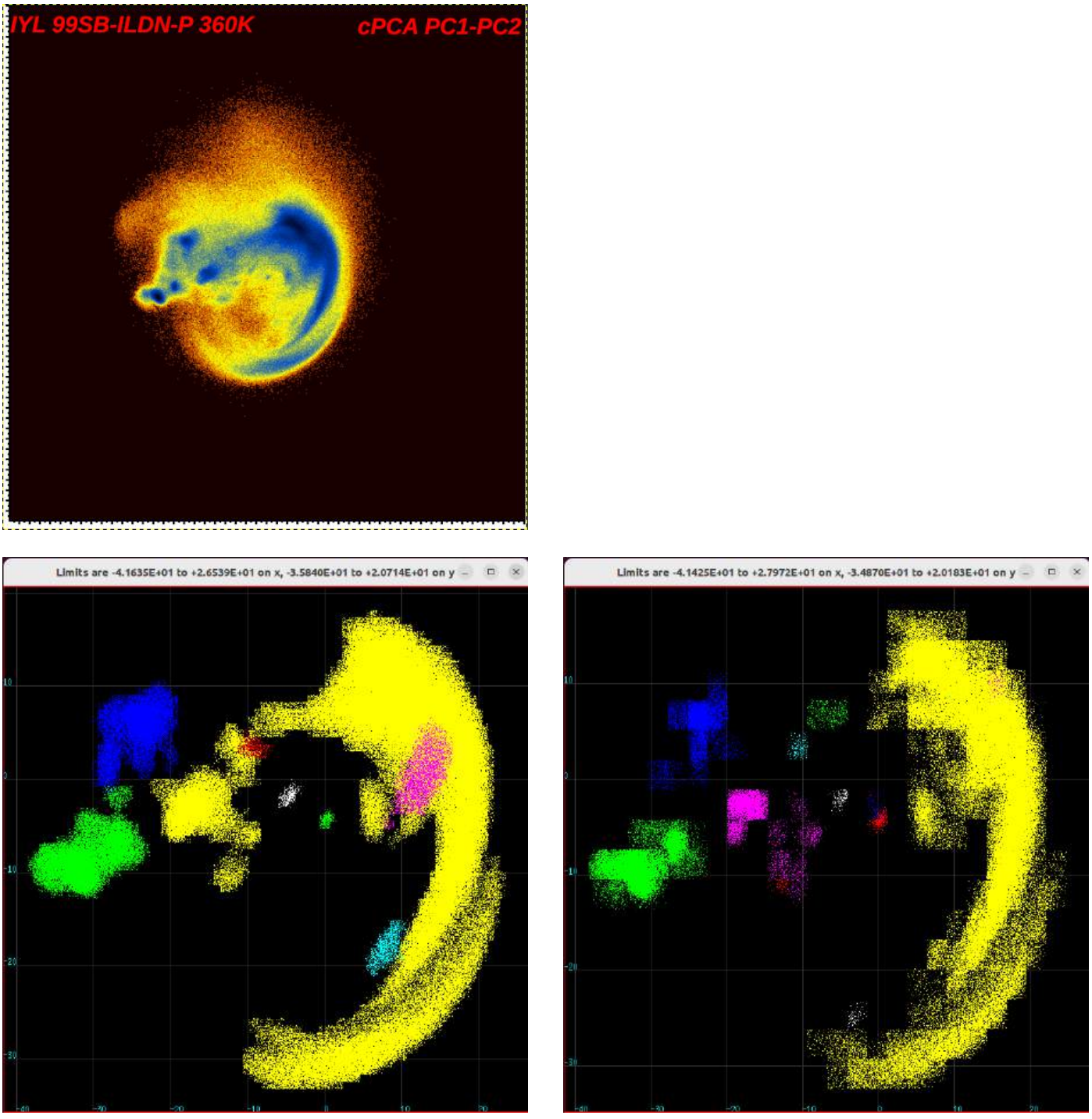
κάποια ομοιότητα. Αυτό το κομμάτι θα το δούμε και πιο αναλυτικά όταν θα σχολιάζω τις εικόνες που βλέπουμε.

Όσον αφορά τις εικόνες των 2D και 5D plot, τα χρώματα δείχνουν την σειρά των clusters από αυτό που περιέχει τα περισσότερα frames σε αυτό με τα λιγότερα, αυτή η σειρά είναι η εξής: Πράσινο, Κίτρινο, Μπλε, Μωβ, Γαλάζιο, Κόκκινο, Άσπρο κ.ο.κ. Από αυτές τις εικόνες, εκτός των συμπερασμάτων που εξάγουμε και από το energy landscape, μπορούμε να δούμε πόσο «κοντά» τοπικά στο plot βρίσκονται τα clusters, δηλαδή πόσο οι αντίστοιχες αντιπροσωπευτικές τους δομές θα περιμένουμε να εμφανίζουν ομοιότητες, χωρίς αυτό να αποτελεί κανόνα.

Το πρόγραμμα επιπλέον δημιουργεί και αρχεία pdb τα οποία παράγουν μια αντιπροσωπευτική δομή για κάθε cluster διαμορφώσεων. Αυτές τις αντιπροσωπευτικές δομές για το κάθε cluster θα τις χρησιμοποιήσουμε και στο κομμάτι της υπέρθεσης με τις πειραματικές δομές του NMR.

3.4 Αποτελέσματα της ανάλυσης PCA

Πιστοί λοιπόν στο μοτίβο μας ξεκινάμε με την ανάλυση του πεπτιδίου **IYL** στο δυναμικό πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K**. Η ανάλυση **cPCA** λοιπόν μας δίνει τις ακόλουθες εικόνες:



Εικόνα 3.5: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.

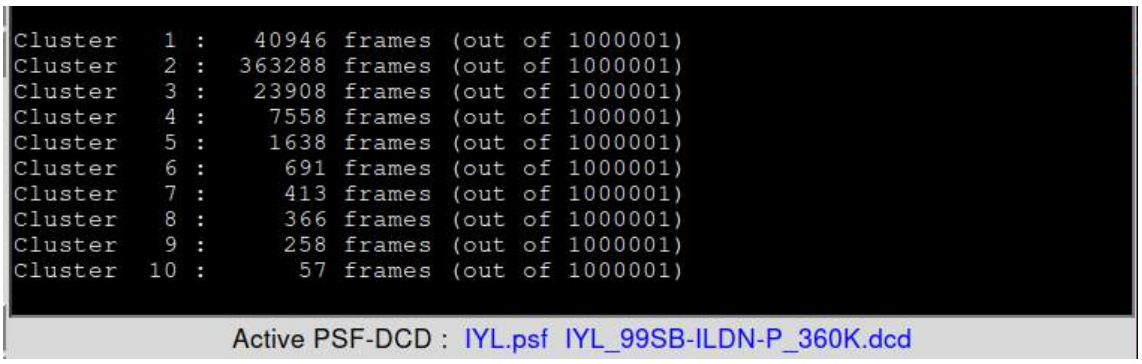
Αρχικά οφείλουμε να σχολιάσουμε την χαρακτηριστική κυκλική μορφή που έχει η Εικόνα 3.5 (α). Αυτή η κυκλική δομή που εμφανίζεται στο free energy landscape, δημιουργείται λόγω του προβλήματος της cPCA να αναλύει τροχιακά των οποίων η δομή αλλάζει σημαντικά, κάτι το οποίο συμβαίνει στην συγκεκριμένη περίπτωση καθώς μελετάμε προσομοιώσεις αναδίπλωσης. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι γιατί οι

εσωτερικές κινήσεις των ατόμων του πεπτιδίου αναμιγνύονται με τις συνολικές κινήσεις του πεπτιδίου [18].Αυτή την χαρακτηριστική εικόνα περιμένουμε να την δούμε σε όλες τις επόμενες cPCA αναλύσεις και για αυτόν τον λόγο οι αναλύσεις dPCA θα μας βοηθήσουν περισσότερο στην εξαγωγή συμπερασμάτων για το συγκεκριμένο πεπτίδιο. Ωστόσο δεν υπάρχει λόγος να μην προσπαθήσουμε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα από cPCA αναλύσεις.

Ας αναλύσουμε λοιπόν όσο μπορούμε αυτές τις εικόνες. Παρατηρούμε ότι στο free energy landscape (Εικόνα 3.5(α)) υπάρχουν περιοχές με σκούρο μπλε, οι οποίες περιέχουν τις διαμορφώσεις του πεπτιδίου με την χαμηλότερη ενέργεια για την συγκεκριμένη προσομοίωση, και μάλιστα γύρω από αυτές τις περιοχές υπάρχουν πολλές περιοχές με κίτρινο χρώμα, γεγονός που θα μπορούσε να υποδεικνύει ότι το πεπτίδιο αλλάζει συχνά διαμορφώσεις και μπορεί να μεταβαίνει από την μια στην άλλη διαμόρφωση (μεταβατικές διαμορφώσεις). Με την βοήθεια των 2D και 5D plots (Εικόνα 3.5 (β) και (γ)) βλέπουμε ότι οι δύο αυτές σκούρες μπλε περιοχές αντιστοιχούν σε μια οικογένεια διαμορφώσεων, δηλαδή σε ένα cluster. Δεν υπάρχει μια συγκεκριμένη διαμόρφωση που το πεπτίδιο τείνει να υιοθετεί, αλλά όσο μπορούμε να διακρίνουμε οπτικά είναι τρεις οι περιοχές (αυτή που αντιστοιχεί στο πράσινο, στο κίτρινο και στο μπλε χρώμα). Τέλος το κίτρινο cluster φαίνεται πιο διασκορπισμένο σε σχέση με το πράσινο για παράδειγμα, άρα θα περιμένουμε οι διαφορετικές του διαμορφώσεις να εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία από αυτές του πράσινου.

Όπως είπαμε, το grcarma μας δίνει και το cluster με τις περισσότερες διαμορφώσεις, αλλά και ένα αντιπροσωπευτικό πεπτίδιο που δημιουργείται από τον συνδυασμό όλων των διαμορφώσεων που περιέχει αυτό το cluster.

Ας τα πάρουμε σιγά σιγά λοιπόν, στην περίπτωση του πεπτιδίου **IYL** στο πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K** η προσομοίωση για την ανάλυση **cPCA** μελέτησε συνολικά 1000001 διαμορφώσεις και ανέθεσε τις 439.123 από αυτές σε δέκα clusters (Εικόνα 3.6).

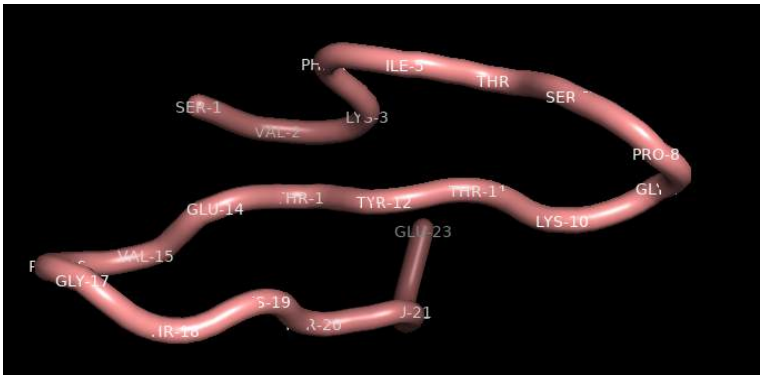


Εικόνα 3.6: Ενδεικτικά τα clusters με τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις όπως προέκυψαν από το Grcarma.

Αριθμός cluster	Ανατεθειμένες διαμορφώσεις	Ποσοστό από τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις (439.123)	Ποσοστό από τις συνολικές διαμορφώσεις (1.000.001)
2	363.288	~82,73%	~36,33%
1	40.946	~9,32%	~4,09%
3	23.908	~5,44%	~2,39%
4	7.558	~1,72%	~0,76%
5	1.638	~0,37%	~0,16%
6	691	~0,16%	~0,07%
7	413	~0,09%	~0,04%
8	366	~0,08%	~0,04%
9	258	~0,06%	~0,03%
10	57	~0,01%	~0,004%

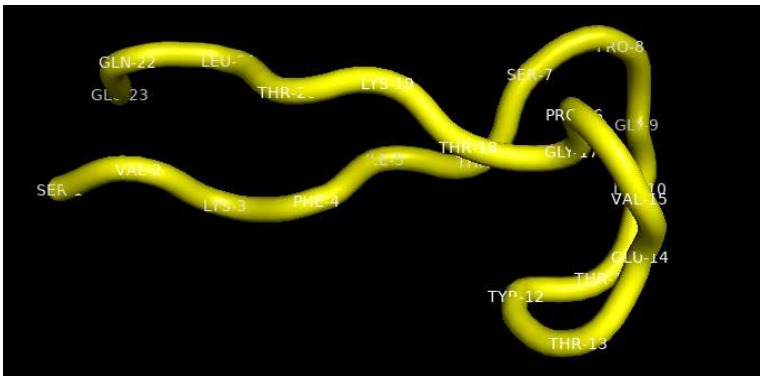
Πίνακας 3.1: Πίνακας με τον αριθμό του εκάστοτε cluster, τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις του, το ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων και το ποσοστό των συνολικών διαμορφώσεων που περιέχει το αντίστοιχο cluster. Οι πληροφορίες των ανατεθειμένων διαμορφώσεων προήλθαν από το Grcarma.

Διαμόρφωση 1η (“cPCA.representative.cluster_02.pdb”)



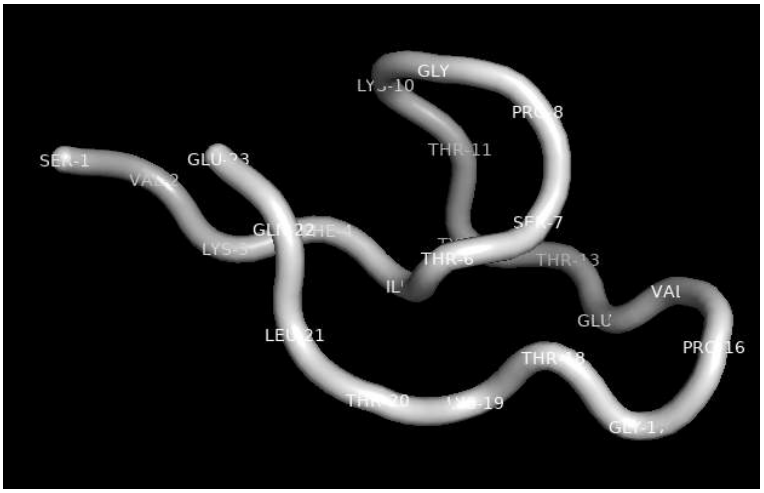
Εικόνα 3.7: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 2, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 2η (“cPCA.representative.cluster_01.pdb”)

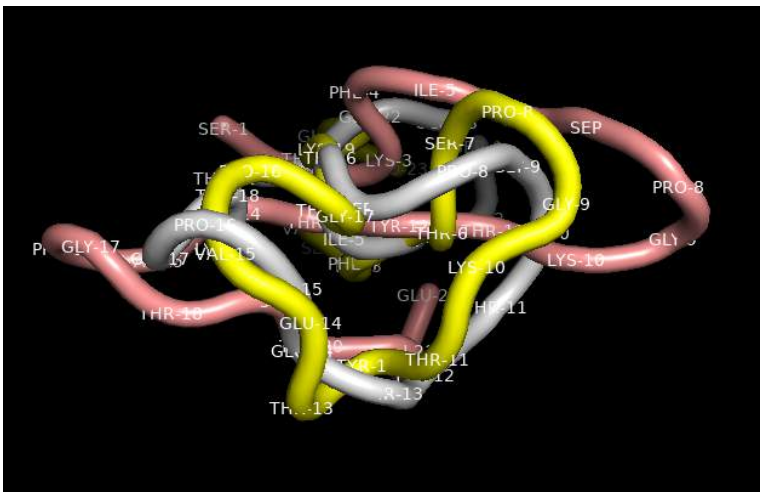


Εικόνα 3.8: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 1, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 3η (“cPCA.representative.cluster_03.pdb”)



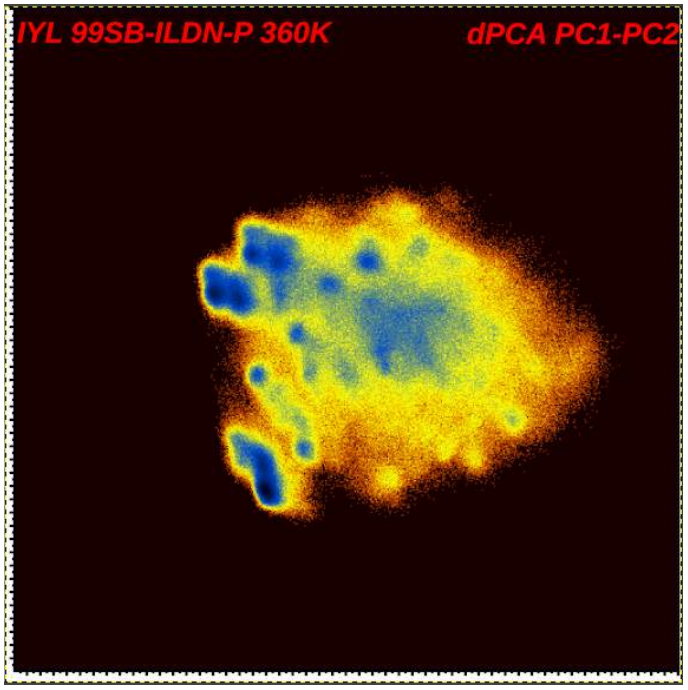
Εικόνα 3.9: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 3, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

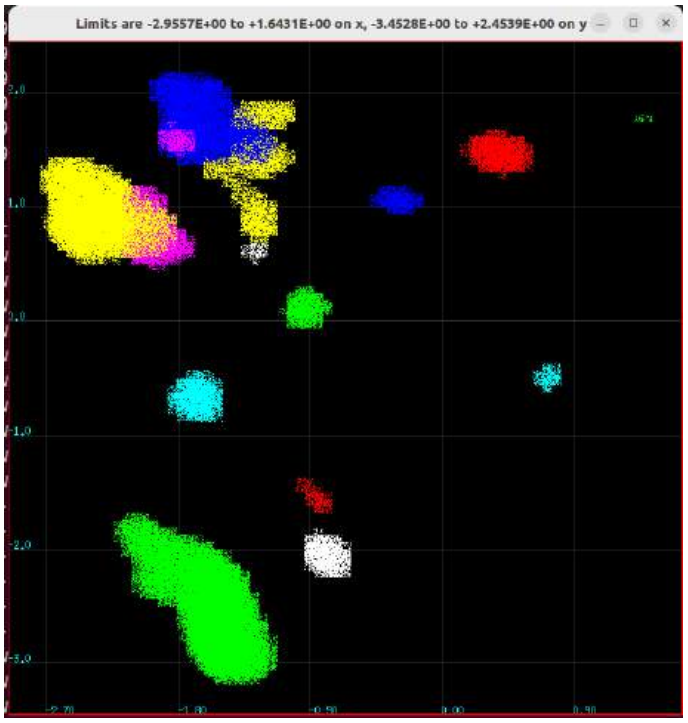


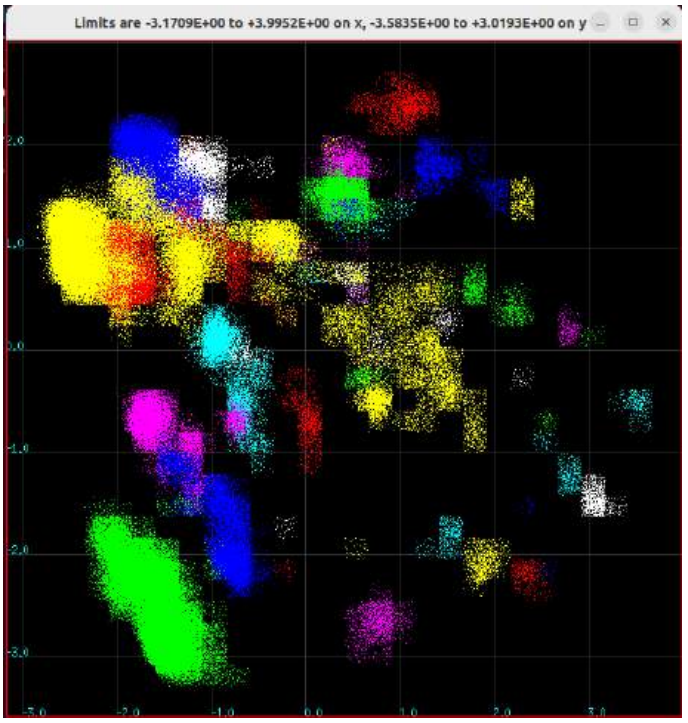
Εικόνα 3.10: Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των τριών πρώτων clusters, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Παρατηρούμε ότι οι τρεις αντιπροσωπευτικές δομές (αντιπροσωπεύουν τα τρία κύρια clusters που περιμέναμε) που έχει δημιουργήσει το grcarma έχουν τεράστιες διαφορές μεταξύ τους, φαίνεται μάλιστα και από την Εικόνα 3.10 που το μόνο που βλέπουμε είναι ένα συνονθύλευμα από γραμμές. Το δεύτερο (κίτρινο) cluster φαίνεται (Εικόνα 3.8) να εμφανίζει λιγότερες ομοιότητες σε σχέση με τα άλλα δύο. Θα μπορούσαμε ίσως να αποδώσουμε αυτή τη διαφορά και στην απόσταση που έχει από τα άλλα δύο στα plots. Επιπλέον παρατηρώντας τα ποσοστά, βλέπουμε ότι το cluster 2 περιέχει και το μεγαλύτερο ποσοστό διαμορφώσεων και μάλιστα με μεγάλη διαφορά. Τέλος, αξίζει εδώ να σημειώσουμε ότι το cluster 2 (Εικόνα 3.8) είναι και το μόνο που παρουσιάζει οπτικά ομοιότητες με την μορφή που έχουν τα πεπτίδια, αλλά αυτό θα το μελετήσουμε πιο μετά στο κομμάτι της υπέρθεσης.

Σειρά έχει η **dPCA** ανάλυση του πεπτιδίου **IYL** στο πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K**.





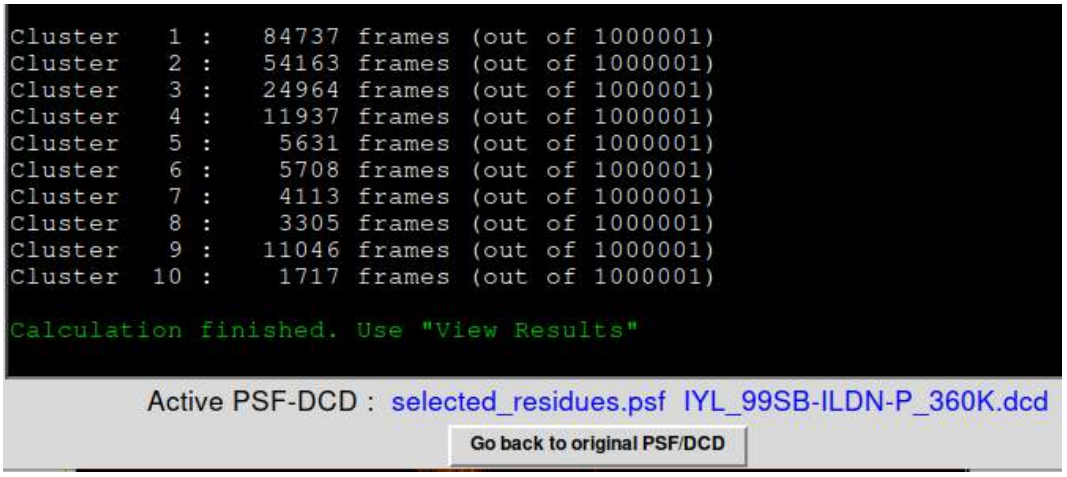


Εικόνα 3.11: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.

