

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του φοιτητή **Σταύρου Παπατζέλου** με θέμα:

**«Σύγκριση δομών πρωτεϊνικού συμπλόκου και των
μεμονομένων αλυσίδων του μετά από εξισορρόπηση με
προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής»**



Επιβλέπων: **Γεώργιος Παπαδόπουλος** (Λέκτορας)

Συνεπιβλέπων: **Νικόλαος Μπαλατσός** (Λέκτορας)

Συνεπιβλέπουσα: **Μαρία Κοντού** (Λέκτορας)

Λάρισα 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7651/1
Ημερ. Εισ.: 01-12-2009
Δωρεά: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087145

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
2.1 Το σύμπλοκο Ubc9-RanGAP1	
2.1.1 Η πρωτεΐνη Ran GTPase Activating Protein 1 ή Ran GAP 1	
2.1.2 Η πρωτεΐνη λιγάση E2 Ubc9	
2.2 Μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων	
2.2.1 Πειραματικές μέθοδοι μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων	
Κρυσταλλογραφία με ακτίνες X	
Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	
Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων	
2.2.2 Θεωρητικές ή υπολογιστικές μέθοδοι μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων	
Σχεδιασμός δομής με βάση την ομοιότητα της ακολουθίας	
Πρόσδεση (Docking)	
Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής	
2.2.3 Η διαδικασία μιας προσομοίωσης	
Προετοιμασία του συστήματος	
Διαλυτοποίηση	
Προσθήκη ιόντων	
Ελαχιστοποίηση	
Θέρμανση του συστήματος	
Επιλογή οριακών συνθηκών	
Εξισορρόπηση	
Φάση «παραγωγής»	
Ανάλυση των αποτελεσμάτων	
3. ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
3.1 Προετοιμασία των αρχείων	
3.1.1 Τεμαχισμός του συμπλόκου	
3.1.2 Δημιουργία του αρχείου psf και του αρχείου pdb μαζί με τα υδρογόνα	
3.1.3 Διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης σε νερό	
3.1.4 Προσθήκη ιόντων	
3.2 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας	
3.3 Εξισορρόπηση	
3.4 Υπολογισμός του RMSD	

3.5	Τελική ελαχιστοποίηση	
3.6	Η μελέτη της πρωτεΐνης Ubc9 και του συμπλόκου Ubc9-RanGAP1	
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
4.1	Τα RMSD των εξισορροπήσεων	
4.2	Σύγκριση της δομής της κάθε πρωτεϊνικής συνιστώσας σε ελεύθερη μορφή, με την δομή της μέσα στο σύμπλοκο	
4.3	Επεξεργασία των αρχείων .coor της τελευταίας ελαχιστοποίησης	
4.4	Σύγκριση των δομών της RanGAP1	
4.5	Σύγκριση των δομών της E2 Ubc9	
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	39
7.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	41

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην μεταγενωμική εποχή, τώρα δηλαδή που έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος, αλλά και των γονιδιωμάτων από πολλούς οργανισμούς, μία από τις πιο ενδιαφέρουσες και σημαντικές προκλήσεις είναι η κατανόηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε ευρεία κλίμακα. Οι φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών επικρατειών (domains) είναι θεμελιώδεις για τη λειτουργία ενός κυττάρου [1]. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα μεταξύ συγκεκριμένων επικρατειών μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αποτελείται από πολλούς τομείς, μεταξύ συγκεκριμένων υπομονάδων μιας πρωτεΐνης που αποτελείται από πολλές υπομονάδες, καθώς και σε παροδικά σύμπλοκα μεταξύ πρωτεϊνών οι οποίες όμως συναντώνται και ως ανεξάρτητες πρωτεΐνες [1].

Ως χαρακτηριστικά παραδείγματα μπορούμε να αναφέρουμε την αλληλεπίδραση ενός υποδοχέα με ένα πεπτίδιο-προσδέτη, ενός ενζύμου με το υπόστρωμά του, ενός αντισώματος με ένα αντιγόνο. Επίσης, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών υπομονάδων που σχηματίζουν έναν διάυλο ιόντων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, καθώς και μεταξύ πρωτεϊνών που δρουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, κτλ.

Γενικότερα, μπορούμε να πούμε ότι η μελέτη και η κατανόηση των διαφόρων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων θα μας οδηγήσει κατ' επέκταση στην βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τις λειτουργίες ενός κυττάρου. Αυτή η βαθύτερη κατανόηση, πέρα από τον καθαρά ερευνητικό χαρακτήρα της, είναι σχεδόν σίγουρο ότι θα έχει και πιο πρακτικές επιπτώσεις: Πολλές ασθένειες οφείλονται σε παρεκτροπή των φυσιολογικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων [2], οπότε η μελέτη των τελευταίων ίσως μας οδηγήσει σε αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση ή/και θεραπεία διαφόρων ασθενειών (π.χ. με τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων).

Προσφάτως ακούγεται όλο και συχνότερα ο όρος «interactome» που αναφέρεται στο σύνολο των μοριακών αλληλεπιδράσεων στα κύτταρα και παριστάνεται συνήθως ως ένα γράφημα. Αναφερόμενοι στις πρωτεΐνες το γράφημα αυτό θα είχε την μορφή ενός δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Μάλιστα η πολυπλοκότητα των οργανισμών τείνει να χαρακτηρίζεται από το πλήθος αυτών των αλληλεπιδράσεων.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι, τόσο πειραματικές, όσο και θεωρητικές ή υπολογιστικές, με τις οποίες μπορούμε είτε να διαπιστώσουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών, είτε να αναλύσουμε μία ήδη γνωστή αλληλεπίδραση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία λοιπόν, μελετήθηκε ένα σύμπλοκο μεταξύ δύο πρωτεϊνικών μορίων: Μεταξύ του ενζύμου λιγάση E2 Ubc9 μεταλλαγμένου στο αμινοξύ 85 (μετάλλαξη ASN→GLN), και του καρβοξυτελικού τμήματος (κατάλοιπα 419-587) ενός παράγοντα Ran GAP. Και τα 2 μόρια που μελετήθηκαν εκφράζονται στον άνθρωπο [22]. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, η οποία κατατάσσεται στις θεωρητικές ή υπολογιστικές μεθόδους, η ανάλυση δηλαδή πραγματοποιείται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκε πρώτα το σύμπλοκο μεταξύ των δύο πρωτεϊνών-συνιστωσών του, και ακολούθως η κάθε πρωτεϊνική συνιστώσα ξεχωριστά. Απώτερος σκοπός αυτής της ανάλυσης ήταν να συγκριθεί η δομή-διαμόρφωση της κάθε πρωτεϊνικής συνιστώσας, όταν αυτή συμμετέχει στον σχηματισμό του συμπλόκου, και όταν δεν συμμετέχει.

Όσον αφορά την διάρθρωση της παρούσας εργασίας, πρώτα θα αναφέρουμε κάποια στοιχεία που αφορούν στη βιολογία του συστήματος Ubc9-RanGAP1, εν συνεχεία θα αναφερθούμε σε πειραματικές και σε θεωρητικές μεθόδους μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, κατόπιν θα περάσουμε στο πρακτικό μέρος, στο οποίο παρουσιάζεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη του προαναφερόμενου πρωτεϊνικού συμπλόκου, και τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και ακολουθεί σχολιασμός και συζήτηση αυτών.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Το σύμπλοκο Ubc9-RanGAP1

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της λιγάσης E2 I Ubc9 με την Ran GTPase Activating Protein 1, το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, ανακτήθηκε από την βάση δεδομένων για πρωτεΐνες Brookhaven (<http://www.rcsb.org>). Οι πρωτεΐνες του συγκεκριμένου συμπλόκου εκφράζονται στον άνθρωπο. Πριν όμως εξετάσουμε τον λόγο που σχηματίζεται το σύμπλοκο, ας περιγράψουμε σύντομα την κάθε πρωτεϊνική συνιστώσα του.