Όπως και στην cPCA ανάλυση, έτσι και δω μπορούμε να εξάγουμε κάποια συμπεράσματα σχετικά με τα clusters που εμφανίστηκαν. Παρατηρούμε αρκετές περιοχές με μπλε χρώμα η μια σχετικά κοντά στην άλλη και μάλιστα αυτές δημιουργούν διαφορετικά clusters και όχι ένα ενιαίο (Εικόνα 3.11 (α)). Αυτές οι περιοχές που βρίσκονται σε απόσταση η μια από την άλλη θα μπορούσαν να είναι

ένδειξη ότι το πεπτίδιο υιοθετεί διαμορφώσεις, οι οποίες παραμένουν κατά την διάρκεια της προσομοίωσης.

Και για την dPCA έχουμε τα αριθμητικά αποτελέσματα της προσομοίωσής μας. Η προσομοίωση μελέτησε συνολικά 1000001 διαμορφώσεις και ανέθεσε τις 207.321 από αυτές σε δέκα clusters (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12: Ενδεικτικά τα clusters με τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις όπως προέκυψαν από το Grcarma.

Μέσω των δεδομένων αυτών μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό των διαμορφώσεων που περιέχει κάθε cluster. Έτσι λοιπόν έχουμε, στις 207.321 διαμορφώσεις τα clusters περιέχουν τα εξής ποσοστά.

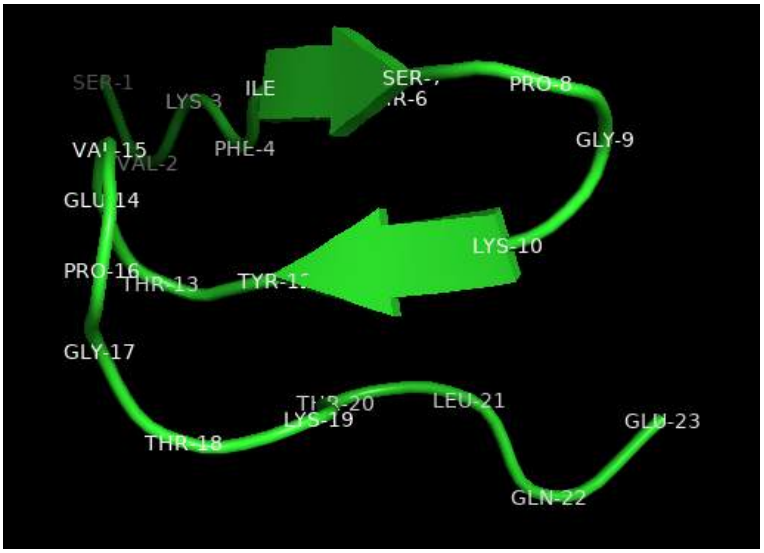
Αριθμός cluster	Ανατεθειμένες διαμορφώσεις	Ποσοστό από τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις (207.321)	Ποσοστό από τις συνολικές διαμορφώσεις (1.000.001)
1	84.737	~40,87%	~8,47%
2	54.163	~26,13%	~5,42%
3	24.964	~12,04%	~2,5%
4	11.937	~5,76%	~1,19%
9	11.046	~5,33%	~1,11%
6	5.708	~2,75%	~0,57%
5	5.631	~2,72%	~0,56%

7	4.113	~1,98%	~0,41%
8	3.305	~1,59%	~0,33%
10	1.717	~0,83%	~0,17%

Πίνακας 3.2: Πίνακας με τον αριθμό του εκάστοτε cluster, τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις του, το ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων και το ποσοστό των συνολικών διαμορφώσεων που περιέχει το αντίστοιχο cluster. Οι πληροφορίες των ανατεθειμένων διαμορφώσεων προήλθαν από το Grcarma.

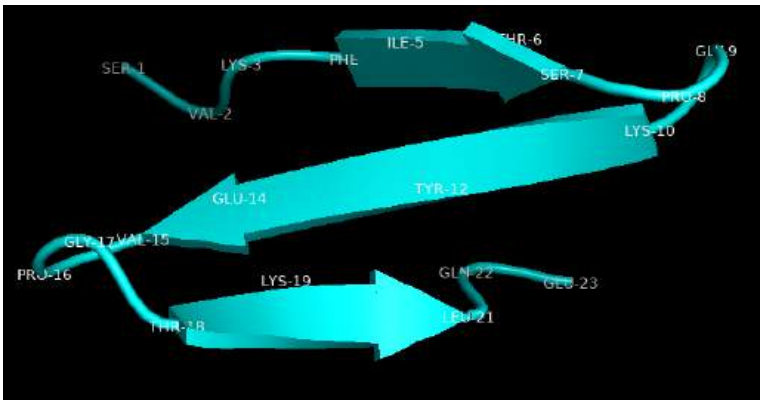
Παρατηρούμε ότι τα πρώτα τρία clusters έχουν με διαφορά υψηλότερα ποσοστά από τα υπόλοιπα και μάλιστα το cluster 1 περιέχει σχεδόν 41 % των ανατεθειμένων διαμορφώσεων. Ωστόσο παρατηρούμε ότι σε αντίθεση με την cPCA ανάλυση μόνο ένα cluster περιέχει λιγότερες από 1% των ανατεθειμένων διαμορφώσεων. Παρακάτω θα δούμε τα αντιπροσωπευτικά πεπτίδια που κατασκεύασε το grcarma για αυτά τα τρία clusters.

Διαμόρφωση 1η (“dPCA.representative.cluster_01.pdb”)



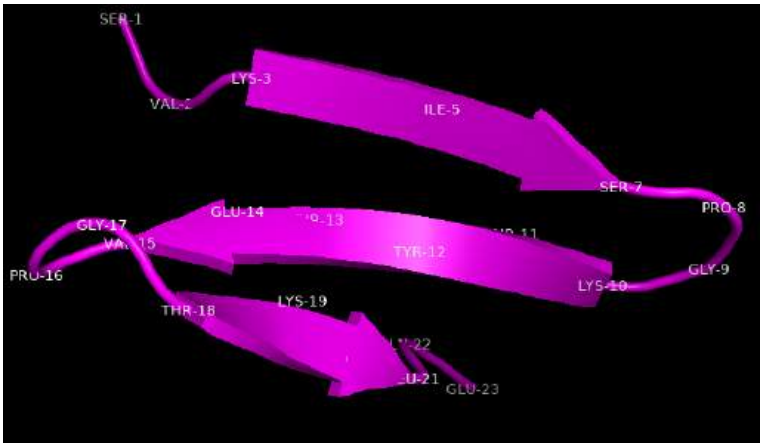
Εικόνα 3.13: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 1, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 2η (“dPCA.representative.cluster_02.pdb”)

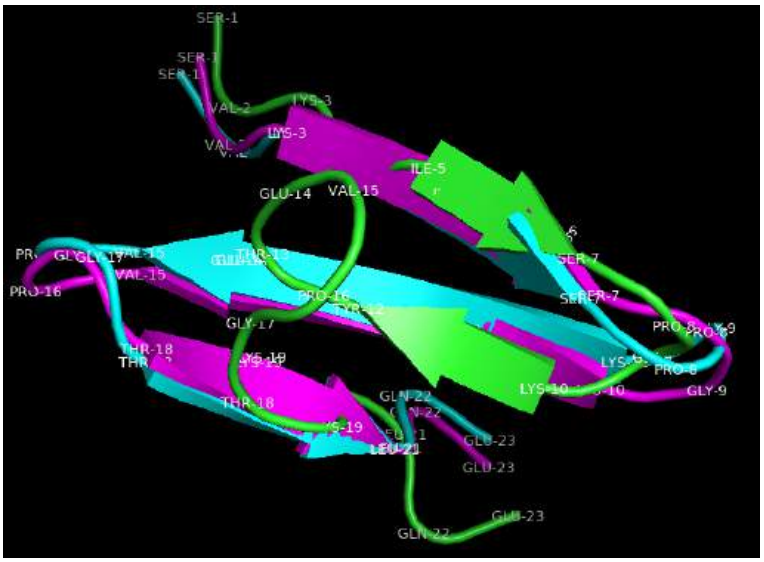


Εικόνα 3.14: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 2, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 3η (“dPCA.representative.cluster_03.pdb”)



Εικόνα 3.15: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 3, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.



Εικόνα 3.16: Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των τριών πρώτων clusters, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

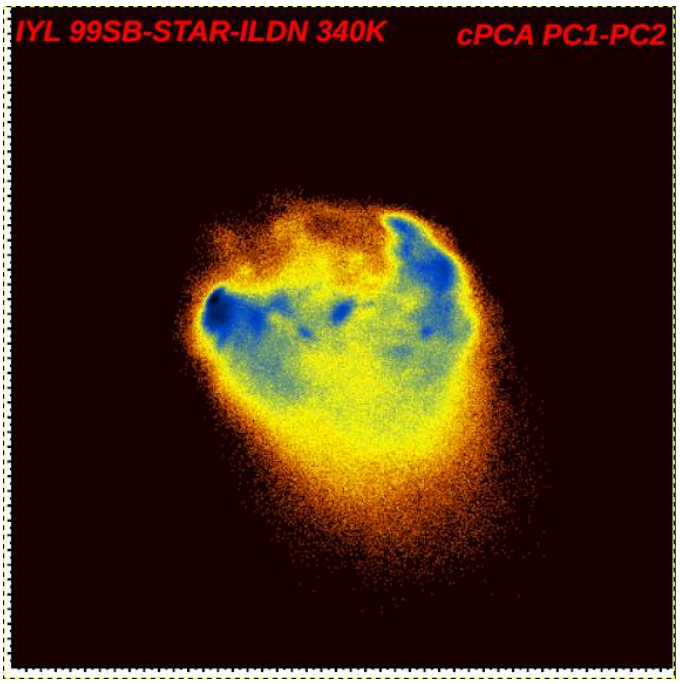
Αρχικά παρατηρούμε ότι το cluster 1 διαφέρει από τα άλλα δύο, καθώς είναι φανερό ότι λείπει ο τρίτος β-κλώνος (Εικόνα 3.13). Η διαφορά αυτή θα μπορούσαμε να πούμε ότι φαίνεται στα plots, όπου το πράσινο cluster είναι μακριά τοπικά από το κίτρινο και το μπλε, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την διαφορά, αλλά όχι τόσο μακριά ώστε οι μορφές τους να είναι εντελώς διαφορετικές όπως έγινε στην cPCA ανάλυση.

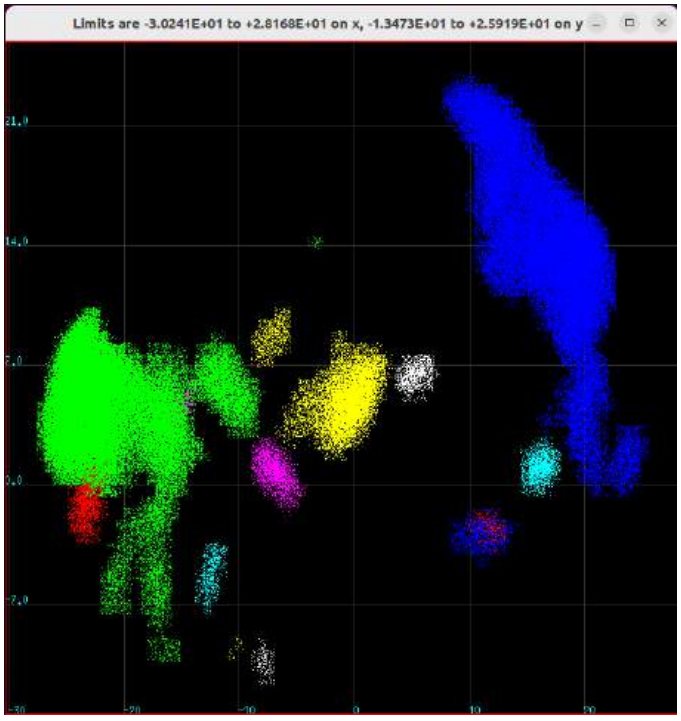
Η σημαντική παρατήρηση που κάναμε είναι ότι στο πρώτο cluster, το οποίο είναι και αυτό που εμφανίζεται περισσότερες φορές σχετικά με τις υπόλοιπες διαμορφώσεις, απουσιάζει ο τρίτος β-κλώνος και σχηματίζονται μόνο δύο β-κλώνοι στο πεπτίδιο. Πιθανόν η απουσία του τρίτου κλώνου να οφείλεται στην στροφή ανάμεσα στον δεύτερο και τρίτο κλώνο, η οποία αποτελείται από έξι κατάλοιπα αντί για τρία. Παρατηρούμε ωστόσο ότι τα άλλα δύο clusters (clusters 2, 3) αποτελούνται από τρεις β-κλώνους και η δομές τους είναι αρκετά ίδιες (πράγμα που αναμέναμε όπως είπαμε από τα plots).

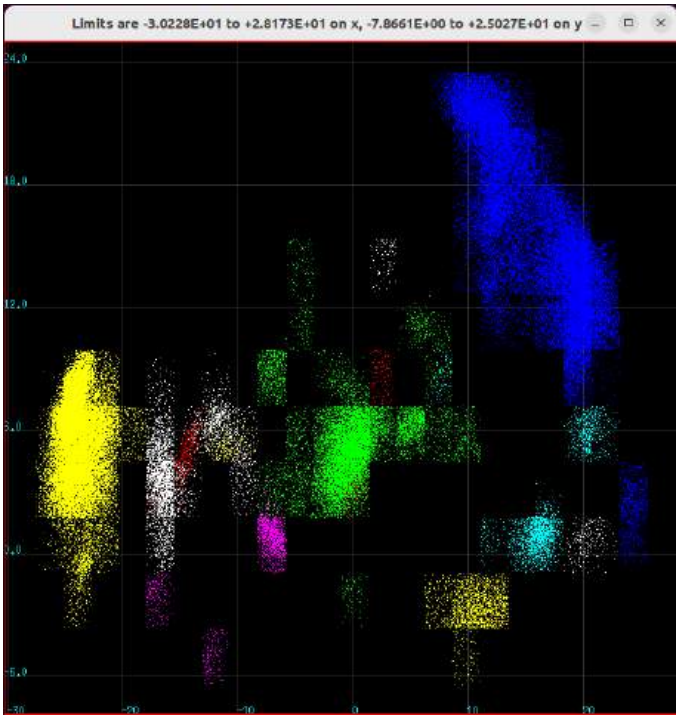
Όσον αφορά τα υπόλοιπα 7 clusters των οποίων δεν υπάρχουν εικόνες των αντιπροσωπευτικών τους δομών στην πτυχιακή αυτή μπορούμε να σχολιάσουμε τα εξής: Στα clusters 4, 9, 6 υπάρχουν τρεις β-κλώνοι, στα clusters 5, 8, 10 υπάρχουν δύο (όπως και στο cluster 1), ενώ το cluster 7 δεν έχει καθόλου κλώνους. Στο μεγαλύτερο ποσοστό το πεπτίδιο υιοθετεί μια δευτεροταγή δομή τριών β-κλώνων.

Αξίζει να σημειώσουμε ότι στα clusters 5 και 8 χαρακτηριστικά β-φύλλου παρουσιάζουν ο πρώτος και ο τρίτος κλώνος μόνο. Κάτι ανάλογο παρατηρήσαμε και στο RMSD matrix και το secondary structure, όπου εκεί ονομάσαμε αυτές τις δύο διαμορφώσεις ως «κόκκινες».

Συνεχίζουμε με το ίδιο πεπτίδιο στο πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K**. Αρχικά θα δούμε τις εικόνες από την **cPCA** ανάλυση.







Εικόνα 3.17: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.

Στις εικόνες αυτού του πεδίου παρατηρούμε ότι μόνο ένα σημείο είναι σκούρο μπλε (Εικόνα 3.17 (α)) και μάλιστα ανήκει σε ένα αρκετά εκτεταμένο cluster, το πράσινο (Εικόνα 3.17 (β)). Άλλο ένα μεγάλο cluster είναι το μπλε, το οποίο ωστόσο δεν φαίνεται να έχει καμία σκούρη μπλε περιοχή. Τα δύο αυτά μεγάλα clusters απαρτίζονται από διαμορφώσεις οι οποίες διαφέρουν μεταξύ, σε αντίθεση με το κίτρινο cluster που

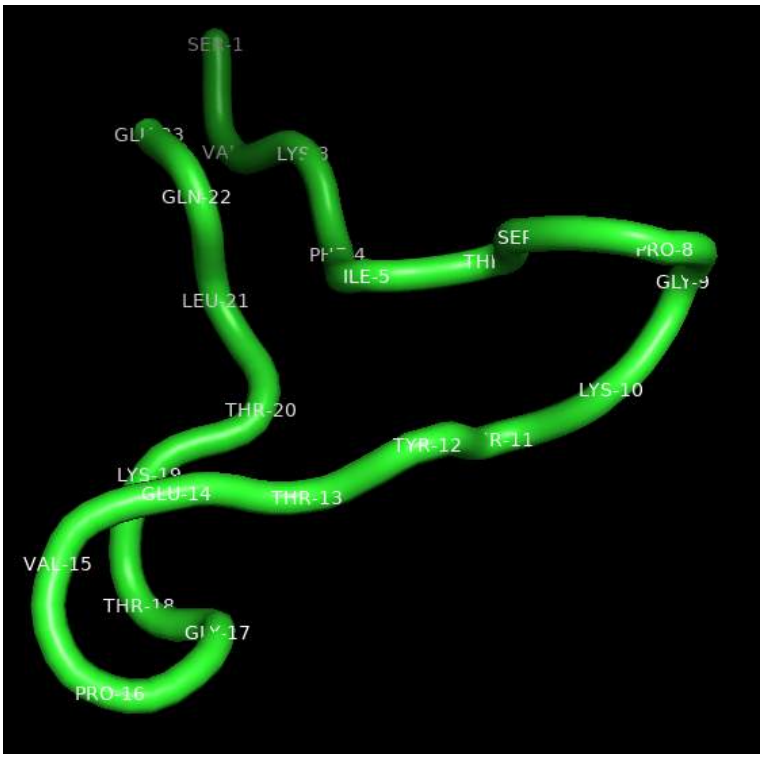
είναι μικρό και οι διαμορφώσεις δεν θα περιμέναμε να παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές. Σαν τελική παρατήρηση μπορούμε να πούμε ότι και τα τρία αυτά clusters θα περιμένουμε να έχουν διαφορές μεταξύ τους καθώς κανένα τους δεν βρίσκεται πολύ κοντά με κάποιο άλλο, χωρίς αυτή η απόσταση ωστόσο να δικαιολογεί την διαφορά στην διαμόρφωση.

Όπως αναφέραμε σε αυτό δυναμικό πεδίο η προσομοίωση μελέτησε συνολικά 800001 διαμορφώσεις και ανέθεσε στην συνέχεια τις 206.391 από αυτές σε δέκα clusters. Όπως και πριν υπολογίζουμε το ποσοστό διαμορφώσεων που περιέχει καθένα από αυτά τα δέκα clusters.

Αριθμός cluster	Ανατεθειμένες διαμορφώσεις	Ποσοστό από τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις (206.391)	Ποσοστό από τις συνολικές διαμορφώσεις (800.001)
1	100.484	~48,69%	~12,56%
3	79.160	~38,35%	~9,89%
2	12.706	~6,16%	~1,59%
8	3.862	~1,87%	~0,48%
4	2.454	~1,19%	~0,31%
6	2.451	~1,19%	~0,31%
5	1.799	~0,87%	~0,22%
10	1.414	~0,69%	~0,18%
7	1.188	~0,58%	~0,15%
9	873	~0,42%	~0,11%

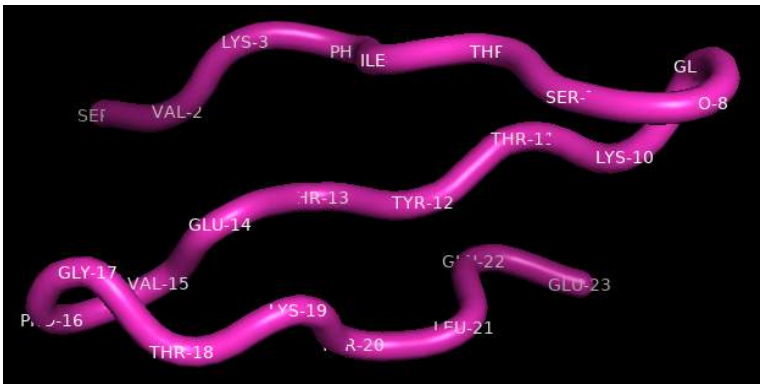
Πίνακας 3.3: Πίνακας με τον αριθμό του εκάστοτε cluster, τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις του, το ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων και το ποσοστό των συνολικών διαμορφώσεων που περιέχει το αντίστοιχο cluster. Οι πληροφορίες των ανατεθειμένων διαμορφώσεων προήλθαν από το Grcarma.

Διαμόρφωση 1η (“cPCA.representative.cluster_01.pdb”)



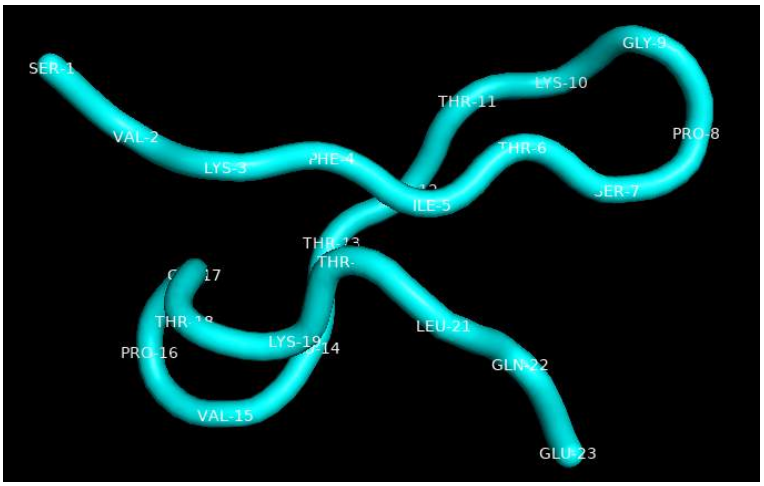
Εικόνα 3.18: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 1, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 2η (“cPCA.representative.cluster_03.pdb”)

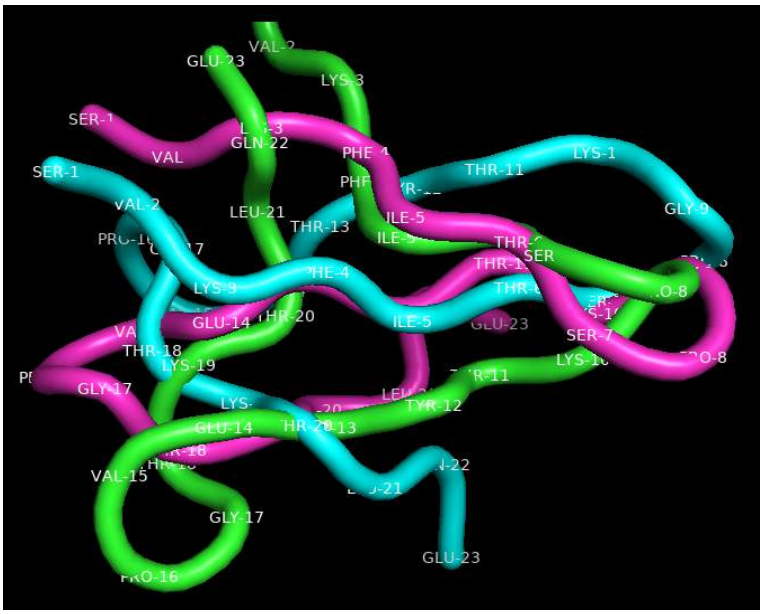


Εικόνα 3.19: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 3, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 3η (“cPCA.representative.cluster_02.pdb”)



Εικόνα 3.20: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 2, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

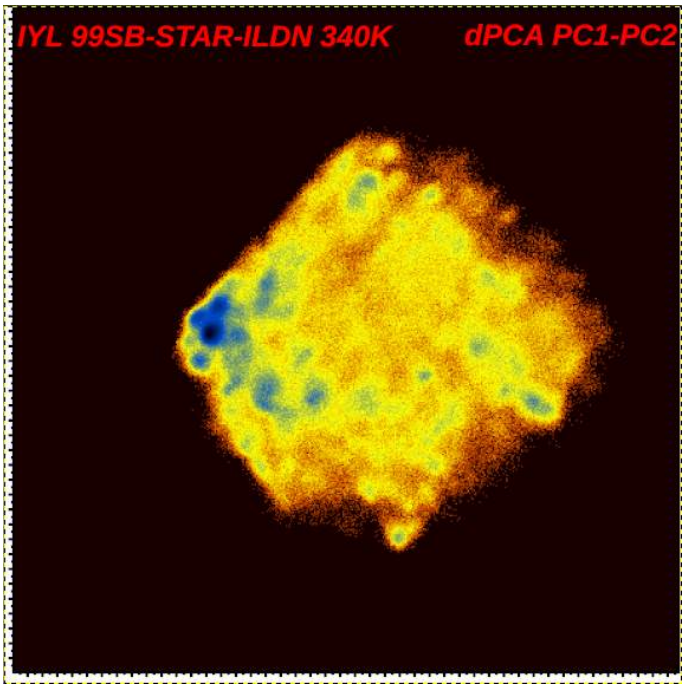


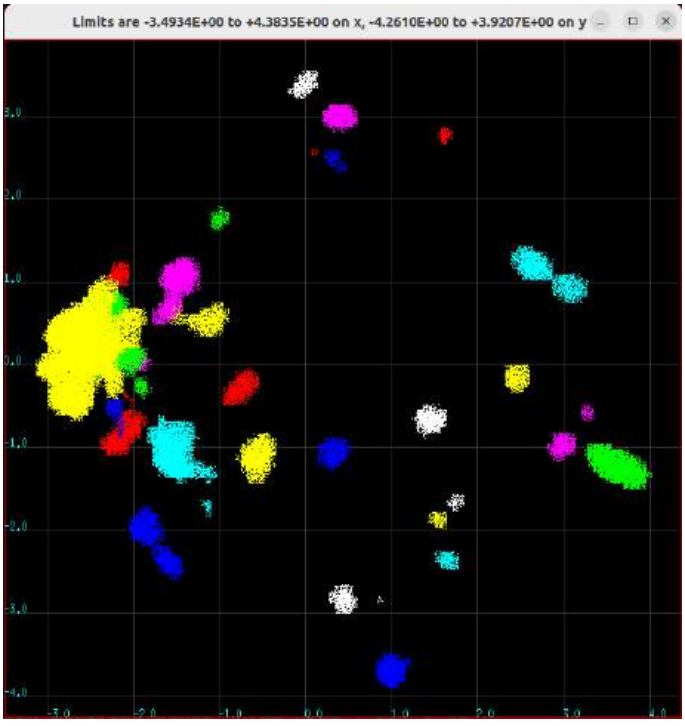
Εικόνα 3.21: Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των τριών πρώτων clusters, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

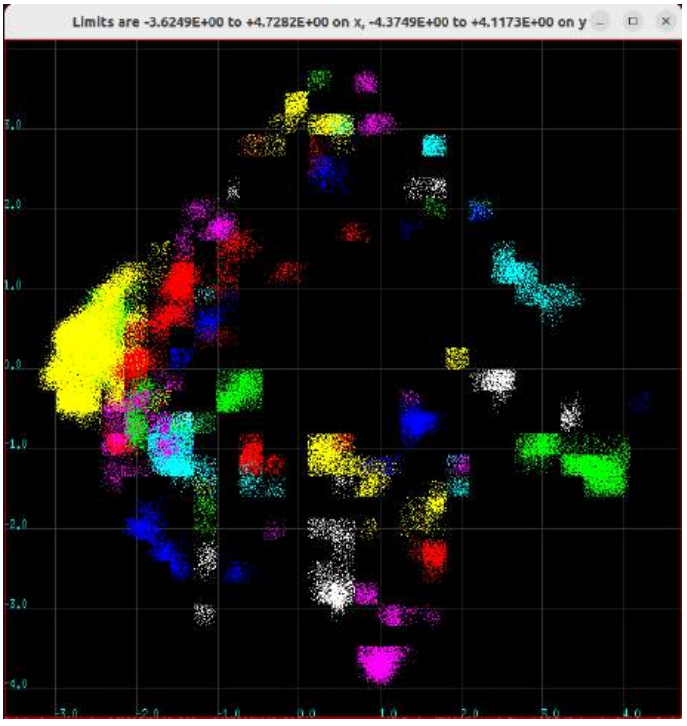
Η βασική παρατήρηση που κάνουμε είναι ότι όντως κανένα από τα τρία αυτά clusters δεν μοιάζει με κάποιο άλλο. Παρατηρούμε ότι το cluster 3 (Εικόνα 3.19) εμφανίζει μια μορφή παρόμοια με αυτή που θα περιμέναμε, ενώ το cluster 1 (Εικόνα 3.18) έχει αποκλίνει πάρα πολύ από την δομή που θα περιμέναμε. Το cluster 2 (Εικόνα 3.20) μορφολογικά βλέπουμε ότι και αυτό έχει αποκλίνει κατά πολύ. Τέλος αξίζει να σημειώσουμε εδώ ότι το cluster με το μεγαλύτερο ποσοστό ανατεθειμένων διαμορφώσεων εμφανίζει λιγότερες ομοιότητες με την μορφή που θα περιμέναμε να έχει το πεπτίδιο σε σχέση με το δεύτερο στην σειρά cluster. Αυτή η τελευταία παρατήρηση μας δείχνει ότι η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση που εμφανίζεται στο

μεγαλύτερο ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων δεν είναι αναγκαστικά και αυτή με την μεγαλύτερη ομοιότητα με την πειραματική δομή που θα δούμε στην συνέχεια στο κομμάτι της υπέρθεσης.

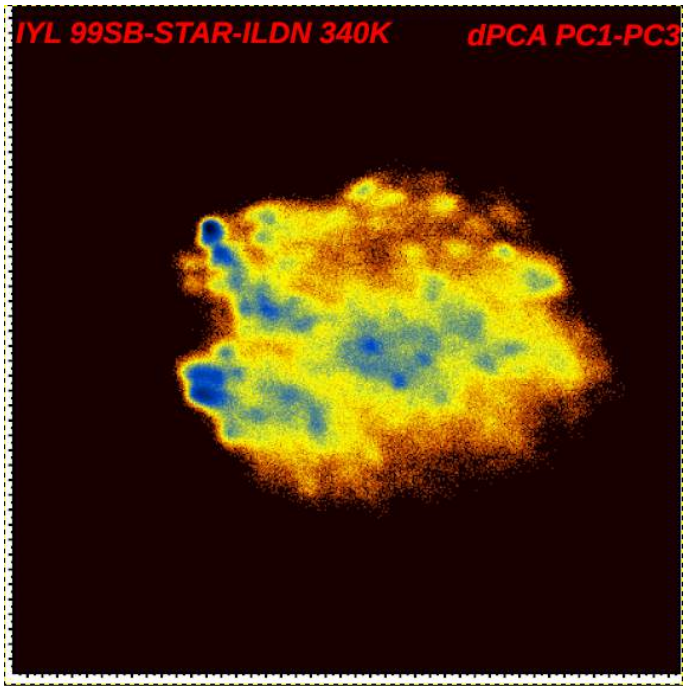
Περνάμε τώρα και στην **dPCA** ανάλυση του πεπτιδίου **IYL** στο πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K**, όπου παίρνουμε τις παρακάτω εικόνες.

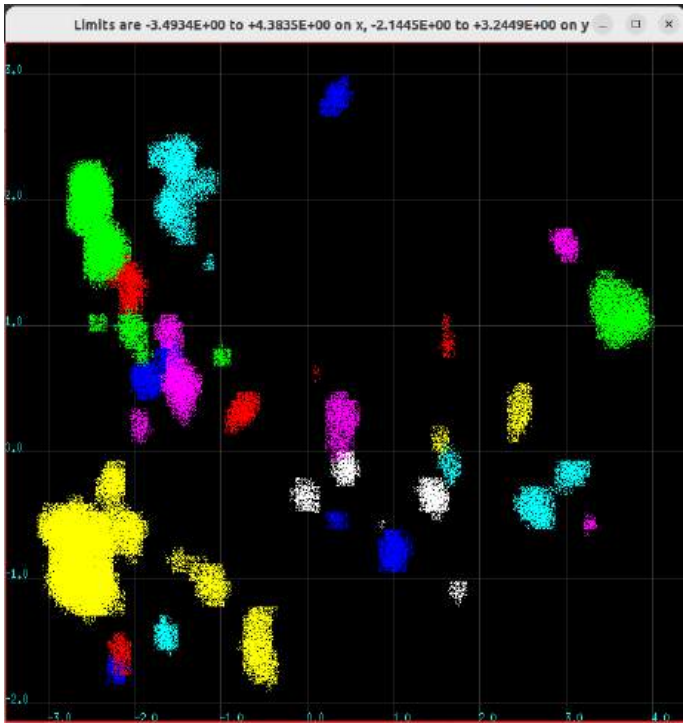


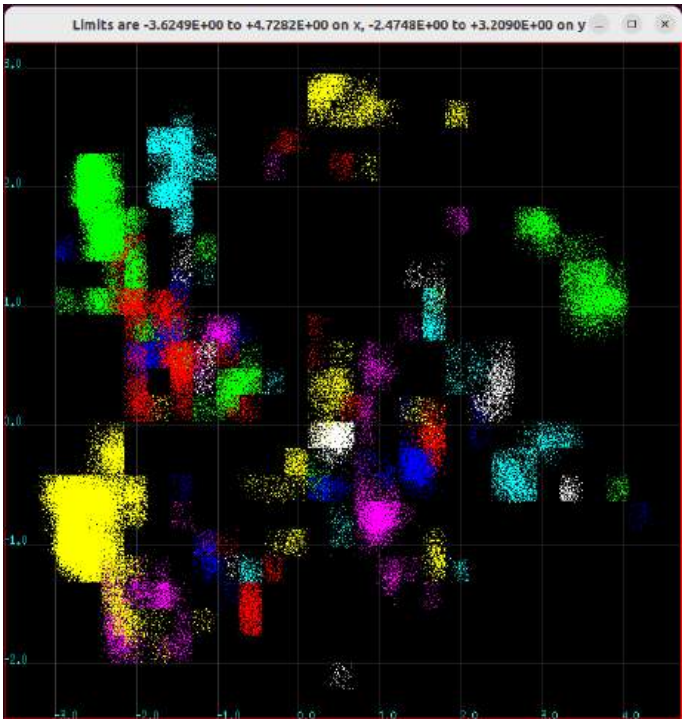




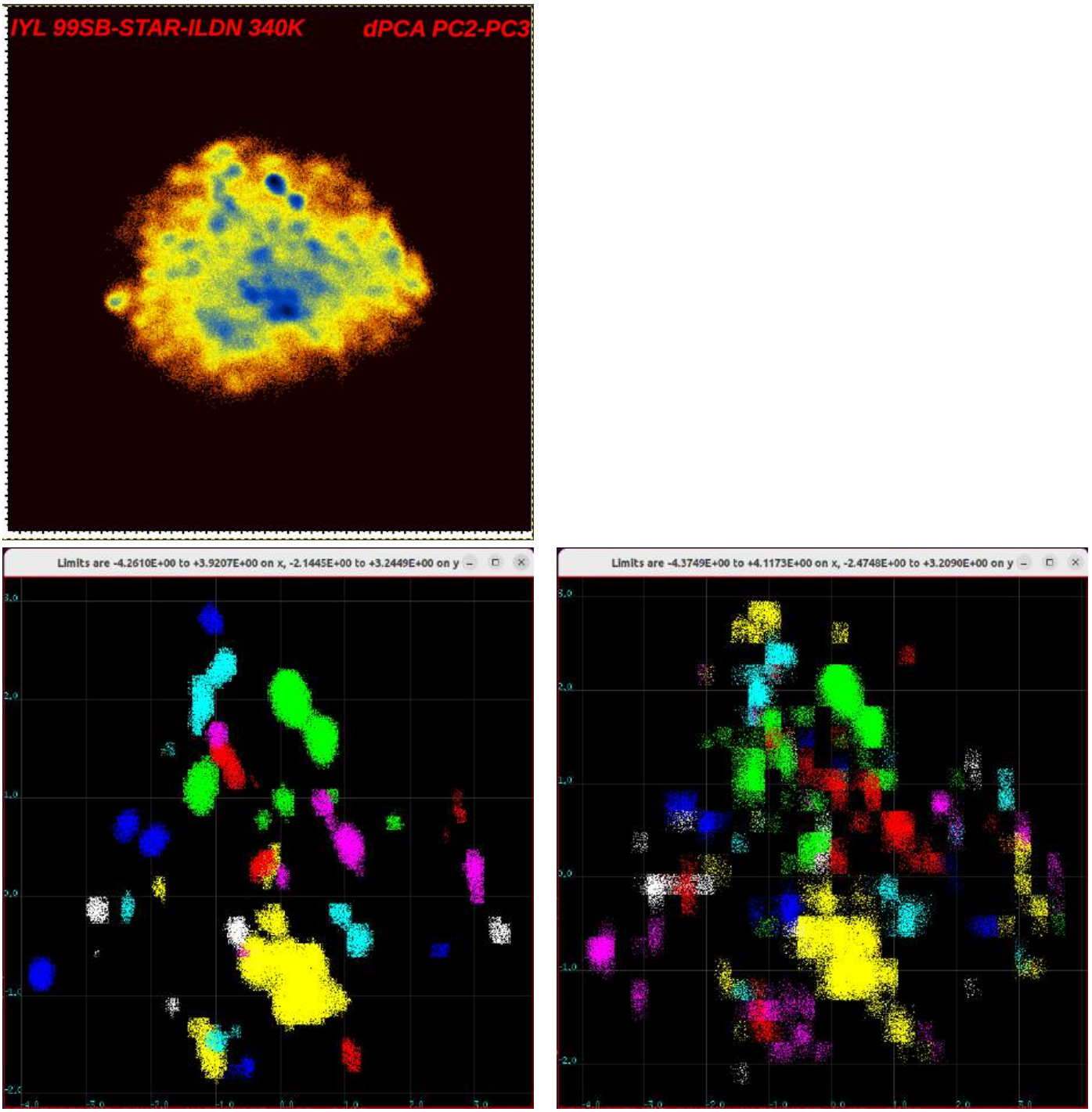
Εικόνα 3.22: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.







Εικόνα 3.23: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.



Εικόνα 3.24: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.

Η πρώτη βασική παρατήρηση που κάνουμε είναι το γεγονός ότι, αν και υπάρχουν πολλές περιοχές με κίτρινο χρώμα, παρατηρούμε ότι οι μπλε περιοχές στην εικόνα του free energy landscape του PC1-PC2 (Εικόνα 3.22 (α)) είναι όλες μαζεμένες στο αριστερό τμήμα της εικόνας. Αυτό θα μπορούσε να δείχνει ότι σε αυτή την περίπτωση το πεπτίδιο ακολουθεί κάτι σαν χωνί αναδίπλωσης (folding funnel), καθώς η πρωτεΐνη

υιοθετεί για μικρό χρονικό διάστημα πολλές διαμορφώσεις πριν καταλήξει στις πιο σταθερές που βρίσκονται τέρμα αριστερά. Ωστόσο αυτό είναι απλά μια υπόθεση, καθώς δεν έχουμε όλα τα απαραίτητα δεδομένα για να υποστηρίξουμε κάτι τέτοιο.

Άμα ελέγξουμε και τα άλλα δύο free energy landscapes (των PC1-PC3 και PC2-PC3) (Εικόνες 3.23 (α) και 3.24 (α)) βλέπουμε ότι αυτά τα δύο clusters τελικά ξεχωρίζουν. Πιο συγκεκριμένα στην εικόνα PC2 - PC3 το πρόγραμμα δείχνει ότι οι δύο πάνω σκούρες μπλε περιοχές αντιστοιχούν στο cluster 2 και η κάτω σκούρη μπλε και τριγύρω μπλε περιοχή αντιστοιχεί στο cluster 1. Συνολικά όμως παρατηρούμε ότι υπάρχει πολύ μεγάλη περιοχή με κίτρινο χρώμα που δείχνει ότι το πεπτίδιο πέρασε από πολλές διαφορετικές μεταξύ τους διαμορφώσεις, αλλά τελικά κατέληγε πάντα στις διαμορφώσεις που δημιουργούν την σκούρη μπλε περιοχή.

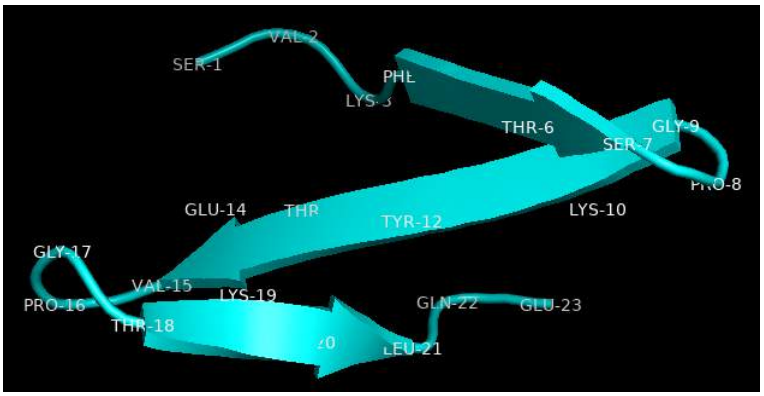
Για να προχωρήσουμε όμως στις pdb δομές να δούμε τι παρατηρούμε και εκεί. Σε αυτό λοιπόν το δυναμικό πεδίο η προσομοίωση μελέτησε συνολικά 800001 διαμορφώσεις και ανέθεσε στην συνέχεια τις 131.924 από αυτές σε δέκα clusters. Όπως και πριν υπολογίζουμε το ποσοστό διαμορφώσεων που περιέχει καθένα από αυτά τα δέκα clusters.

Αριθμός cluster	Ανατεθειμένες διαμορφώσεις	Ποσοστό από τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις(131.924)	Ποσοστό από τις συνολικές διαμορφώσεις (800.001)
2	57.819	~43,83%	~7,23%
1	38.826	~29,43%	~4,85%
5	7.261	~5,5%	~0,91%
8	6.680	~5,06%	~0,83%
4	5.360	~4,06%	~0,67%
9	4.258	~3,23%	~0,53%
10	3.778	~2,86%	~0,47%
6	3.473	~2,63%	~0,43%
3	2.696	~2,04%	~0,34%
7	1.773	~1,34%	~0,22%

Πίνακας 3.4: Πίνακας με τον αριθμό του εκάστοτε cluster, τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις του, το ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων και το ποσοστό των συνολικών διαμορφώσεων που περιέχει το αντίστοιχο cluster. Οι πληροφορίες των ανατεθειμένων διαμορφώσεων προήλθαν από το Grcarma.

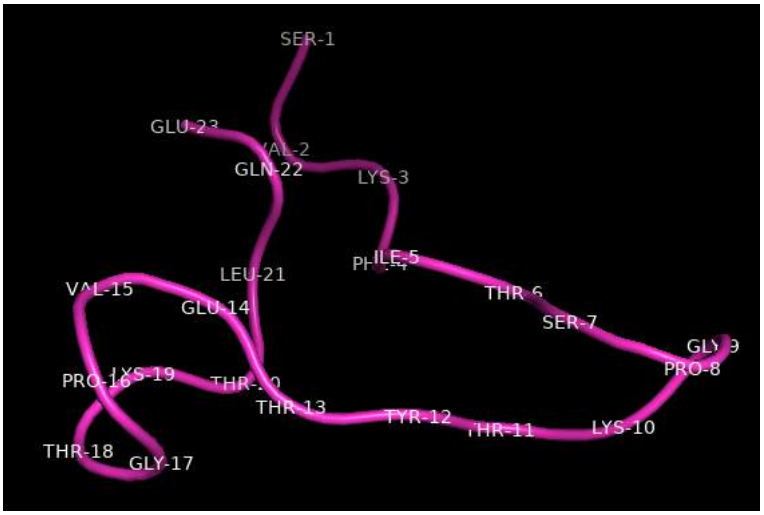
Σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε ότι δύο είναι τα clusters που ξεχωρίζουν περισσότερο από τα υπόλοιπα, το cluster 2 και το cluster 1.

Διαμόρφωση 1η (“dPCA.representative.cluster_02.pdb”)

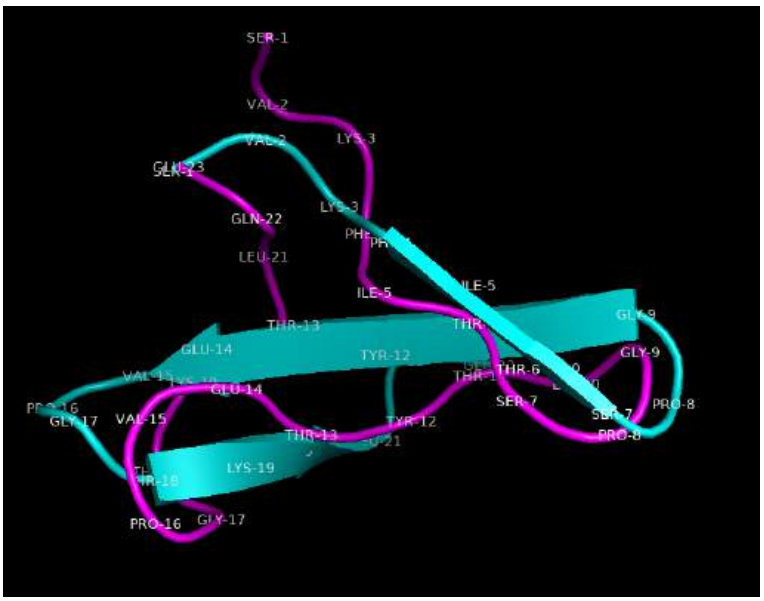


Εικόνα 3.25: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 2, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 2η (“dPCA.representative.cluster_01.pdb”)



Εικόνα 3.26: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 1, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

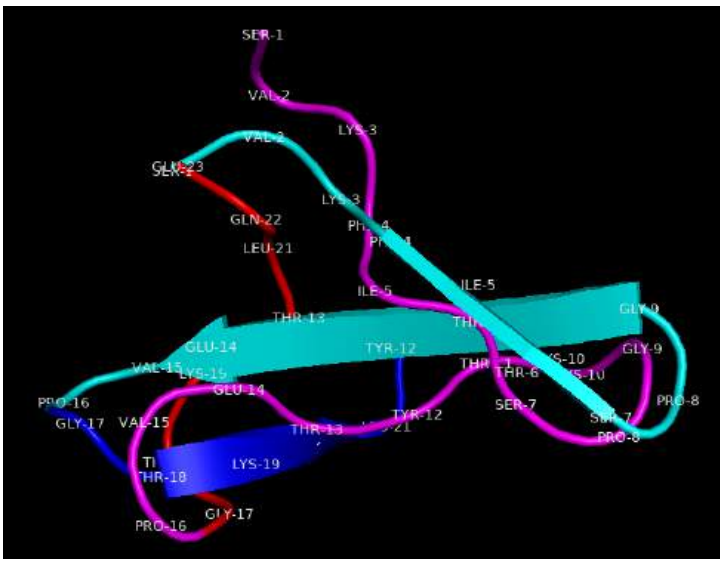


Εικόνα 3.27: Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των δύο πρώτων clusters, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Αν και πριν είπαμε ότι οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις του πράσινου και του κίτρινου cluster (που αντιστοιχούν στις μόνες δύο σκούρες μπλε περιοχές του free energy landscape) θα μπορούσαν να εμφανίζουν ομοιότητες λόγω της τοπικής τους εγγύτητας, τελικά παρατηρούμε ότι το κίτρινο cluster δεν εμφανίζει καθόλου συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή (Εικόνα 3.26). Αλλά βλέποντας την Εικόνα 3.27 όπου έχουμε ευθυγραμμίσει τα δύο αυτά clusters παρατηρούμε ότι η βασική τους δομή, όσο αφορά τις στροφές, δεν διαφέρει πάρα μεταξύ τους.

Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των υπόλοιπων clusters δεν έχουν συμπεριληφθεί, καθώς εμφανίζονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά σε σχέση με τα δύο πρώτα clusters, ωστόσο μπορούμε να κάνουμε κάποια σχόλια και για αυτές τις διαμορφώσεις. Παρατηρήσαμε ότι κάποια clusters εμφανίζουν δύο β-κλώνους (clusters 4, 6, 9, 10), κάποια άλλα μια μικρή έλικα (clusters 3, 7, 8) και ένα δεν εμφανίζει καμία δευτεροταγή δομή (cluster 5).

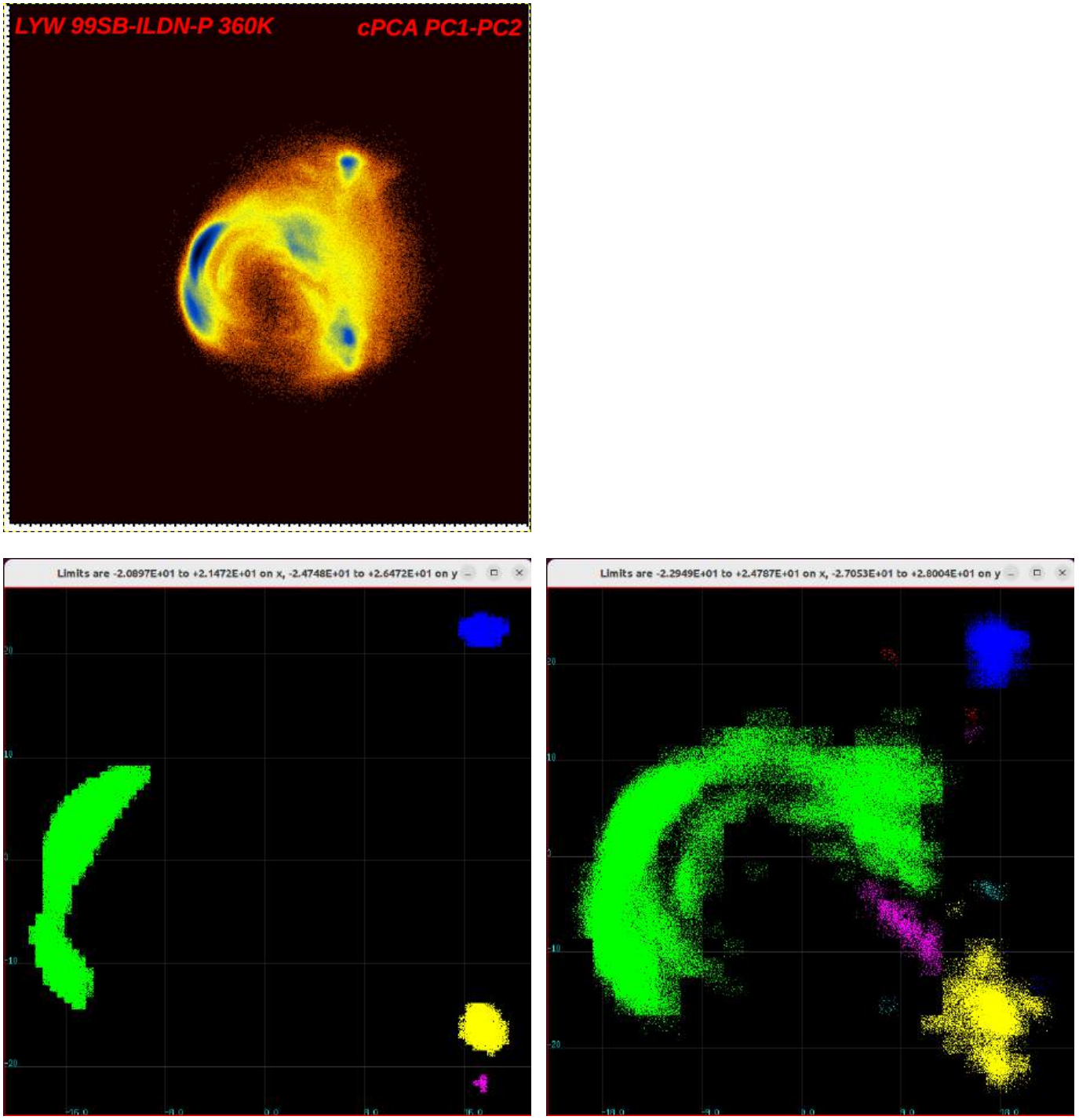
Επιστρέφοντας πίσω στα clusters 2 και 1 αξίζει να σχολιάσουμε την παντελή έλλειψη δευτεροταγής δομής που παρουσιάζει το cluster 1. Εξετάζοντας λίγο πιο προσεκτικά τις δύο αυτές διαμορφώσεις κάνουμε μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση, όταν ευθυγραμμίζουμε τα κατάλοιπα τα οποία θα έπρεπε να αποτελούν τον πρώτο και δεύτερο β-κλώνος (κατάλοιπα 1-16), τότε τα κατάλοιπα του τρίτου κλώνου (κατάλοιπα 17-23) δεν ευθυγραμμίζονται. Ίσως αυτό παίζει κάποιο ρόλο στην μορφή του cluster 1.



Εικόνα 3.28: Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των δύο πρώτων clusters με διαφορετικά χρωματισμένα τα κατάλοιπα των τρίτων κλώνων, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Στην Εικόνα 3.28 τα κατάλοιπα 17-23 της γαλάζιας διαμόρφωσης έχουν σημανθεί ως μπλε και τα αντίστοιχα κατάλοιπα της μωβ διαμόρφωσης έχουν σημανθεί ως κόκκινα. Έτσι γίνεται πιο αντιληπτή η διαφορά του τρίτου κλώνου μεταξύ των δύο διαμορφώσεων. Ωστόσο όσο και αν μας φαίνονται οι δομές παρόμοιες θα πρέπει να κάνουμε και μια ποσοτική σύγκριση για να δούμε κατά πόσο όντως μοιάζουνε. Αυτή η σύγκριση θα γίνει μετά στην ανάλυση της υπέρθεσης.

Τώρα περνάμε στο πεπτίδιο **LYW** στο δυναμικό πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K** και στην **cPCA** ανάλυση.



Εικόνα 3.29: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.

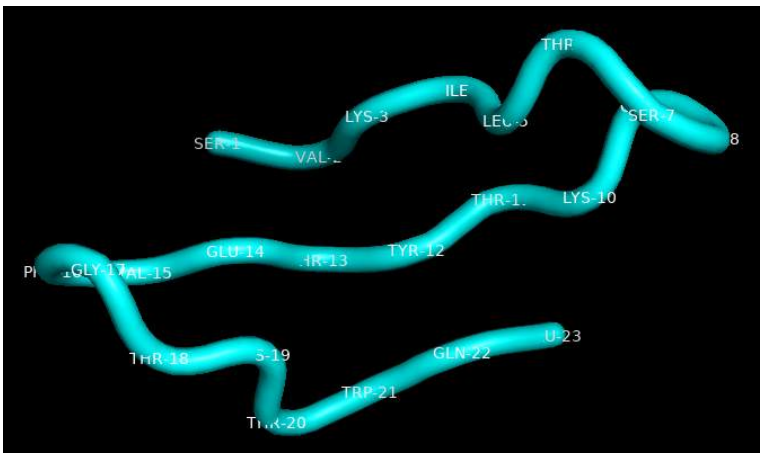
Στις παραπάνω εικόνες παρατηρούμε τρεις χαρακτηριστικές σκούρες μπλε περιοχές με την αριστερά μάλιστα να φαίνεται ότι χωρίζεται σε δύο κομμάτια, αλλά τα plots ομαδοποιούν αυτά τα κομμάτια σαν ένα cluster (Εικόνα 3.29). Περιμένουμε άρα να δούμε τρία επικρατή cluster με το πράσινο να έχει πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από τα άλλα δύο. Γενικά για το πεπτίδιο θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα τρία αυτά βασικά cluster «επικοινωνούν» με συγκεκριμένο τρόπο, καθώς βλέπουμε ότι οι κίτρινες περιοχές ενώνουν πιο πολύ το πράσινο με το κίτρινο cluster.

Σε αυτή την περίπτωση η προσομοίωση μελέτησε συνολικά 1000001 διαμορφώσεις και ανέθεσε 324.262 από αυτές σε δέκα clusters, με τα ποσοστά να φαίνονται παρακάτω.

Αριθμός cluster	Ανατεθειμένες διαμορφώσεις	Ποσοστό από τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις (324.262)	Ποσοστό από τις συνολικές διαμορφώσεις (1.000.001)
1	287.594	~88,69%	~28,76%
2	20.766	~6,4%	~2,08%
3	15.488	~4,78%	~1,55%
4	414	~0,13%	~0,04%

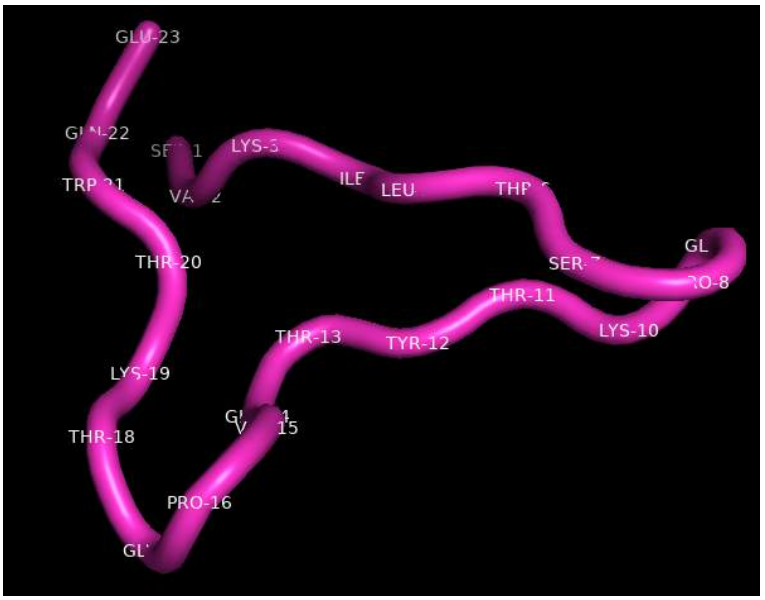
Πίνακας 3.5: Πίνακας με τον αριθμό του εκάστοτε cluster, τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις του, το ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων και το ποσοστό των συνολικών διαμορφώσεων που περιέχει το αντίστοιχο cluster. Οι πληροφορίες των ανατεθειμένων διαμορφώσεων προήλθαν από το Grcarma.

Διαμόρφωση 1η (“cPCA.representative.cluster_01.pdb”)



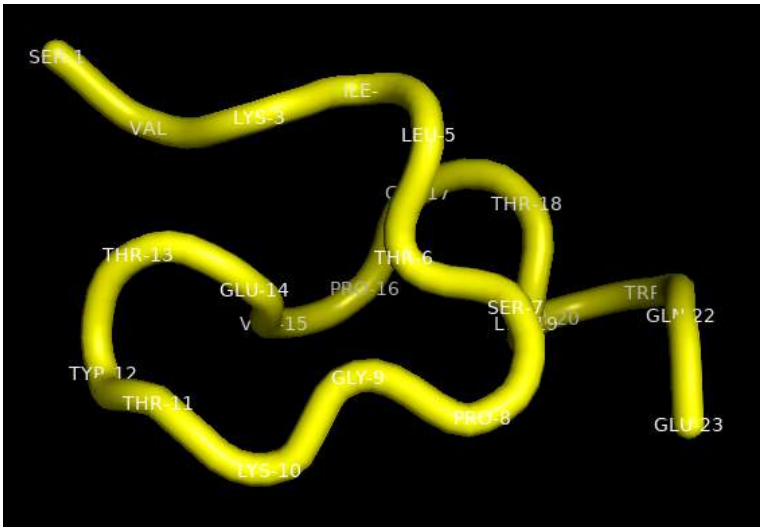
Εικόνα 3.30: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 1, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 2η (“cPCA.representative.cluster_02.pdb”)



Εικόνα 3.31: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 2, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 3η (“cPCA.representative.cluster_03.pdb”)

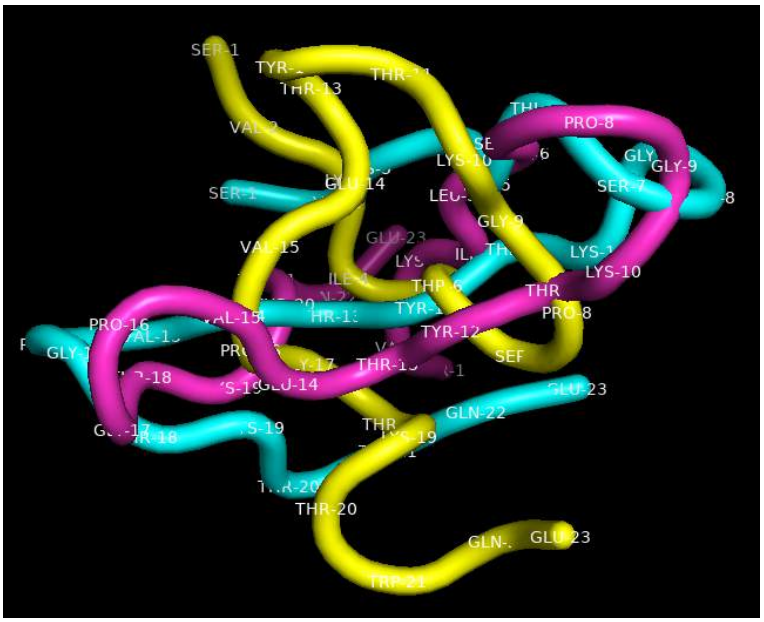


Εικόνα 3.32: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 3, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Βλέπουμε ότι όντως τελικά εμφανίζονται τρία clusters (το τέταρτο έχει πολύ μικρό ποσοστό) και μάλιστα ένα cluster έχει πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από τα υπόλοιπα.

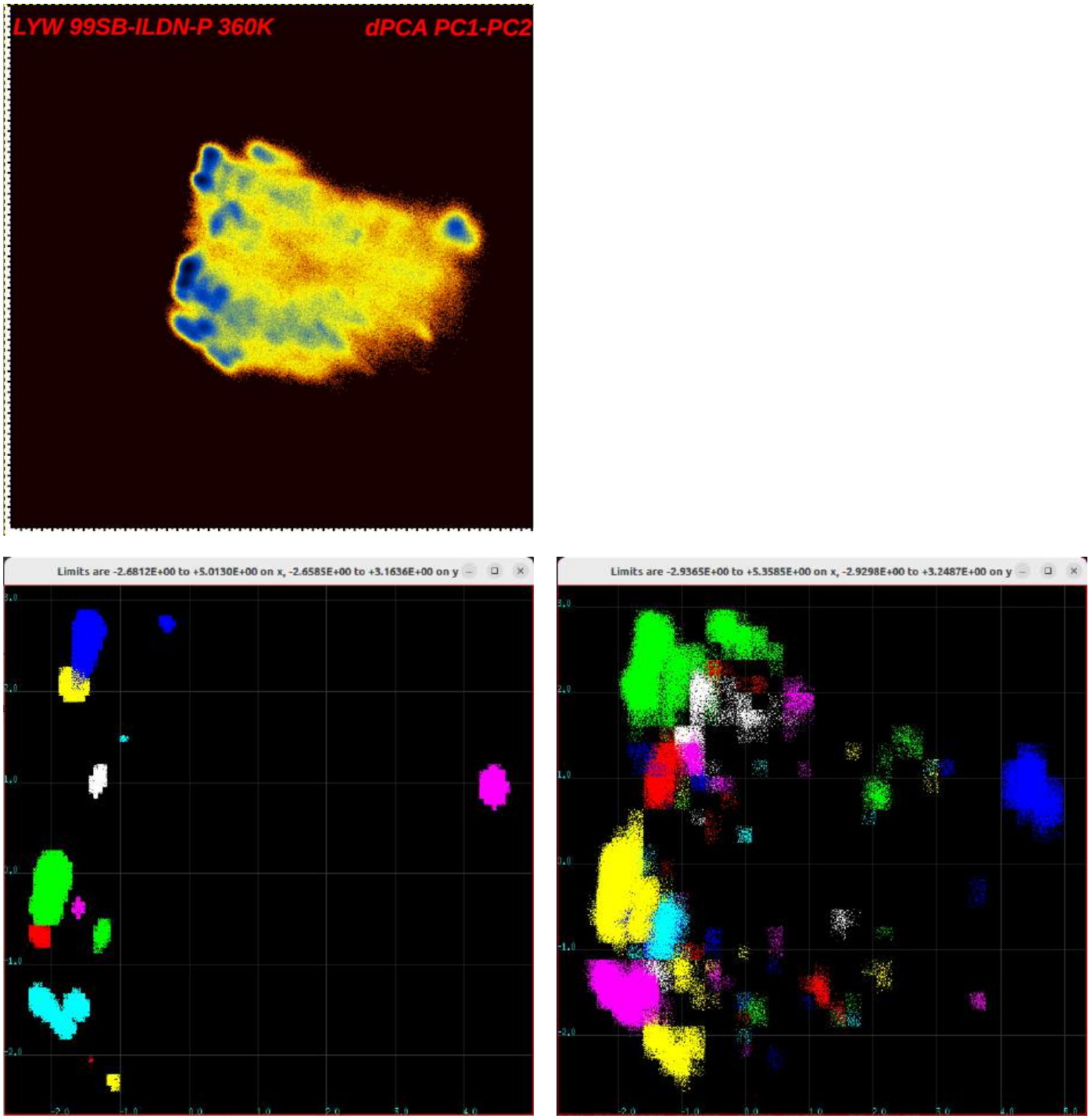
Από τα τρία αυτά clusters μόνο το πρώτο (cluster 1)(Εικόνα 3.30) έχει διαμόρφωση που ταιριάζει οπτικά με αυτήν που θα περιμέναμε, ενώ τα άλλα δύο υιοθέτησαν μια αρκετά διαφορετική διαμόρφωση. Και όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα

3.33) οι τρεις αυτές αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις δεν φαίνεται να έχουν καμία ευθυγράμμιση.



Εικόνα 3.33: Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των τριών πρώτων clusters, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Ας δούμε τώρα την **dPCA** ανάλυση του πεπτιδίου **LYW** στο δυναμικό πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K**



Εικόνα 3.34: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.

Στις εικόνες παρατηρούμε πολλά μπλε και τρία ξεκάθαρα σκούρα μπλε σημεία στην μια πλευρά του landscape (Εικόνα 3.34 (α)). Τα plots δείχνουν ότι το κίτρινο και το μπλε cluster είναι κοντά το ένα με το άλλο, επομένως μπορούμε να υποθέσουμε ότι θα

εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερες ομοιότητες μεταξύ τους απ'ότι με το πράσινο cluster (Εικόνες 3.34 (β) και (γ)).

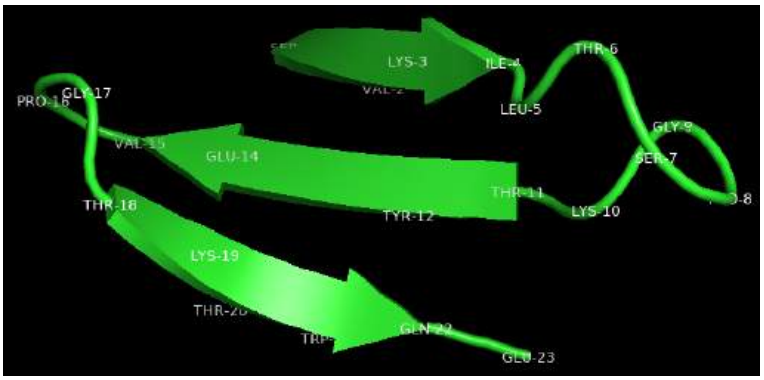
Σε αυτή την περίπτωση η προσομοίωση μελέτησε συνολικά 1000001 διαμορφώσεις και ανέθεσε 162.307 από αυτές σε δέκα clusters, με τα ποσοστά να φαίνονται παρακάτω.

Αριθμός cluster	Ανατεθειμένες διαμορφώσεις	Ποσοστό από τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις (162.307)	Ποσοστό από τις συνολικές διαμορφώσεις (1.000.001)
1	65.542	~40,38 %	~6,55%
3	32.253	~19,87 %	~3,23%
5	23.514	~14,49 %	~2,35%
2	18.471	~11,38 %	~1,85%
4	10.418	~6,42 %	~1,04%
6	4.269	~2,63 %	~0,43%
7	3.125	~1,93 %	~0,31%
8	2.369	~1,46 %	~0,24%
10	1.195	~0,74 %	~0,12%
9	1.151	~0,71 %	~0,12%

Πίνακας 3.6: Πίνακας με τον αριθμό του εκάστοτε cluster, τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις του, το ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων και το ποσοστό των συνολικών διαμορφώσεων που περιέχει το αντίστοιχο cluster. Οι πληροφορίες των ανατεθειμένων διαμορφώσεων προήλθαν από το Grcarma.