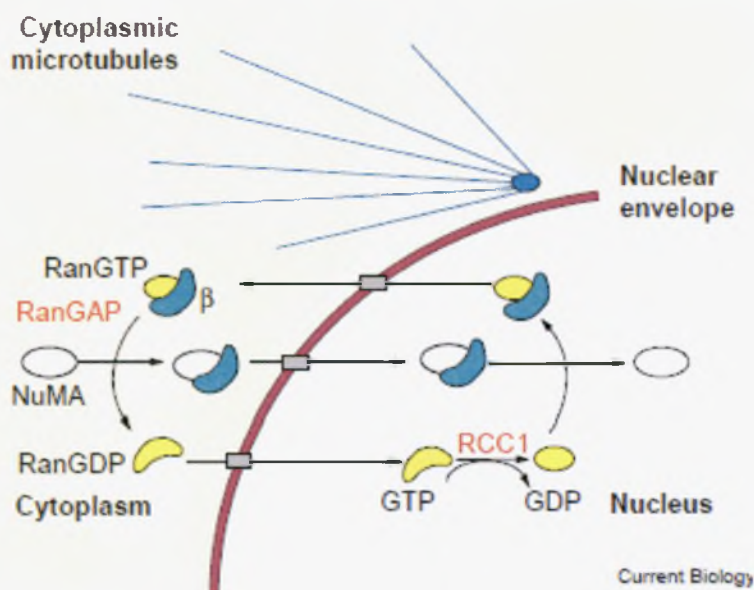
2.1.1 Η πρωτεΐνη Ran GTPase Activating Protein 1 ή Ran GAP 1

Όπως δηλώνει και το όνομά της, η Ran GAP 1, είναι μία πρωτεΐνη που ενεργοποιεί μία GTPάση Ran. Οι GTPάσες Ran ανήκουν στις μονομερείς πρωτεΐνες G ή μικρές GTPάσες. Πιο συγκεκριμένα, οι Ran ρυθμίζουν την μεταφορά μεταξύ πυρήνα-κυτταροπλάσματος, καθώς και την οργάνωση των μικροσωληνίσκων κατά τη μεσόφαση [3]. Όλες οι μικρές GTPάσες έχουν μία ανενεργή και μία ενεργή μορφή. Στην ανενεργή μορφή έχουν προσδεδεμένο ένα νουκλεοτίδιο GDP, ενώ στην ενεργή, ένα νουκλεοτίδιο GTP. Ενεργοποιούνται όταν απελευθερώνεται το GDP και τη θέση του καταλαμβάνει το GTP. Τότε η GTPάση είναι ενεργή και δρα σε επόμενα μόρια-τελεστές. Οι μικρές GTPάσες, όπως δηλώνει και τ' όνομά τους, έχουν ενεργότητα GTPάσης, δηλαδή, υδρολύουν ένα GTP σε GDP και Pi. Όταν λάβει χώρα αυτή η υδρόλυση, η GTPάση επανέρχεται στην ανενεργή της κατάσταση [3].

Ο ρυθμός όμως της υδρόλυσης είναι πολύ χαμηλός, με αποτέλεσμα η μικρή GTPάση να διατηρεί προσδεδεμένο το GTP και να παραμένει ενεργή για μεγάλο χρονικό διάστημα, κάτι που θα ήταν καταστροφικό για το κύτταρο και τον οργανισμό. Για τον λόγο αυτό, οι μικρές GTPάσες ρυθμίζονται αρνητικά από τις πρωτεΐνες GAP (GTPase Activating Protein). Εδώ μπορεί να υπάρξει κάποια σύγχυση, διότι αναφέρθηκε προηγουμένως ότι μια πρωτεΐνη GAP ενεργοποιεί μία μικρή πρωτεΐνη G. Αυτό που συμβαίνει στην πραγματικότητα, είναι ότι η πρωτεΐνη GAP ενεργοποιεί, επιταχύνει, την δράση GTPάσης της πρωτεΐνης G. Αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα να υδρολύεται το GTP, και η πρωτεΐνη να επανέρχεται στην ανενεργή της κατάσταση. Γι' αυτό λοιπόν οι πρωτεΐνες GAP ρυθμίζουν αρνητικά τις μικρές