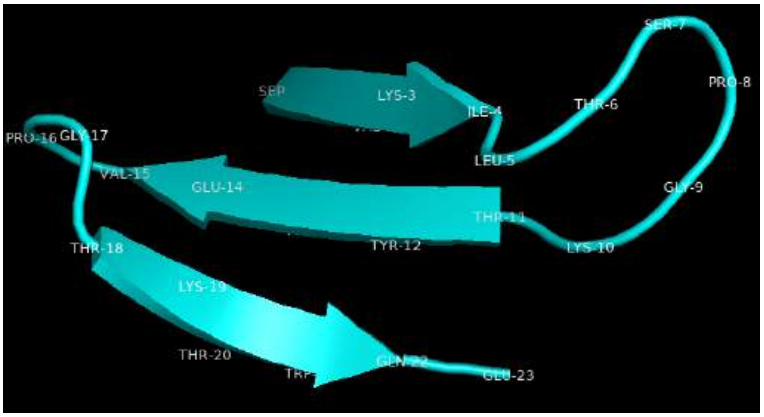
Παρατηρούμε ότι το cluster 1 εμφανίζεται σε σχεδόν διπλάσιο ποσοστό από το δεύτερο σε σειρά cluster (cluster 3). Τα τέσσερα πρώτα clusters, τα οποία παρουσιάζονται και πιο συχνά είναι τα εξής:

Διαμόρφωση 1η (“dPCA.representative.cluster_01.pdb”)



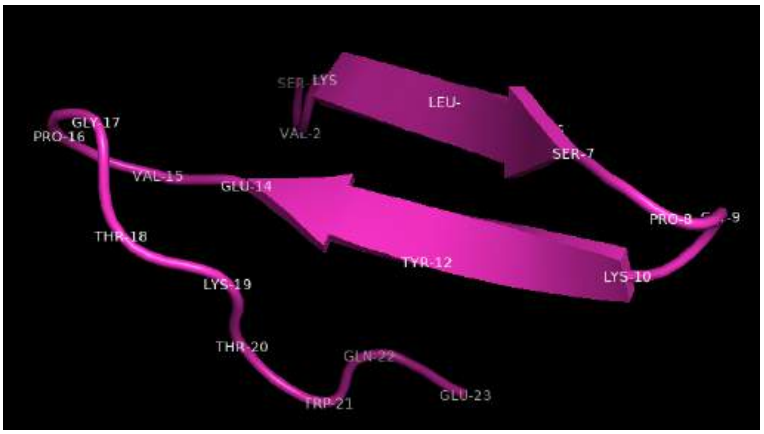
Εικόνα 3.35: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 1, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 2η (“dPCA.representative.cluster_03.pdb”)



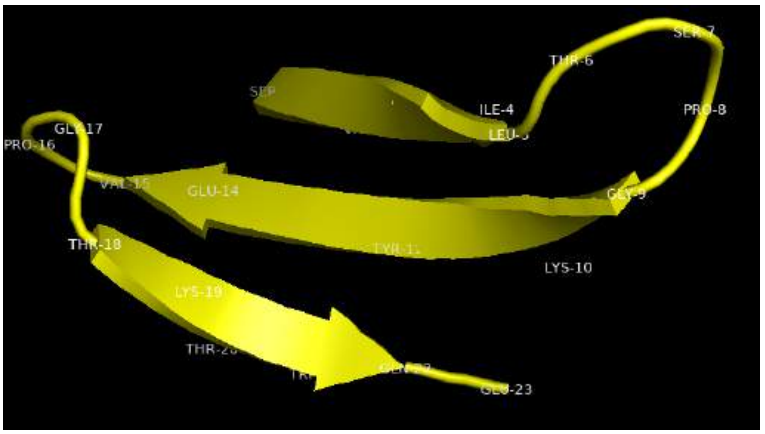
Εικόνα 3.36: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 3, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 3η (“dPCA.representative.cluster_05.pdb”)



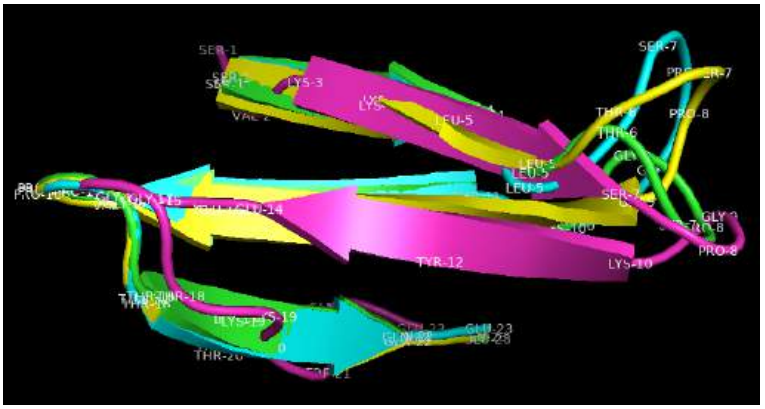
Εικόνα 3.37: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 5, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Διαμόρφωση 4η (“dPCA.representative.cluster_02.pdb”)



Εικόνα 3.38: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 2, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Και παρατηρούμε στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.39), ότι όλες οι διαμορφώσεις έχουν μια σχετική ευθυγράμμιση, χωρίς αυτή να είναι τέλεια σε καμία περίπτωση.

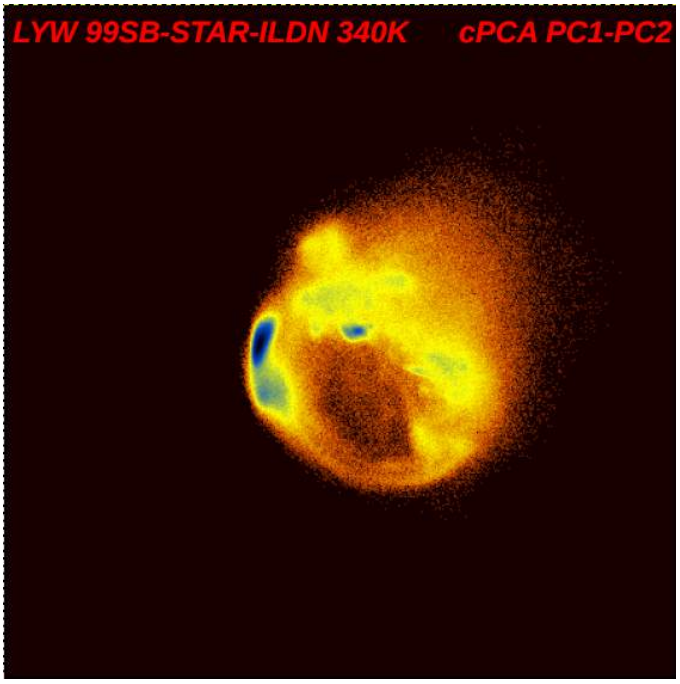


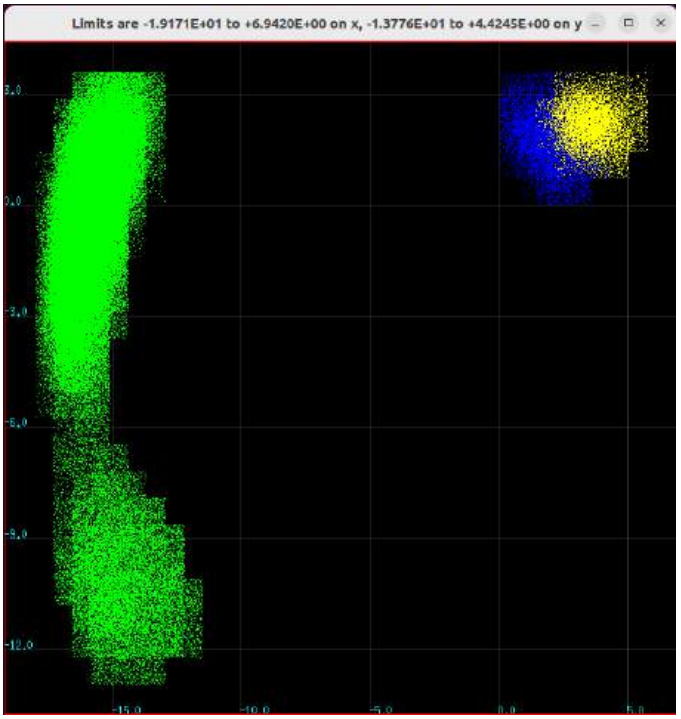
Εικόνα 3.39: Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των τεσσάρων πρώτων clusters, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

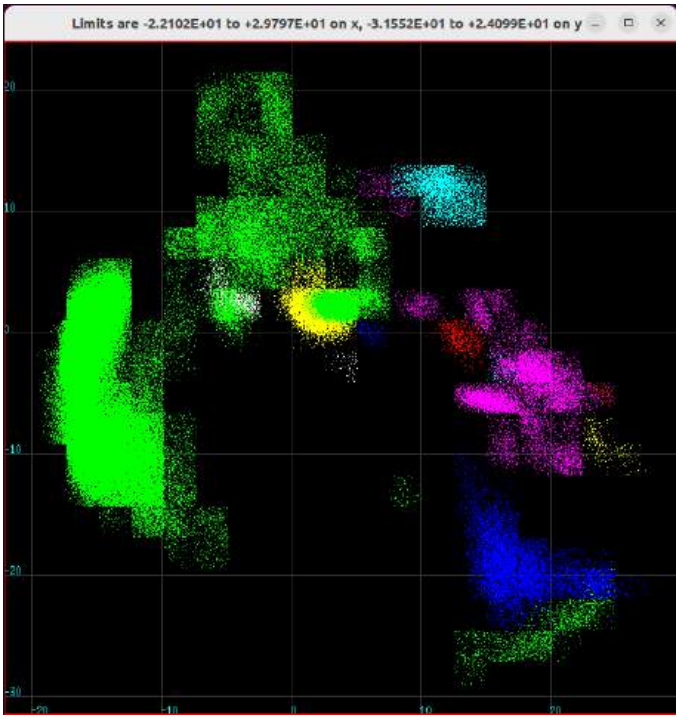
Συνολικά από τις παραπάνω εικόνες μπορούμε να πούμε ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο στο συγκεκριμένο πεδίο υιοθετεί σε ένα μεγάλο μέρος της προσομοίωσης δομές σταθερού τρίκλωνου β-φύλλου, κάτι που δεν φάνηκε στην cPCA ανάλυση. Αν και το cluster 1 εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων, παρατηρούμε ότι και οι επόμενες τρεις διαμορφώσεις που υιοθετεί εμφανίζουν σχετικά παρόμοιες δομές, με την μια από αυτές ωστόσο να μην εμφανίζει τρίτο β-κλώνο (cluster 5)(Εικόνα 3.37).

Τελειώνοντας λοιπόν με την PCA ανάλυση, έμεινε να δούμε το **LYW** πεπτίδιο στο πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K**.

Ξεκινάμε με την **cPCA** ανάλυση.







Εικόνα 3.40: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.

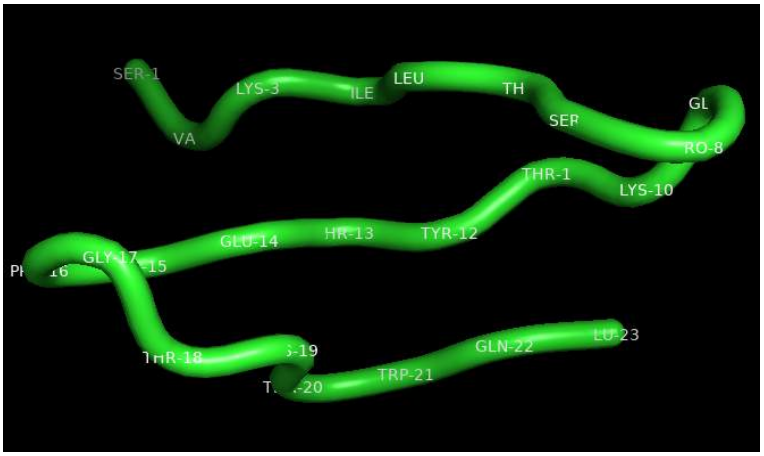
Εδώ πέρα βλέπουμε μόνο μια σκούρη μπλε περιοχή και δύο (αν θέλουμε να είμαστε επιεικής) μπλε περιοχές (Εικόνα 3.40 (α)). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι το πεπτίδιο υιοθετεί κατά την διάρκεια της προσομοίωσης διαμορφώσεις που ανατέθηκαν στην σκούρη μπλε περιοχή, ενω η άλλη μπλε περιοχή αποτελείται από διαμορφώσεις με χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια.

Η προσομοίωση εδώ μελέτησε 800.001 διαμορφώσεις και ανέθεσε 248.776 από αυτές σε τρία clusters και με τις εξής συχνότητες.

Αριθμός cluster	Ανατεθειμένες διαμορφώσεις	Ποσοστό από τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις (248.776)	Ποσοστό από τις συνολικές διαμορφώσεις (800.001)
1	230.304	~92,57%	~28,79%
2	9.236	~3,71%	~1,15%
3	9.236	~3,71%	~1,15%

Πίνακας 3.7: Πίνακας με τον αριθμό του εκάστοτε cluster, τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις του, το ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων και το ποσοστό των συνολικών διαμορφώσεων που περιέχει το αντίστοιχο cluster. Οι πληροφορίες των ανατεθειμένων διαμορφώσεων προήλθαν από το Grcarma.

Διαμόρφωση 1η (“cPCA.representative.cluster_01.pdb”)

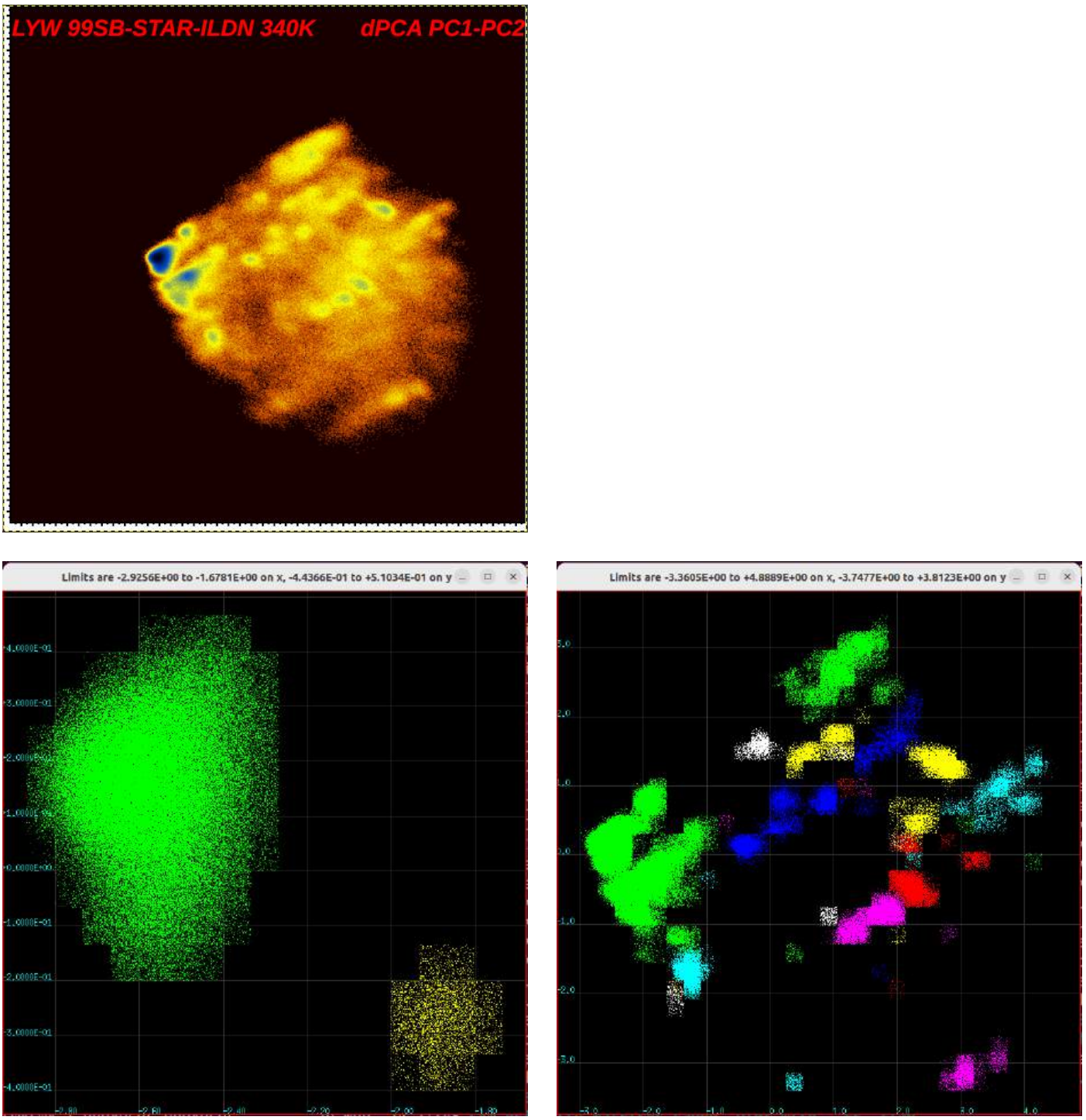


Εικόνα 3.41: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 1, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

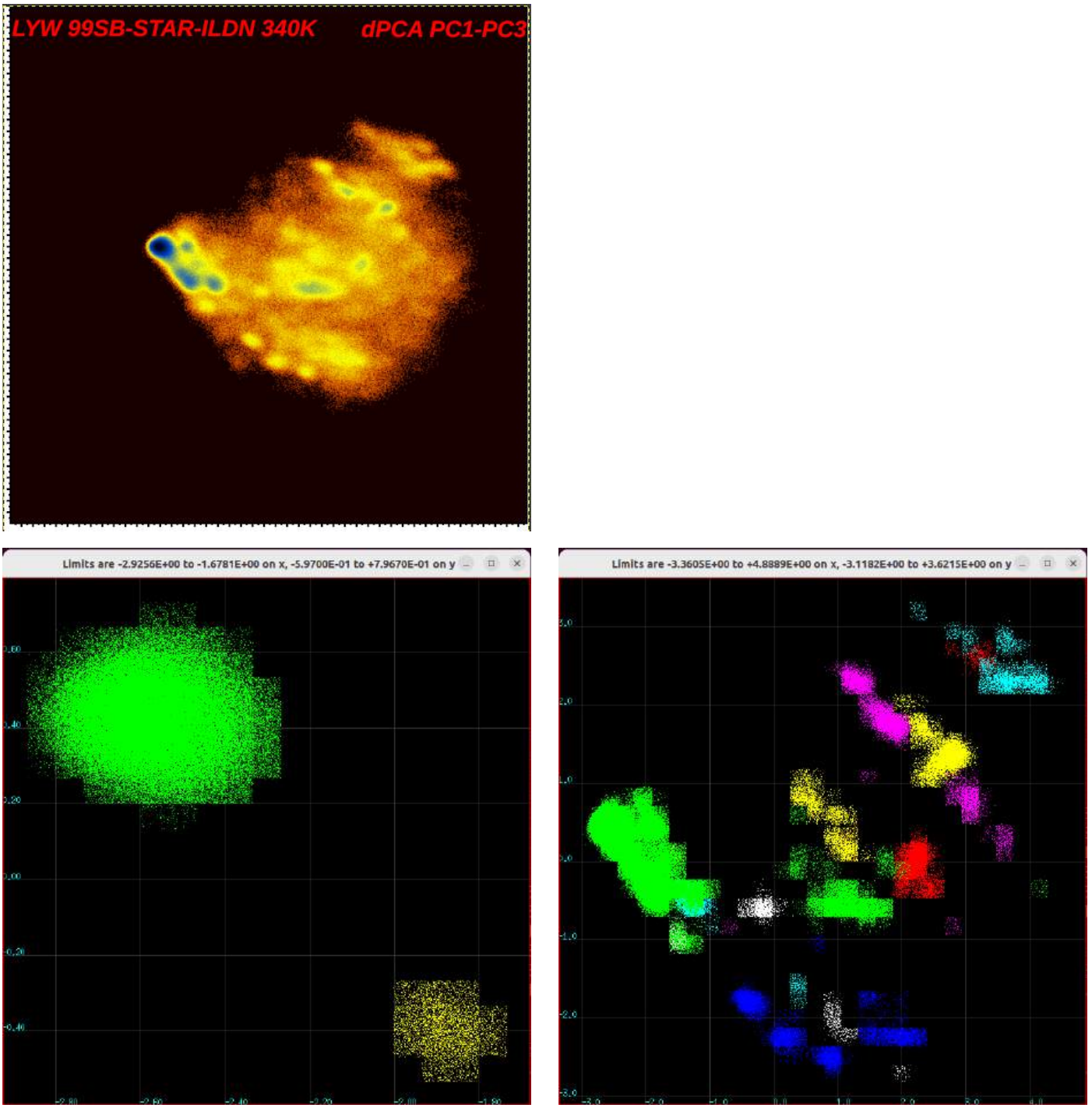
Η διαμόρφωση του cluster 1 είναι και αυτή που εμφανίζεται σε τεράστιο ποσοστό σε σχέση με τις άλλες δύο και αντιστοιχεί πιθανότατα στην σκούρη μπλε περιοχή του free energy landscape. Βλέπουμε ότι η διαμόρφωση αυτή έχει παρόμοια μορφή με αυτή που

θα περιμέναμε (Εικόνα 3.41), ενώ οι μορφές των άλλων δύο clusters δεν εμφανίζουν πολλές ομοιότητες. (Στο παρακάτω κομμάτι της υπέρθεσης οι διαφορές των τριών cluster γίνονται αντιληπτές και οπτικά και ποσοτικά).

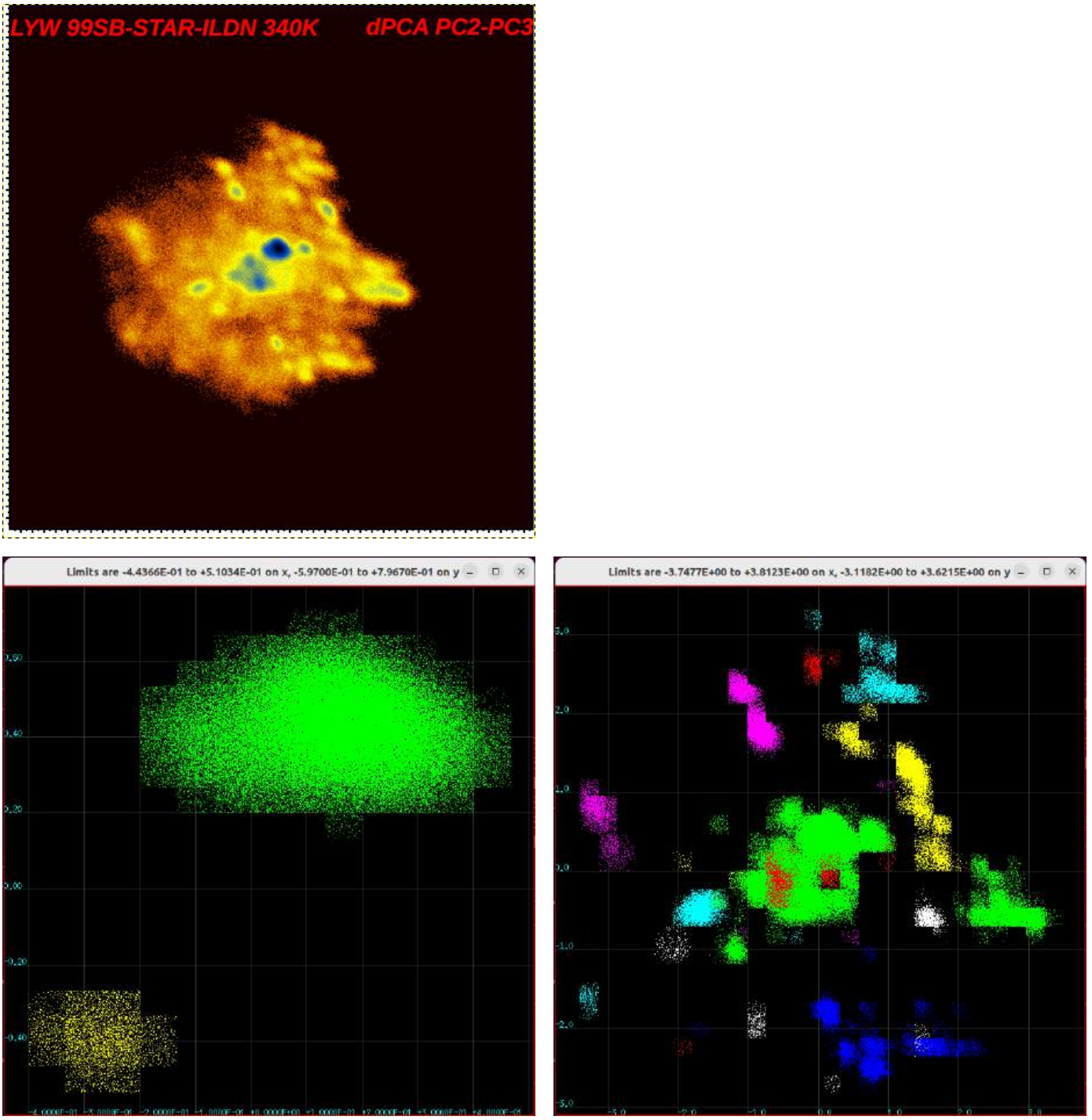
Τελευταία PCA ανάλυση είναι η **dPCA** του πεπτιδίου **LYW** στο πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K.**



Εικόνα 3.42: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.



Εικόνα 3.43: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.



Εικόνα 3.44: Η αριστερά πάνω εικόνα είναι (α) το free energy landscape που δημιουργήθηκε από το grcarma, (β) η αριστερά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 2D και (γ) η δεξιά κάτω εικόνα είναι ένα cluster plot 5D.

Βλέπουμε ότι δημιουργούνται δύο ξεχωριστά clusters με το ένα ωστόσο να είναι ξεκάθαρα σκούρο μπλε, ενώ το δεύτερο ίσα ίσα φαίνεται ότι είναι μπλε (Εικόνα 3.44 (α)). Θα μπορούσαμε επίσης να πούμε ότι ίσως και εδώ πέρα έχουμε μια περίπτωση folding funnel καθώς οι μπλε περιοχές βρίσκονται στο αριστερό τμήμα του πρώτου free energy landscape (Εικόνα 3.42 (α)). Ωστόσο βλέπουμε ότι η υπόλοιπη περιοχή δεν είναι

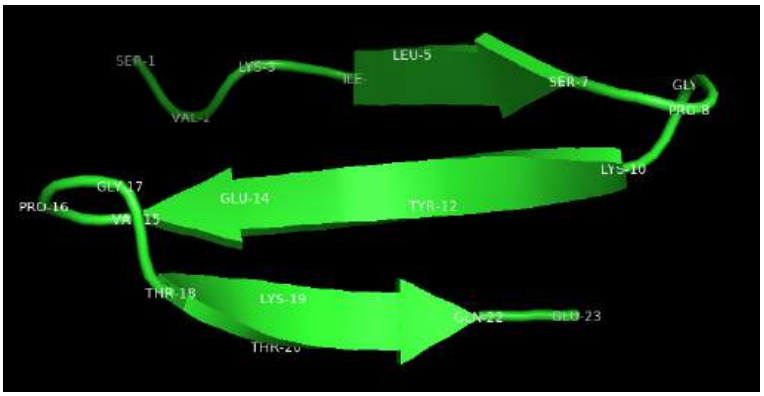
ομοιόμορφα κίτρινη και μάλιστα υπάρχουν περιοχές που φαίνεται ελάχιστα το μπλε χρώμα. Όπως είπαμε και προηγουμένως όμως, το folding funnel είναι απλά μια υπόθεση η οποία χρειάζεται και άλλα δεδομένα για να υποστηρικτεί.

Η προσομοίωση εδώ μελέτησε 800.001 διαμορφώσεις και ανέθεσε 170.808 από αυτές σε μόλις δύο clusters και με τις εξής συχνότητες.

Αριθμός cluster	Ανατεθειμένες διαμορφώσεις	Ποσοστό από τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις (170.808)	Ποσοστό από τις συνολικές διαμορφώσεις (800.001)
1	165.074	~96,64%	~20,63%
2	5.734	~3,36%	~0,72%

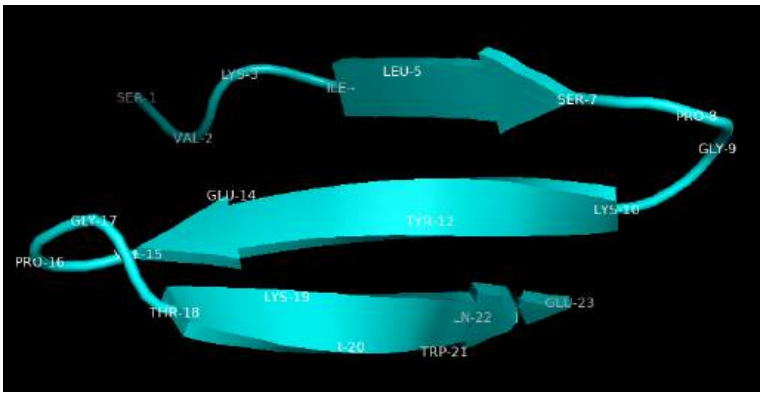
Πίνακας 3.8: Πίνακας με τον αριθμό του εκάστοτε cluster, τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις του, το ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων και το ποσοστό των συνολικών διαμορφώσεων που περιέχει το αντίστοιχο cluster. Οι πληροφορίες των ανατεθειμένων διαμορφώσεων προήλθαν από το Grcarma.

Διαμόρφωση 1η (“dPCA.representative.cluster_01.pdb”)



Εικόνα 3.45: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 1, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

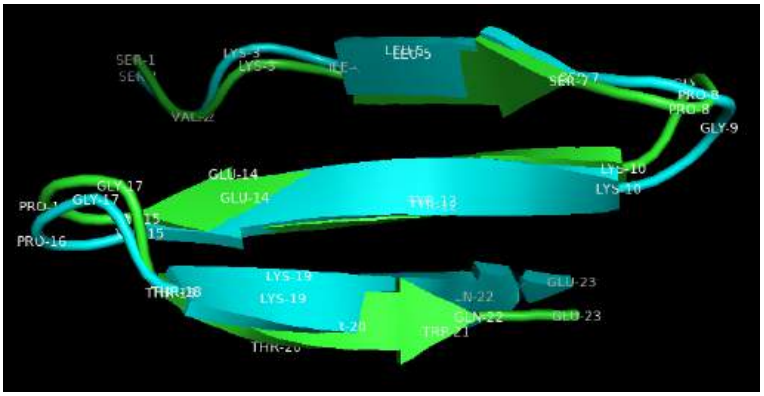
Διαμόρφωση 2η (“dPCA.representative.cluster_02.pdb”)



Εικόνα 3.46: Η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του cluster 2, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

Είναι εμφανές από τις παραπάνω συχνότητες ότι το cluster 1 αντιπροσωπεύει σχεδόν όλες τις διαμορφώσεις που το grcarma αντιστοίχισε σε clusters (~96,64%). Το πεπτίδιο υιοθετεί κυρίως δύο σταθερές δομές, ενώ έχει περάσει και από πολλές δομές υψηλότερης ενέργειας.

Και στις δύο αντιπροσοπευτικές διαμορφώσεις των clusters βλέπουμε το πεπτίδιο να υιοθετεί μια δομή τρίκλωνου β-φύλλου (Εικόνες 3.45 και 3.46). Μάλιστα οι δύο αυτές δομές μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους και αυτό γίνεται ακόμα πιο αντιληπτό στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.47), όπου οι δύο αυτές διαμορφώσεις ευθυγραμμίζονται αρκετά καλά.



Εικόνα 3.47: Οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις των δύο clusters, όπως προέκυψε από το Grcarma και προβλήθηκε στο πρόγραμμα Pymol.

3.5 Λίγα λόγια για την υπέρθεση (superposition)

Η τελευταία ανάλυση που αποφασίσαμε να τρέξουμε πριν εξάγουμε τα συμπεράσματά μας είναι η υπέρθεση των δομών που έχουν προκύψει από τα πειράματα με τις δομές των προσομοιώσεων. Πιο συγκεκριμένα έχουμε συγκρίνει τις δομές

χαμηλότερης ενέργειας που προέκυψαν από τα πειράματα NMR [4], με τις αντιπροσωπευτικές δομές των cluster που αναφέραμε (και από τις δύο αναλύσεις PCA). Ο λόγος που αποφασίσαμε να κάνουμε και αυτήν την ανάλυση είναι γιατί μας επιτρέπει να δούμε οπτικά τις ομοιότητες ανάμεσα στις δομές που συγκρίνουμε. Επιπλέον μας προσφέρει ένα ποσοτικό μέτρο σύγκρισης, μέσω της τιμής RMSD. Έτσι λοιπόν μπορούμε να κάνουμε οπτική και ποσοτική σύγκριση των πεπτιδίων και μάλιστα μπορούμε να παρατηρήσουμε μοτίβα/δομές τα οποία παραμένουν σταθερά και άλλα τα οποία αποκλίνουν. Η τιμή RMSD είναι ένα μέτρο της ομοιότητας της πειραματικής δομής με αυτές των προσομοιώσεων, όσο πιο χαμηλή είναι αυτή η τιμή ανάμεσα σε δύο δομές, τόσο μεγαλύτερη και η ομοιότητα αυτων των δομών.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των δομών ήταν το Pymol [15]. Χρησιμοποιήθηκαν οι αντιπροσωπευτικές δομές που έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα και για πειραματική δομή χρησιμοποιήθηκε αυτή με την χαμηλότερη ενέργεια. Για να ευθυγραμμιστούν τα πεπτίδια χρησιμοποιήθηκε η εντολή align της Pymol, όπου η μόνη παράμετρος που πειράχτηκε είναι η cutoff. Η εντολή έχει την εξής μορφή: *align mobile, target [, cutoff [, cycles [, gap [, extend [, max_gap [, object [, matrix [, mobile_state [, target_state [, quiet [, max_skip [, transform [, reset]]]]]]]]]]]]* , όπου στην θέση mobile βάλαμε την εκάστοτε διαμόρφωση που προέκυψε από τις PCA και στην θέση target βάλαμε την δομή που προέκυψε από τα πειράματα NMR.

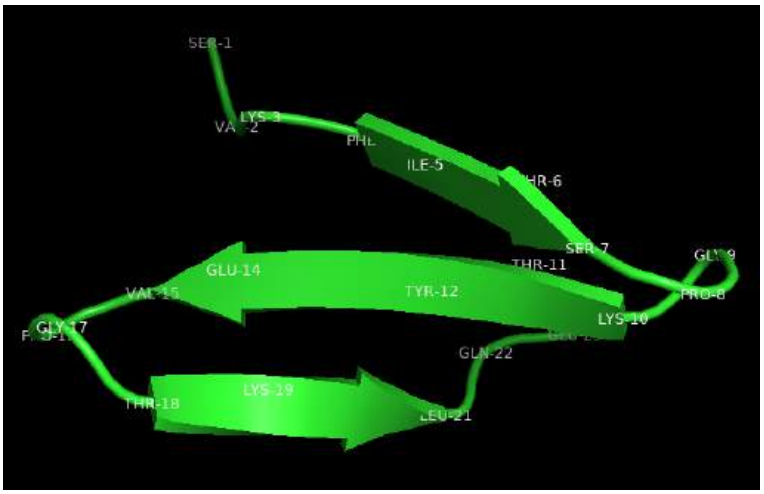
Με λίγα λόγια το πρόγραμμα ελέγχει την ομοιότητα των αλληλουχιών των δύο πεπτιδίων και έπειτα δημιουργεί ζευγάρια ατόμων του ενός πεπτιδίου που ταιριάζει στην αλληλουχία και στον χώρο με το άλλο. Σαν τελευταίο βήμα η Pymol κάνει ελέγχους ομοιότητας των ζευγαριών μεταξύ τους (καθορίζεται από το cycles) και απορρίπτει ζευγάρια των οποίων τα άτομα έχουν μεγαλύτερη απόσταση από την θεμιτή (καθορίζεται από το cutoff). Το cutoff που είπαμε επηρεάζει αυτά τα ζευγάρια, καθώς αν ένα άτομο έχει απόσταση από το ζευγάρι του μεγαλύτερη από την τιμή του cutoff τότε η Pymol θα απορρίψει αυτό το ζευγάρι ατόμων. Πιο συγκεκριμένα μάλιστα η εντολή απορρίπτει άτομα τα οποία έχουν απόσταση μεγαλύτερη από 2 Å (default cutoff = 2). Για να είμαστε όσο πιο αντικειμενικοί γίνεται θα παρουσιάσουμε τις ίδιες συγκρίσεις και χωρίς αυτές τις απορρίψεις. Αυτό το πετυχαίνουμε ρυθμίζοντας το cutoff = 100, έτσι ώστε όλα τα άτομα της κάθε δομής να συμπεριλαμβάνονται στον υπολογισμό της RMSD τιμής, καθώς κανένα άτομο δεν θα έχει τόση μεγάλη απόσταση από το ζευγάρι του (απόσταση 100 Å). Το ίδιο αποτέλεσμα θα μπορούσαμε να έχουμε και ρυθμίζοντας cycles = 0, το οποίο θα σταματήσει την εντολή align από το να κάνει την σύγκριση των αποστάσεων που κάνει η cutoff. Στο τέλος θα αναφέρουμε τις τιμές RMSD και πόσα άτομα συμπεριλήφθηκαν στον υπολογισμό, τόσο για cutoff = 2.0 (default cutoff), όσο και για cutoff = 100. Όπως και πριν έτσι και σε αυτήν την ανάλυση

θα έχουμε πρώτα τις εικόνες από τις διαμορφώσεις της cPCA ανάλυσης και έπειτα της dPCA. Πριν προχωρήσουμε στις εικόνες θα ήθελα να ξεκαθαρίσω ότι στις αναλύσεις cPCA η Pymol χρησιμοποίησε συνολικά 23 άτομα, τα οποία είναι οι κεντρικοί άνθρακες από το κάθε αμινοξύ, επομένως στα RMSD αποτελέσματα όταν έχουν χρησιμοποιηθεί και οι 23 άνθρακες θα αναφέρω το αποτέλεσμα ως Ca RMSD. Στην ανάλυση dPCA ωστόσο, το πρόγραμμα χρησιμοποίησε 92 άτομα συνολικά, τα οποία αντιστοιχούν σε 4 κύρια άτομα για κάθε αμινοξύ (N, Ca, C και O). Σε αυτήν την περίπτωση θα αναφέρω αυτήν την τιμή ως backbone RMSD. Για να μπορέσουμε να κάνουμε μια σύγκριση ανάμεσα στις δομές που προέκυψαν από τις cPCA και dPCA αναλύσεις, θα υπολογίσουμε και την τιμή RMSD τον διαμορφώσεων που προήλθαν από την dPCA ανάλυση λαμβάνοντας υπόψην μόνο τους 23 κεντρικούς άνθρακες (Ca RMSD). Αυτό γίνεται πρακτικά με την προσθήκη των χαρακτήρων «&n. ca» στις θέσεις mobile και target της εντολής align της Pymol.

3.6 Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης

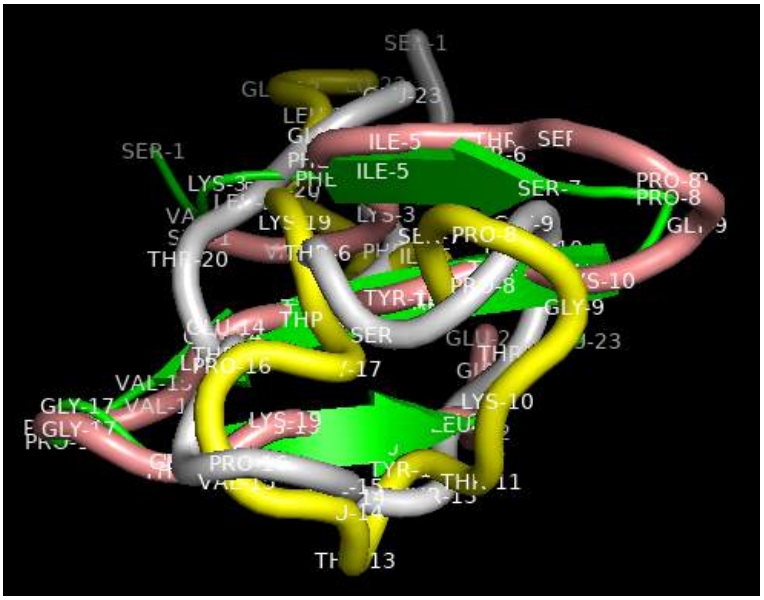
Ξεκινάμε με το πεπτίδιο **IYL** στο δυναμικό πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K**. Για την συγκεκριμένη περίπτωση έχουμε τρία αντιπροσωπευτικά πεπτίδια και το μοντέλο της διαμόρφωσης χαμηλότερης ενέργειας, όπως προέκυψε από τους υπολογισμούς NMR. Όμως για να μην γεμίσει εικόνες και βαρετά στοιχεία αυτό το κομμάτι της εργασίας θα σας παρουσιάσω την δομή NMR (αναγράφεται ως *LowE* στις εντολές), η οποία προέκυψε από πειραματικά δεδομένα, και μια εικόνα με όλες τις δομές μαζί (και την πειραματική και τις αντιπροσωπευτικές των clusters). Έπειτα θα αναφερθούν οι τιμές RMSD της κάθε δομής σε σύγκριση με την πειραματική.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.48) φαίνεται το μοντέλο της δομή όπως προέκυψε από το σύνολο της NMR για το πεπτίδιο IYL.



Εικόνα 3.48: Η πειραματική δομή που προέκυψε από το σύνολο της NMR (IYL_LowE), χρησιμοποιήθηκε χωρίς άδεια από την έρευνα του David Scheerer, Heng Chi, Dan McElheny, Ayesha Samer, Timothy A. Keiderling, Karin Hauser; Role of Aromatic Cross-Links in Structure and Dynamics of Model Three-Stranded β-Sheet Peptides.

Και ξεκινάμε με τα δεδομένα από την **cPCA**.



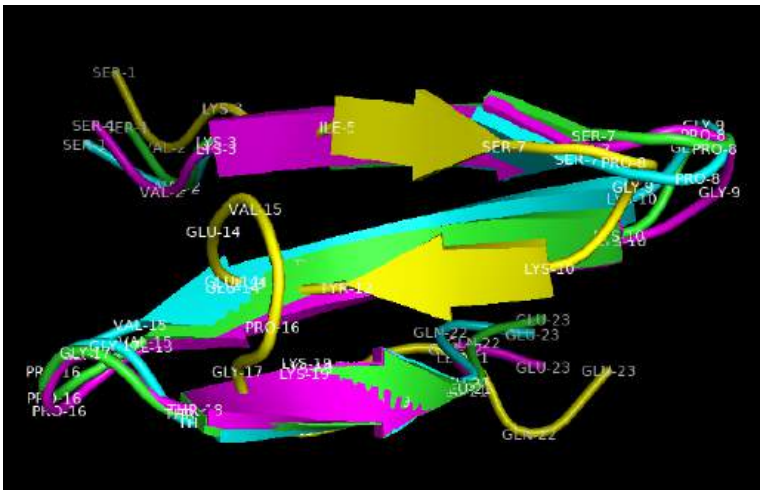
Εικόνα 3.49: Απεικονίζονται με ροζ η δομή που αντιστοιχεί στο cluster 2, με κίτρινο στο cluster 1 και με γκρι στο cluster 3. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

Παρακάτω βρίσκονται και οι τιμές RMSD των παραπάνω αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων σε σύγκριση με την δομή NMR:

- cluster 2 - LowE
  - RMSD = 1,057 (18 to 18 atoms)
  - Ca RMSD = 2,276 (23 to 23 atoms)
- cluster 1 - LowE
  - RMSD = Ca RMSD = 8,712 (23 to 23 atoms)
- cluster 3 - LowE
  - RMSD = Ca RMSD = 7,820 (23 to 23 atoms)

Στην cPCA ανάλυση είδαμε ότι το cluster 2 είναι αυτό που περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό διαμορφώσεων και αυτό που φέρει περισσότερες ομοιότητες με την μορφή που θα περιμέναμε να έχει το πεπτίδιο. Αυτές οι ικασίες μας επιβεβαιώνονται καθώς το cluster 2 έχει την μικρότερη RMSD τιμή. Όσο για τα άλλα δύο clusters οι τιμές τους είναι υψηλές, επομένως μπορούμε και ποσοτικά να πούμε ότι δεν εμφανίζουν ομοιότητες με την διαμόρφωση χαμηλότερης ενέργειας.

Σειρά έχουν τα δεδομένα της **dPCA** ανάλυσης.



Εικόνα 3.50: Απεικονίζονται με κίτρινο η δομή που αντιστοιχεί στο cluster 1, με γαλάζιο στο cluster 2 και με μωβ στο cluster 3. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

Παρακάτω βρίσκονται και οι τιμές RMSD των παραπάνω αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων σε σύγκριση με την δομή NMR:

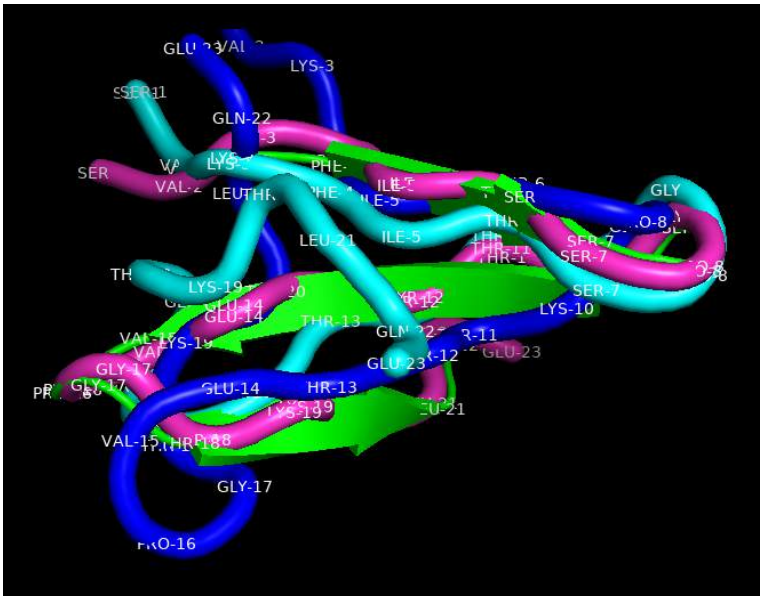
- cluster 1 - LowE
  - RMSD = 2,670 (78 to 78 atoms)
  - backbone RMSD = 4,101 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 4,236 (23 to 23 atoms)
    (align IYL_360_01 & n. ca, IYL_LowE & n. ca, cutoff=100)
- cluster 2 - LowE
  - RMSD = 0,628 (78 to 78 atoms)
  - backbone RMSD = 1,151 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 0,895 (23 to 23 atoms)
    (align IYL_360_02 & n. ca, IYL_LowE & n. ca, cutoff=100)
- cluster 3 - LowE
  - RMSD = 0,361 (72 to 72 atoms)
  - backbone RMSD = 1,052 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 0,741 (23 to 23 atoms)
    (align IYL_360_03 & n. ca, IYL_LowE & n. ca, cutoff=100)

Αρχικά παρατηρούμε ότι οπτικά οι αντιπροσωπευτικές δομές των cluster 2 και 3 «ταιριάζουν» περισσότερο στην πειραματική δομή απ'ότι αυτή του cluster 1. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από τις τιμές RMSD.

Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούμε ότι η αντιπροσωπευτική δομή του cluster που έχει το μεγαλύτερο ποσοστο ανατεθειμένων δομών δεν είναι και αυτή που εμφανίζει την μεγαλύτερη ομοιότητα ως προς την δομή NMR.

Παραμένουμε στο ίδιο πεπτίδιο, αλλά αυτή τη φορά το μελετάμε στο δυναμικό πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K**. Όπως και πριν θα δούμε μεμονωμένα τις δομές και έπειτα όλες μαζί, καθώς επίσης και τις αντίστοιχες τιμές RMSD.

Ξεκινάμε με τα δεδομένα από την **cPCA**.



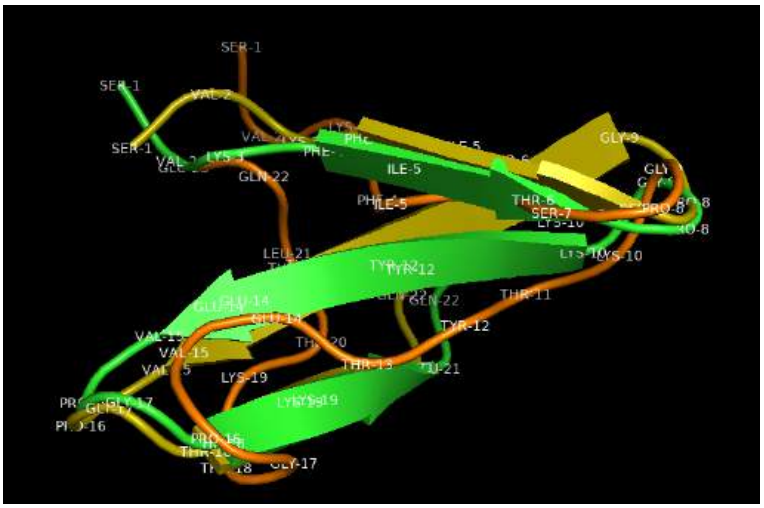
Εικόνα 3.51: Απεικονίζονται με μπλε η δομή που αντιστοιχεί στο cluster 1, με ροζ στο cluster 3 και με γαλάζιο στο cluster 2. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

Παρακάτω βρίσκονται και οι τιμές RMSD των παραπάνω αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων σε σύγκριση με την δομή NMR:

- cluster 1 - LowE
  - RMSD = 4,583 (20 to 20 atoms)
  - Ca RMSD = 6,232 (23 to 23 atoms)
- cluster 3 - LowE
  - RMSD = 0,806 (22 to 22 atoms)
  - Ca RMSD = 1,041 (23 to 23 atoms)
- cluster 2 - LowE
  - RMSD = 2,752 (18 to 18 atoms)
  - Ca RMSD = 5,781 (23 to 23 atoms)

Όπως αναφέραμε και στην cPCA ανάλυση το cluster 3 εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα με την δομή χαμηλότερης ενέργεια απ'ότι το cluster 1. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι και το cluster 2 (που έχει πολύ μικρότερο ποσοστό διαμορφώσεων απο το cluster 1) έχει και αυτό μικρότερη RMSD τιμή από το cluster 1. Όπως και προηγουμένω παρατηρούμε και σε αυτή την περίπτωση ότι η αντιπροσωπευτική δομή του cluster που περιέχει τις περισσότερες ανατεθειμένες διαμορφώσεις δεν είναι και αυτό που εμφανίζει τις περισσότερες ομοιότητες με την δομή χαμηλότερης ενέργειας, τουλάχιστον με τα επόμενα δύο στην σειρά clusters.

Περνάμε τώρα στην **dPCA** ανάλυση.



Εικόνα 3.52: Απεικονίζονται με κίτρινο η δομή που αντιστοιχεί στο cluster 2 και με πορτοκαλί στο cluster 1. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

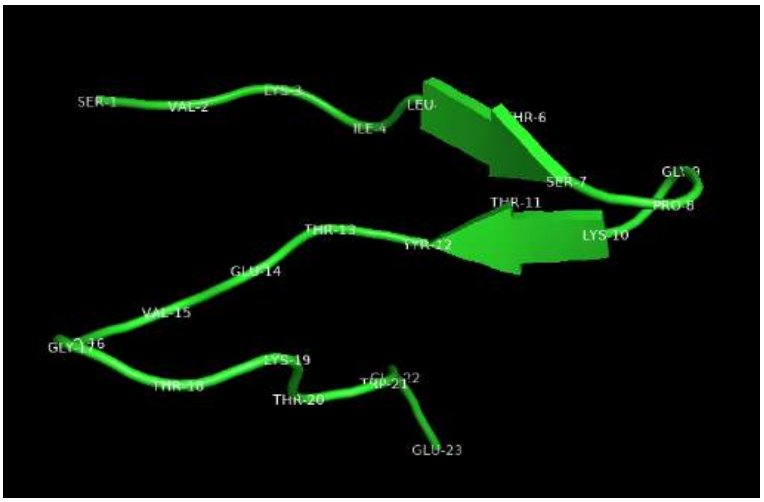
Παρακάτω βρίσκονται και οι τιμές RMSD των δύο παραπάνω αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων σε σύγκριση με την δομή NMR:

- cluster 2 - LowE
  - RMSD = 1,601 (82 to 82 atoms)
  - backbone RMSD = 2,042 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 1,998 (23 to 23 atoms)
    (align IYL_340_02 & n. ca, IYL_LowE & n. ca, cutoff=100)
- cluster 1 - LowE
  - RMSD = 3,685 (80 to 80 atoms)
  - backbone RMSD = 5,600 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 5,624 (23 to 23 atoms)
    (align IYL_340_01 & n. ca, IYL_LowE & n. ca, cutoff=100)

Εδώ παρατηρούμε ότι το cluster 2 εμφανίζει αρκετή ομοιότητα με την πειραματική δομή. Το cluster 1 έχει αρκετά υψηλότερη τιμή RMSD.

Κλείνοντας το κομμάτι της υπέρθεσης για το πεπτίδιο IYL, παρατηρούμε ότι, ανάμεσα στα δύο δυναμικά πεδία η δομή που έχει την μικρότερη τιμή Ca RMSD έχει δημιουργηθεί στο πεδίο 99SB-ILDN-P στους 360K και είναι το cluster 3 από τις δομές της dPCA ανάλυσης.

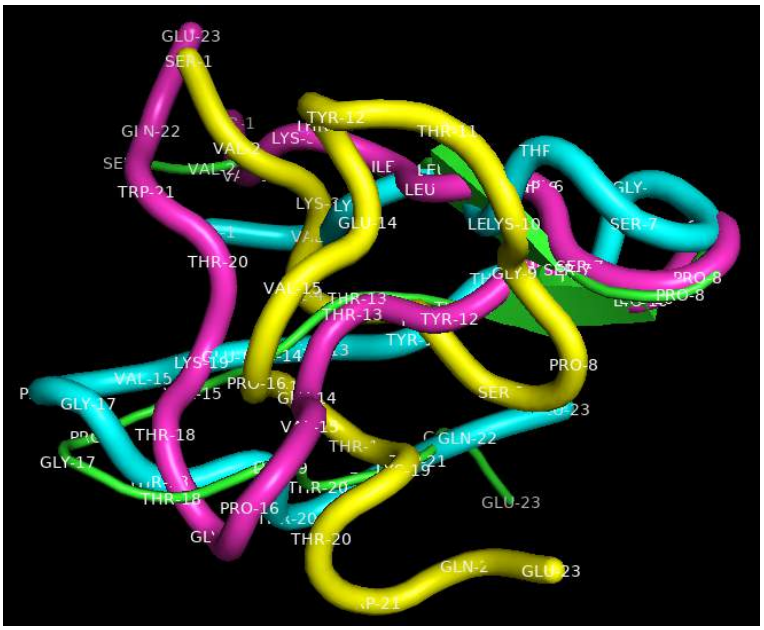
Σειρά τώρα έχει το πεπτίδιο **LYW** στο πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K** και παρακάτω φαίνεται το μοντέλο της διαμόρφωσης χαμηλότερης ενέργειας, όπως προέκυψε από τους υπολογισμούς NMR.



Εικόνα 3.53: Η πειραματική δομή που προέκυψε από το σύνολο της NMR (LYW_LowE), χρησιμοποιήθηκε χωρίς άδεια από την έρευνα του David Scheerer, Heng Chi, Dan McElheny, Ayesha Samer, Timothy A. Keiderling, Karin Hauser; Role of Aromatic Cross-Links in Structure and Dynamics of Model Three-Stranded β-Sheet Peptides.

Μια εμφανής παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε όσον αφορά την δομή που προέκυψε από την ανάλυση NMR είναι ότι το πεπτίδιο IYL δεν δημιουργεί τρίτο β-κλώνο, όπως θα περιμέναμε.

Ξεκινάμε με τα δεδομένα από την **cPCA**.



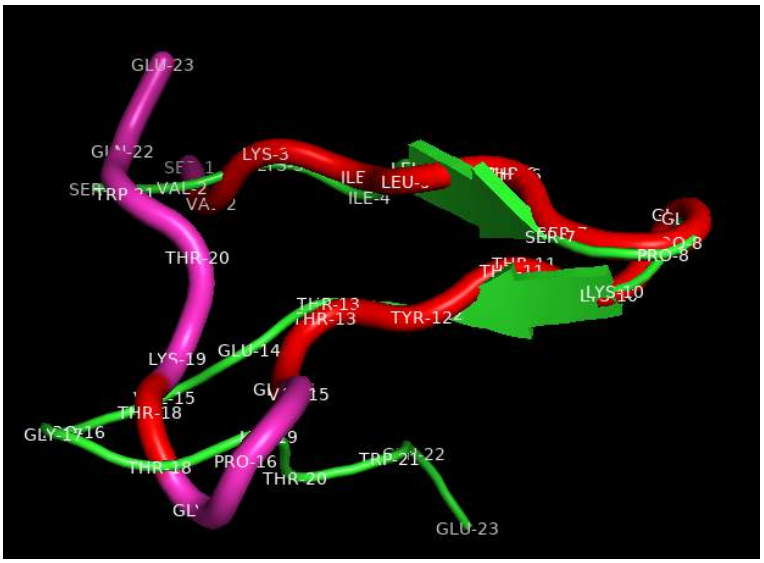
Εικόνα 3.54: Απεικονίζονται με γαλάζιο η δομή που αντιστοιχεί στο cluster 1, με μωβ στο cluster 2 και με κίτρινο στο cluster 3. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

Παρακάτω βρίσκονται και οι τιμές RMSD των παραπάνω αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων σε σύγκριση με την πειραματική δομή:

- cluster 1 - LowE
  - RMSD = Ca RMSD = 3,152 (23 to 23 atoms)
- cluster 2 - LowE
  - RMSD = 1,375 (14 to 14 atoms)
  - Ca RMSD = 6,719 (23 to 23 atoms)
- cluster 3 - LowE
  - RMSD = Ca RMSD = 6,838 (23 to 23 atoms)

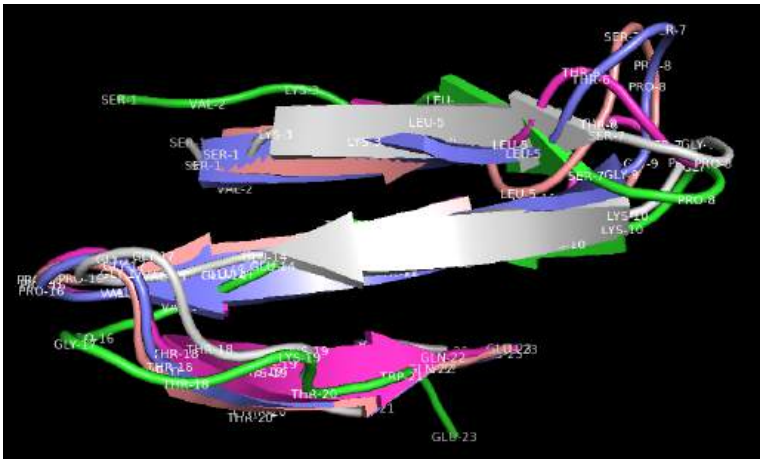
Παρατηρούμε λοιπόν ότι και ποσοτικά το cluster 1 εμφανίζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με την πειραματική δομή NMR μόνο όταν ευθυγραμμίσουμε όλους τους κεντρικούς άνθρακες του πεπτιδίου (Ca RMSD). Η Pymol επιπλέον έχει ξεχωρίσει ένα κομμάτι 14 ατόμων (14 κεντρικών ανθράκων Ca), το οποίο έχει χαμηλότερη RMSD τιμή από το cluster 1. Όσο λοιπόν αφορά αυτούς τους 14 Ca το cluster 2 εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα από το cluster 1, ωστόσο αν ελέγξουμε την συνολική εικόνα των πεπτιδίων (και τους 23 Ca που ελέγχει η Pymol) το cluster 1 εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα.

Παρακάτω (Εικόνα 3.55) φαίνονται και οι 14 Ca του cluster 2 που ξεχώρισε η pymol με κόκκινο χρώμα. Βλέπουμε ότι ευθυγραμμίζονται αρκετά καλά με την πειραματική διαμόρφωση, αλλά οι υπόλοιπα 9 Ca δεν ταυτίζονται καλά και για αυτόν τον λόγο εμφανίζει τόσο υψηλή Ca RMSD τιμή.



Εικόνα 3.55: Απεικονίζονται η αντιπροσωπευτική δομή του cluster 2 ευθυγραμμισμένη με την πειραματική δομή NMR. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

Περνάμε στα δεδομένα από την ανάλυση **dPCA** στο ίδιο δυναμικό πεδίο.



Εικόνα 3.56: Απεικονίζονται με μωβ η δομή που αντιστοιχεί στο cluster 1, με ροζ στο cluster 3, με γκρι στο cluster 5 και με μπλε στο cluster 2. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

Παρακάτω βρίσκονται και οι τιμές RMSD των τεσσάρων αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων σε σύγκριση με την δομή NMR:

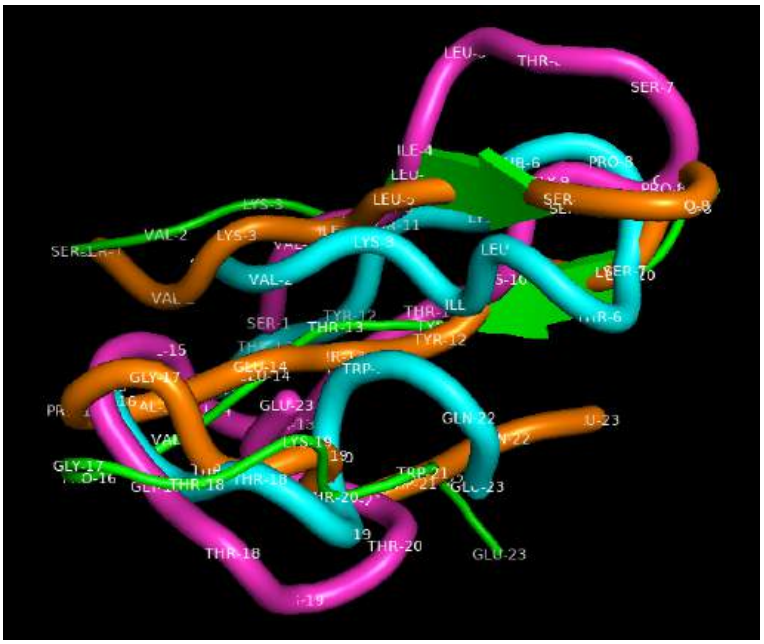
- cluster 1 - LowE
  - RMSD = backbone RMSD = 3,351 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 3,324 (23 to 23 atoms)
    (align LYW_360_01 & n. ca, LYW_LowE & n. ca, cutoff=100)
- cluster 3 - LowE
  - RMSD = backbone RMSD = 3,905 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 3,948 (23 to 23 atoms)
    (align LYW_360_03 & n. ca, LYW_LowE & n. ca, cutoff=100)
- cluster 5 - LowE
  - RMSD = 2,288 (90 to 90 atoms)
  - backbone RMSD = 2,443 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 2,387 (23 to 23 atoms)
    (align LYW_360_05 & n. ca, LYW_LowE & n. ca, cutoff=100)
- cluster 2 - LowE
  - RMSD = backbone RMSD = 3,647 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 3,670 (23 to 23 atoms)
    (align LYW_360_02 & n. ca, LYW_LowE & n. ca, cutoff=100)

Όπως είπαμε προηγουμένως το πεπτίδιο LYW στην πειραματική διαμόρφωση δεν παρουσιάζει τρίτο β-κλώνο, ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που εμφανίζεται μόνο στο cluster 5 (από τα τέσσερα πρώτα clusters).

Και σε αυτήν την περίπτωση το cluster με την μικρότερη τιμή RMSD δεν είναι αυτό με το μεγαλύτερο ποσοστό ανατεθειμένων διαμορφώσεων. Αντιθέτως το cluster 5 είναι αυτό που έχει την μικρότερη RMSD τιμή, ίσως λόγω του γεγονότος ότι δεν φέρει τρίτο β-κλώνο.

Τελειώνοντας με το κομμάτι της υπέρθεσης, έμεινε να μελετήσουμε το ίδιο πεπτίδιο (LYW) στο πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K**.

Ξεκινάμε με τα δεδομένα από την **cPCA**.



Εικόνα 3.57: Απεικονίζονται με πορτοκαλί η δομή που αντιστοιχεί στο cluster 1, με γαλάζιο στο cluster 2 και με μωβ στο cluster 3. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

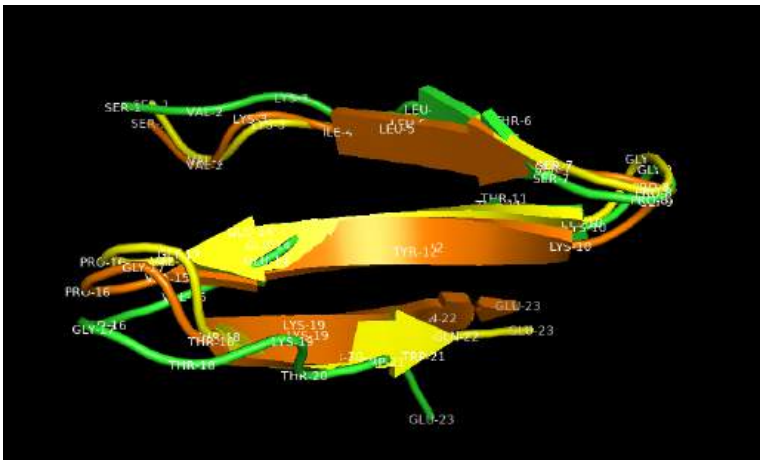
Παρακάτω βρίσκονται και οι τιμές RMSD των παραπάνω διαμορφώσεων σε σύγκριση με την πειραματική δομή:

- cluster 1 - LowE
  - RMSD = 2,004 (22 to 22 atoms)
  - Ca RMSD = 2,310 (23 to 23 atoms)
- cluster 2 - LowE
  - RMSD = Ca RMSD = 5,301 (23 to 23 atoms)
- cluster 3 - LowE
  - RMSD = 4,608 (22 to 22 atoms)
  - Ca RMSD = 5,206 (23 to 23 atoms)

Όπως είπαμε και στην ανάλυση PCA οι διαφορές μεταξύ των διαμορφώσεων των τριών clusters είναι ορατές

Το cluster 1 βλέπουμε ότι είναι και αυτό με την μικρότερη RMSD τιμή, ενώ τα άλλα δύο έχουν πολύ υψηλότερη τιμή.

Τέλος έχουμε τα δεδόμενα της **dPCA** ανάλυσης για το ίδιο πεπτίδιο.



Εικόνα 3.58: Απεικονίζονται με κίτρινο η δομή που αντιστοιχεί στο cluster 1 και με πορτοκαλί στο cluster 2. Οι δομές προήλθαν από το Grcarma και απεικονίστηκαν σε περιβάλλον της Pymol.

Παρακάτω βρίσκονται και οι τιμές RMSD των δύο παραπάνω αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων σε σύγκριση με την πειραματική δομή:

- cluster 1 - LowE
  - RMSD = 1,595 (80 to 80 atoms)
  - backbone RMSD = 2,273 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 2,311 (23 to 23 atoms)
    (align LYW_340_01 & n. ca, LYW_LowE & n. ca, cutoff=100)
- cluster 2 - LowE
  - RMSD = 1,811 (88 to 88 atoms)
  - backbone RMSD = 2,252 (92 to 92 atoms)
  - Ca RMSD = 2,184 (23 to 23 atoms)
    (align LYW_340_02 & n. ca, LYW_LowE & n. ca, cutoff=100)

Στο συγκεκριμένο δυναμικό πεδίο παρατηρούμε ότι εμφανίζονται μόνο δύο clusters εκ των οποίων το πρώτο εμφανίζεται σχεδόν σε όλες τις ανατεθειμένες διαμορφώσεις (σε ποσοστό ~96,64 %). Αν και εμφανίζεται τρίτος β-κλώνος και στα δύο αυτά clusters παρατηρούμε ότι και τα δύο εμφανίζουν χαμηλότερη τιμή Ca RMSD σε σχέση με το cluster 5 του προηγούμενου δυναμικού πεδίου. Άρα η δευτεροταγής δομή του πεπτιδίου δεν επηρεάζει την τιμή Ca RMSD, αναιρώντας έτσι την υπόθεση που κάναμε για το cluster 5 στο προηγούμενο δυναμικό πεδίο.

Άλλη μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση βρίσκεται στο γεγονός ότι το cluster 1 εμφανίζει χαμηλότερη RMSD τιμή, ενώ το cluster 2 εμφανίζει χαμηλότερη backbone

και Ca RMSD τιμή. Αυτό σημαίνει ότι για το cluster 1 η βασική δομή (η δομή χωρίς τα outliers άτομα) του συμφωνεί περισσότερο με την πειραματική.

Κλείνοντας το κομμάτι της υπέρθεσης και για το πεπτίδιο LYW, παρατηρούμε ότι, ανάμεσα στα δύο δυναμικά πεδία η δομή που έχει την μικρότερη τιμή Ca RMSD έχει δημιουργηθεί στο πεδίο 99SB-STAR-ILDN στους 340K και είναι το cluster 2 από τις δομές της dPCA ανάλυσης.

4. Συμπεράσματα

Φτάσαμε αισίως στο σημείο όπου πρέπει να εξάγουμε κάποια συμπεράσματα από τις τόσες αναλύσεις που κάναμε και τις περίεργες εικόνες που είδαμε. Για να μην χαθούμε λοιπόν αποφάσισα να επαναλάβω με λίγα λόγια ποιά είναι τα πειραματικά μας δεδομένα, τι μας έδειξαν οι αναλύσεις σχετικά με το εκάστοτε πεπτίδιο και στο εκάστοτε δυναμικό πεδίο και έπειτα να προσπαθήσω να βγάλω ένα νόημα απ'όλα αυτά.

Υπενθυμίζω ότι σκοπός της εργασίας αυτής είναι να δούμε κατά πόσο οι προσομοιώσεις μπορούν να εξάγουν αποτελέσματα τα οποία να ανταποκρίνονται στην πραγματικότητα, δηλαδή στα πειραματικά δεδομένα.

Επίσης οφείλω να αναφέρω τόσο για τα συμπεράσματα όσο και για την συζήτηση ότι τα αποτελέσματα και η ερμηνεία αυτών, αφορούν ξεκάθαρα τα συγκεκριμένα πεπτίδια που μελετήθηκαν και υπό τις συγκεκριμένες παραμέτρους, όπως είναι τα δυναμικά πεδία, οι θερμοκρασίες και ο χρόνος της προσομοίωσης. Η απευθείας σύγκριση μεταξύ των δύο δυναμικών πεδίων δεν θα ήταν επιστημονικά σωστή καθώς υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο συστημάτων προσομοίωσης.

Ξεκινώντας από το πεπτίδιο **IYL** γνωρίζουμε, από τα πειραματικά δεδομένα του D. Scheerer και της ομάδας του, ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο δημιουργεί τις πιο καλοσχηματισμένες και καλά καθορισμένες δομές μεταξύ των τριών, καθώς οι δέκα καλύτερες δομές που προέκυψαν από το NMR δεν έχουν μεγάλες αποκλίσεις από την μέση δομή.

Τα δεδομένα από τις προσομοιώσεις για αυτό το πεπτίδιο και στο δυναμικό πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K** έδειξαν αρχικά ότι το πεπτίδιο υιοθετεί κυρίως διαμορφώσεις με τρεις β-κλώνους, αλλά μερικές φορές και υιοθετεί και διαμορφώσεις με δύο. Όπως παρατηρούμε όμως στην ανάλυση της δευτεροταγούς δομής αυτές οι δίκλωνες διαμορφώσεις δεν εμφανίζονται πολύ συχνά.

Κατά την cPCA ανάλυση το πεπτίδιο υιοθετούσε σε ένα μεγάλο ποσοστό μορφή παρόμοια με αυτή που θα περιμέναμε, ενώ στην dPCA ανάλυση παρατηρούμε ότι η πιο συχνά επισκεπτόμενη διαμόρφωση εμφανίζει μόνο δύο β-κλώνους.

Κατά την σύγκριση των dPCA δομών, όπου βλέπουμε ότι μεταξύ των αντιπροσωπευτικών δομών της dPCA η διαμόρφωση με την μικρότερη backbone RMSD τιμή είναι η τρίτη στην σειρά συχνότητας εμφάνισης. Από την dPCA και την υπέρθεση παρατηρούμε ότι η αντιπροσωπευτική δομή του cluster που επισκέπτεται το πεπτίδιο πιο συχνά (με βάση τα ποσοστά των ανατεθειμένων δομών) δεν είναι αυτή που εμφανίζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με την δομή NMR του πεπτιδίου. Αντίθετα μεγαλύτερη ομοιότητα με την δομή NMR εμφανίζει η τρίτη σε σειρά διαμόρφωση την οποία το πεπτίδιο επισκέπτεται σχεδόν 3 φορές λιγότερο κατά την διάρκεια της προσομοίωσης. Μάλιστα ακόμα και η δεύτερη στην σειρά αντιπροσωπευτική δομή εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα με την πειραματική δομή απ'ότι η πρώτη. Στην περίπτωσή μας λοιπόν παρατηρούμε ότι μια αντιπροσωπευτική δομή που υιοθετείται συχνά κατά την διάρκεια της μοριακής προσομοίωσης δεν σημαίνει ότι θα είναι και αυτή που εμφανίζει μεγαλύτερες ομοιότητες με την δομή που προήλθε από τα δεδομένα της NMR.

Στο πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K** είναι εμφανές ότι το πεπτίδιο δεν υιοθετεί δομές β-φύλλου για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα όσο υιοθετούσε στο πεδίο 99SB-ILDN-P. Εμφανίζονται πολλές διαμορφώσεις β-φύλλου με δύο ή και καθόλου β-κλώνους.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάλυση PCA όπου και στην περίπτωση της cPCA και της dPCA από τις δύο πιο πολυσύχναστες ανατεθειμένες δομές της κάθε ανάλυσης, η μια δεν εμφάνιζε οπτικά καμία ομοιότητα με την αναμενόμενη δομή, ενώ η άλλη εμφάνιζε αρκετές. Σε συνδυασμό με την υπέρθεση παρατηρούμε ότι για την cPCA η δομή με μικρότερη Ca RMSD τιμή είναι η δεύτερη σε σειρά (απέχει μόνο 10% από την πρώτη) και για την dPCA μικρότερη backbone RMSD τιμή έχει η πρώτη σε σειρά δομή.

Συνολικά από τα δύο πεδία η διαμόρφωση που ήταν πιο κοντά στην πειραματική δομή με βάση την Ca RMSD τιμή προέκυψε από την ανάλυση dPCA στο πεδίο 99SB-ILDN-P στους 360K. Είδαμε ότι στις προσομοιώσεις το πεπτίδιο υιοθετούσε τρίκλωνες δομές β-φύλλου, αλλά πολλές φορές υιοθετούσε και άλλες διαφορετικές δομές, ενώ και στα δύο πεδία η πλειονότητα των πιο «πολυσύχναστων» δομών ήταν δομές β-φύλλου. Επιπλέον πριν περάσουμε στο πεπτίδιο IYL θέλω να τονίσω για άλλη μια φορά ότι η πιο πολυσύχναστη διαμόρφωση, ή διαφορετικά το cluster που περιέχει τις περισσότερες ανατεθειμένες διαμορφώσεις, δεν είναι αναγκαστικά και αυτό με την χαμηλότερη RMSD τιμή.

Αφήνοντας πίσω μας το πεπτίδιο IYL, περνάμε στο πεπτίδιο **LYW**. Ο D. Scheerer έδειξε με την ομάδα του ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο παρουσιάζει το λιγότερο ομοιόμορφο και καλά καθορισμένο β-φύλλο. Είναι χαρακτηριστικό ότι από τις δέκα καλύτερες δομές που προέκυψαν από το NMR μόνο σε δύο εμφανίζεται τρίτος β-κλώνος, ο οποίος μάλιστα απουσιάζει και από την πειραματική δομή. Επιπλέον το πεπτίδιο αυτό έχει την χαμηλότερη θερμική σταθερότητα και το πιο αργό relaxation time. Αυτή η μείωση στην σταθερότητα και την ομοιομορφία του πεπτιδίου αποδίδεται, σύμφωνα με την ομάδα του Scheerer, στην αρωματική επαφή ανάμεσα στους κλώνους 2 και 3. Αυτή η επαφή σταθεροποιεί λιγότερο το πεπτίδιο και οδηγεί σε παραμόρφωση του τρίτου κλώνου.

Ξεκινάμε λοιπόν να δούμε τα δεδομένα των προσομοιώσεών μας για το πεπτίδιο **LYW** στο δυναμικό πεδίο **99SB-ILDN-P στους 360K**. Το πεπτίδιο, σύμφωνα με το RMSD matrix και το secondary structure, υιοθετεί κατά την διάρκεια της προσομοίωσης κυρίως δομή τρίκλωνου β-φύλλου, ενώ υιοθετεί και δομές δίκλωνου β-φύλλου όπου απουσιάζει ο τρίτος β-κλώνος. Από αυτό το σημείο ξεκινάει και φαίνεται η αστάθεια του τρίτου κλώνου, καθώς οι πρώτοι δύο στο μεγαλύτερο μέρος της προσομοίωσης υιοθετούν δομή β-φύλλου. Περνώντας στην PCA και πιο συγκεκριμένα στην cPCA ανάλυση βλέπουμε ότι η αντιπροσωπευτική δομή του cluster που περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό των ανατεθειμένων διαμορφώσεων εμφανίζει κάποιες ομοιότητες με την μορφή που θα περιμέναμε να πάρει το πεπτίδιο. Δυστυχώς καθώς στην cPCA μελετούνται μόνο οι κεντρικοί άνθρακες (Ca) και όχι οι δίεδρες γωνίες δεν μπορούμε να καταλάβουμε αν εμφανίζονται δύο ή τρεις β-κλώνοι. Αξίζει όμως να αναφέρω ότι οι επόμενες δύο σε σειρά αντιπροσοπευτικές δομές δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία ομοιότητα με την εμφάνιση που θα περιμέναμε να έχει το πεπτίδιο. Περνώντας στην dPCA, όπου εδώ εμφανίζεται η δευτεροταγής δομή, παρατηρούμε ότι οι τρεις από τις τέσσερις πιο «πολυσύχναστες» ανατεθειμένες διαμορφώσεις εμφανίζουν δομή τρίκλωνου β-φύλλου, ενώ η μόνη από αυτές που δεν εμφανίζει τρίτο κλώνο είναι η τρίτη στην σειρά. Άλλη μια παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε είναι το γεγονός ότι το πεπτίδιο υιοθετεί την αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του πρώτου cluster δύο φορές περισσότερο από αυτή του δεύτερου.

Τέλος, όσον αφορά την υπέρθεση στην ανάλυση της cPCA παρατηρούμε κάτι αρκετά ενδιαφέρον. Το πρόγραμμα έδωσε στην δεύτερη σε σειρά διαμόρφωση (cluster 2) δύο διαφορετικές RMSD τιμές, μία τιμή όπου μελέτησε 14 από τους 23 κεντρικούς άνθρακες και μια τιμή όπου μελέτησε και τους 23 κεντρικούς άνθρακες (Ca RMSD). Αντίθετα, στις άλλες δύο έδωσε μόνο μια τιμή, δηλαδή η Ca RMSD τιμή ταυτίζεται με την RMSD τιμή χωρίς τα outlier άτομα. Αυτό σημαίνει, ότι η δεύτερη διαμόρφωση για

τα συγκεκριμένα 14 άτομα εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα με την πειραματική δομή απ'ότι η πρώτη διαμόρφωση. Ωστόσο λαμβάνοντας υπόψην και τους 23 κεντρικούς άνθρακες του πεπτιδίου, την μεγαλύτερη ομοιότητα με την πειραματική δομή την εμφανίζει η πρώτη διαμόρφωση.

Για την ανάλυση της dPCA βλέπουμε κάτι αρκετά διαφορετικό καθώς και οι τέσσερις αντιπροσωπευτικές δομές εμφανίζουν όλες αρκετή ομοιότητα με την πειραματική δομή. Οι τρείς από τις τέσσερις διαμορφώσεις έχουν και σε αυτήν την περίπτωση ίδια τιμή RMSD και backbone RMSD, ενώ η δομή που εμφανίζει δύο διαφορετικές τιμές (μόνο λόγω 2 ατόμων βέβαια) είναι και αυτή με την μικρότερη τιμή. Η τρίτη λοιπόν σε σειρά δομή (cluster 5) εμφανίζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με την πειραματική δομή. Αξίζει συνολικά να σημειώσουμε για αυτήν την ανάλυση ότι οι μορφές όλων το πεπτιδίων οπτικά φαίνονται αρκετά όμοιες η μια με την άλλη και μάλιστα σε σύγκριση με την πειραματική δομή έχουν χαμηλή σχετικά RMSD τιμή.

Για το πεπτίδιο LYW στο πεδίο 99SB-ILDN-P στους 360K παρατηρούμε, ότι στην ανάλυση της cPCA η πιο πολυσύχναστη δομή είναι και αυτή με την μεγαλύτερη ομοιότητα ως προς την πειραματική δομή. Στην ανάλυση dPCA ωστόσο αυτό δεν ισχύει καθώς η δομή με την μεγαλύτερη ομοιότητα προς την πειραματική δομή υιοθετείται μόλις σε ποσοστό ~14,49% των ανατεθειμένων διαμορφώσεων.

Για το πεδίο **99SB-STAR-ILDN στους 340K** παρατηρούμε ότι σχεδόν στην μισή διάρκεια της προσομοίωσης (~4 μs) το πεπτίδιο υιοθετεί δομή τρίκλωνου β-φύλλου και έπειτα ο τρίτος κλώνος αποδιοργανώνεται τελείως, ενώ οι δύο πρώτοι προσπαθούν να διατηρήσουν μια δομή β-φύλλου. Στην PCA παρατηρούμε κάτι αρκετά ενδιαφέρον. Στην ανάλυση cPCA το grcarma δημιουργεί τρεία clusters από τα οποία το πρώτο περιέχει το ~92,57% των ανατεθειμένων διαμορφώσεων που προέκυψαν και είναι και αυτό με την μικρότερη RMSD τιμή και μάλιστα με μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα επόμενα δύο cluster. Στην ανάλυση dPCA όμως, αν και πάλι βλέπουμε ότι το πρώτο cluster που περιέχει ~96,64 % των ανατεθειμένων διαμορφώσεων έχει και την μικρότερη RMSD τιμή, το δεύτερο cluster δεν έχει και τόσο μεγάλη διαφορά. Μάλιστα η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του δεύτερου cluster έχει ελάχιστα χαμηλότερη backbone RMSD τιμή απ'ότι το πρώτο. Επίσης αξίζει να αναφέρω ότι για την RMSD τιμή του πρώτοι cluster μελετούνται 80 άτομα, ενώ για το δεύτερο 88. Αυτά τα 8 άτομα θα μπορούσε να είναι ο λόγος γιατί σε αυτήν την ανάλυση η δομή του πρώτου cluster εμφανίζει μικρότερη RMSD τιμή σε σχέση με το δεύτερο.

Αν και στο δεύτερο δυναμικό πεδίο οι αντιπροσωπευτικές δομές είναι τρίκλωνες, ενώ η πειραματική είναι δίκλωνη, έχουν τις χαμηλότερες τιμές Ca RMSD συγκριτικά με το προηγούμενο πεδίο. Σε αυτό το πεπτίδιο η διαμόρφωση με την χαμηλότερη τιμή RMSD

προέκυψε από το πεδίο 99SB-STAR-ILDN στους 340K και στην cPCA και στην dPCA. Παρατηρούμε και σε αυτό το πεπτίδιο ότι το σύνολο των παραμέτρων των δυναμικών πεδίων επηρεάζουν τις δομές που υιοθετεί το πεπτίδιο. Στο πεδίο 99SB-ILDN-P βλέπουμε το πεπτίδιο να αλλάζει από σταθερές δομές β-φύλλου σε δομές με κανένα χαρακτηριστικό δευτεροταγής δομής και έπειτα πάλι σε δομή β-φύλλου. Αντίθετα το πεδίο 99SB-STAR-ILDN ωθεί το πεπτίδιο στην υιοθέτηση μιας δομής β-φύλλου σχεδόν για την μισή διάρκεια της προσομοίωσης.

5. Συζήτηση

Στην εργασία αυτή ελέγξαμε την συμπεριφορά δύο πεπτιδίων (IYL και LYW) σε δύο διαφορετικά σύνολα δυναμικά πεδία (99SB-ILDN-P στους 360K και 99SB-STAR-ILDN στους 340K), σχετικά με τις διαμορφώσεις που υιοθετούν και κατά πόσο αυτές ανταποκρίνονται στα πειραματικά δεδομένα. Οι προσομοιώσεις που τρέξαμε ήταν προσομοιώσεις αναδίπλωσης και όχι προσομοιώσεις των πεπτιδίων στην αναδιπλωμένη μορφή. Αυτό σημαίνει ότι τα τροχιακά περιλάμβαναν και γεγονότα αναδίπλωσης και αποδιάταξης και οι μορφές που είδαμε τελικά να εμφανίζονται ήταν οι ενεργειακά προτεινόμενες. Αξίζει αρχικά να σημειώσουμε ότι και για τα δύο πεπτίδια η ανάλυση dPCA έδωσε την αντιπροσωπευτική δομή με την χαμηλότερη τιμή Ca RMSD, όπου στους υπολογισμούς λήφθηκαν υπόψην μόνο οι κεντρικοί άνθρακες. Για το πεπτίδιο IYL η καλύτερη διαμόρφωση (αυτή δηλαδή που ήρθε πιο κοντά στην πειραματική) προήλθε από το πεδίο 99SB-ILDN-P στους 360K, ενώ για το πεπτίδιο LYW προήλθε από το πεδίο 99SB-STAR-ILDN στους 340K. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ασυμφωνία αυτή υποδεικνύει ότι κανένα από τα δύο συστήματα δεν κατάφερε να αποτυπώσει πλήρως τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα, αλλά όπως είπαμε και στην αρχή υπάρχουν και άλλες παράμετροι που αλλάζουν εκτός των πεδίων, όπως είναι η θερμοκρασία και η χρονική διάρκεια της προσομοίωσης. Οι αναλύσεις RMSD matrix και PCA μας έδειξαν ότι το IYL πεπτίδιο υιοθετεί μια μεγαλύτερη ποικιλία διαμορφώσεων, ενώ το πεπτίδιο LYW υιοθετεί σε ένα μεγάλο βαθμό διαμορφώσεις τρίκλωνων β-φύλλων. Η διαφορά αυτή στην σταθερότητα των διαμορφώσεων των δύο πεπτιδίων εμφανίζεται ακόμα πιο έντονα και στην ανάλυση δευτεροταγούς δομής, όπου το πεπτίδιο LYW πάλι εμφανίζεται να υιοθετεί για περισσότερο χρόνο δομές β-φύλλων. Συνολικά λοιπόν το πεπτίδιο IYL εμφανίστηκε πιο ευέλικτο και με τάση να αλλάζει διαμορφώσεις με μεγαλύτερη ευκολία, ενώ το πεπτίδιο LYW εμφανίζεται να έχει χαμηλότερη δυναμική και να υιοθετεί δομές τρίκλωνων β-φύλλων για τα περισσότερα διαστήματα. Αυτές οι διαφορές είναι πιθανόν να οφείλονται στην δομική διαφορά των δύο πεπτιδίων, την ύπαρξη αρωματικής αλληλεπίδρασης και ᴅPro-Gly φουρκετών. Ή

από την άλλη θα μπορούσαν να οφείλονται και στην επιρροή των δυναμικών πεδίων. Ωστόσο ούτε το ILDN-P που προσφέρει ελαστικότητα στα πεπτίδια, ούτε το STAR-ILDN που προσφέρει πιο σταθερές δομές β-φύλλων, κατάφεραν να αποτυπώσουν με μεγάλη ακρίβεια τις πειραματικές δομές. Ίσως οι άλλες παράμετροι των δυναμικών πεδίων (θερμοκρασία και χρονική διάρκεια προσομοίωσης) επηρέασαν και αυτές την συμπεριφορά των πεπτιδίων. Ίσως αυτά τα δύο πεδία δεν είναι σε θέση να εξάγουν σωστά συμπεράσματα για τέτοια μικρά μόρια β-φύλων. Ίσως τελικά η διαφορά στις διαμορφώσεις που υιοθέτησαν τα δύο πεπτίδια να μην οφείλεται τόσο στα δυναμικά πεδία, αλλά στην δομή των πεπτιδίων. Τα «ίσως» αυτής της έρευνας είναι πολλά, το σίγουρο όμως είναι ότι περαιτέρω έρευνες πάνω σε τέτοιου είδους μόρια είναι επιθυμητες. Καλύτερης ποιότητας δείγματα, διαφορετικά δυναμικά πεδία και θερμοκρασίες, αύξηση του χρονικού διαστήματος των προσομοιώσεων και σύγκριση των πειραματικών δυναμικών είναι κάποιοι μόνο από τους παράγοντες που θα μπορούσαν να ελεγχθούν σε μελλοντικές έρευνες.

Όπως ανέφερα και στην αρχή, αυτή η πτυχιακή είχε ως δευτερεύον σκοπό να προσθέσει άλλο ένα λιθαράκι στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία περί προσομοιώσεων και δυναμικών πεδίων. Σίγουρα δεν αποτελεί καθοριστικό συμπέρασμα για την συμπεριφορά τέτοιων μορίων, ας μην ξεχνάμε εξάλλου ότι αυτή η πτυχιακή δεν είναι τίποτα άλλο παρά η προσπάθεια ενός προπτυχιακού φοιτητή να βγάλει κάποιο νόημα στον σύνθετο κόσμο των μοριακών προσομοιώσεων.

6. Βιβλιογραφία

1. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular Dynamics Simulation for All. Neuron. 2018 Sep 19;99(6):1129-1143. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011. PMID: 30236283; PMCID: PMC6209097.
2. Wang HW, Wang JW. How cryo-electron microscopy and X-ray crystallography complement each other. Protein Sci. 2017 Jan;26(1):32-39. doi: 10.1002/pro.3022. Epub 2016 Sep 7. PMID: 27543495; PMCID: PMC5192981.
3. Freddolino L, Harrison CB, Liu Y, Schulten K. Challenges in protein folding simulations: Timescale, representation, and analysis. Nat Phys. 2010 Oct 1;6(10):751-758. doi: 10.1038/nphys1713. PMID: 21297873; PMCID: PMC3032381.
4. David Scheerer, Heng Chi, Dan McElheny, Ayesha Samer, Timothy A. Keiderling, Karin Hauser; Role of Aromatic Cross-Links in Structure and Dynamics of Model Three-Stranded β-Sheet Peptides. J. Phys. Chem. A 18 January 2018; 122 (2): 543–553.
5. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. Proteins. 2010 Jun;78(8):1950-8. doi: 10.1002/prot.22711. PMID: 20408171; PMCID: PMC2970904.
6. Lindorff-Larsen K, Maragakis P, Piana S, Eastwood MP, Dror RO, Shaw DE. Systematic validation of protein force fields against experimental data. PLoS One. 2012;7(2):e32131. doi: 10.1371/journal.pone.0032131. Epub 2012 Feb 22. Erratum in: PLoS One. 2013;8(4). doi:10.1371/annotation/8301b5d4-1ba3-40e7-8fcd-3e169b967044. PMID: 22384157; PMCID: PMC3285199.
7. Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. Proteins. 2006 Nov 15;65(3):712-25. doi: 10.1002/prot.21123. PMID: 16981200; PMCID: PMC4805110.
8. Best RB, Hummer G. Optimized molecular dynamics force fields applied to the helix-coil transition of polypeptides. J Phys Chem B. 2009 Jul 2;113(26):9004-15. doi: 10.1021/jp901540t. PMID: 19514729; PMCID: PMC3115786.
9. Batys P, Morga M, Bonarek P, Sammalkorpi M. pH-Induced Changes in Polypeptide Conformation: Force-Field Comparison with Experimental Validation. J Phys Chem B. 2020 Apr 9;124(14):2961-2972. doi:

10.1021/acs.jpcb.0c01475. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32182068; PMCID: PMC7590956.

10. Koukos PI, Glykos NM. Grcarma: A fully automated task-oriented interface for the analysis of molecular dynamics trajectories. J Comput Chem. 2013 Oct 5;34(26):2310-2. doi: 10.1002/jcc.23381. PMID: 24159629.
11. Glykos NM. Software news and updates. Carma: a molecular dynamics analysis program. J Comput Chem. 2006 Nov 15;27(14):1765-8. doi: 10.1002/jcc.20482. PMID: 16917862.
12. Frishman D, Argos P. Knowledge-based protein secondary structure assignment. Proteins. 1995 Dec;23(4):566-79. doi: 10.1002/prot.340230412. PMID: 8749853.
13. Groth D, Hartmann S, Klie S, Selbig J. Principal components analysis. Methods Mol Biol. 2013;930:527-47. doi: 10.1007/978-1-62703-059-5_22. PMID: 23086856.
14. Altis A, Otten M, Nguyen PH, Hegger R, Stock G. Construction of the free energy landscape of biomolecules via dihedral angle principal component analysis. J Chem Phys. 2008 Jun 28;128(24):245102. doi: 10.1063/1.2945165. PMID: 18601386.
15. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC.
16. Coutsias EA, Wester MJ. RMSD and Symmetry. J Comput Chem. 2019 Jun 5;40(15):1496-1508. doi: 10.1002/jcc.25802. Epub 2019 Mar 3. PMID: 30828834.
17. N. M. Glykos Carma documentation. https://utopia.duth.gr/glykos/carma.html
18. Mu Y, Nguyen PH, Stock G. Energy landscape of a small peptide revealed by dihedral angle principal component analysis. Proteins. 2005 Jan 1;58(1):45-52. doi: 10.1002/prot.20310. PMID: 15521057.
19. Elio A. Cino, Wing-Yiu Choy, Mikko Karttunen; Comparison of Secondary Structure Formation Using 10 Different Force Fields in Microsecond Molecular Dynamics Simulations. J. Chem. Theory Comput. 14 August 2012; 8 (8): 2725–2740.