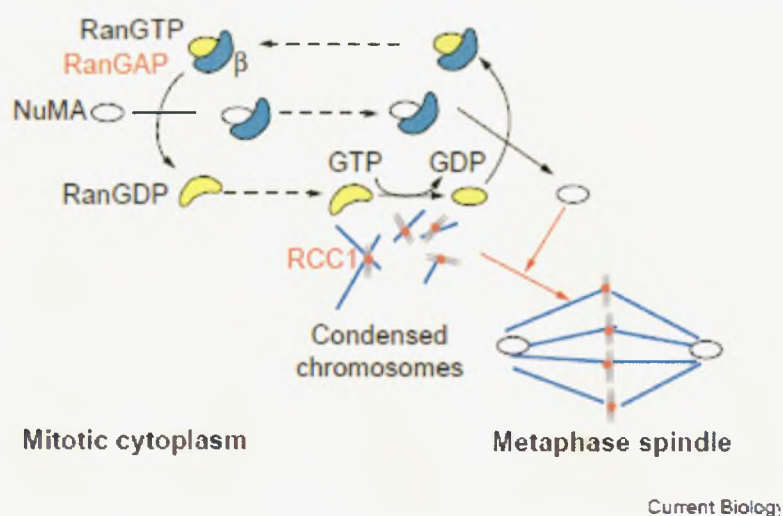
GTPάσες [3]. Και στη δική μας περίπτωση, η πρωτεΐνη Ran GAP 1 ρυθμίζει αρνητικά την μικρή GTPάση Ran.

Ας δούμε τώρα πιο αναλυτικά, τον ρόλο των Ran και Ran GAP 1, όπως απεικονίζεται στις εικόνες 1 και 2:



Εικόνα 1. Ο κύκλος της RanGAP μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρηνόπλάσματος [4].

Στην εικόνα 1, παρουσιάζεται η ρύθμιση της πυρηνοκυτταροπλασματικής μεταφοράς. Για να εισέλθει μία πρωτεΐνη στον πυρήνα, όπως είναι η NuMA της εικόνας, που διαθέτει μια αλληλουχία NLS (Nuclear Localization Sequence), πρέπει πρώτα να συνδεθεί με την ιμφορτίνη β. Ακολούθως αυτό το σύμπλοκο εισέρχεται στον πυρήνα, διαμέσου ενός πυρηνικού πόρου, και για να απελευθερωθεί το φορτίο (εδώ η NuMA) από την ιμφορτίνη β, χρειάζεται η βοήθεια της RanGTP [4]. Στην εικόνα φαίνεται και μία άλλη πρωτεΐνη, η RCC1, η οποία είναι μία πρωτεΐνη GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), που είναι κάτι σαν το αντίθετο μιας GAP, δηλαδή ρυθμίζει θετικά μια μικρή GTPάση, επιταχύνοντας την αποδέσμευση του GDP και την αντικατάστασή του με GTP. Η ενεργή μορφή της Ran (RanGTP) αλληλεπιδρά με την ιμφορτίνη β, προκαλώντας την να απελευθερώσει το φορτίο της στον πυρηνόπλασμα. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ιμφορτίνη β-RanGTP εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, και εκεί αναλαμβάνει δράση η Ran GAP, η οποία επαναφέρει την Ran στην ανενεργή της μορφή (RanGDP). Η τελευταία κατ' αυτόν τον τρόπο, μπορεί να επανεισέλθει στον πυρήνα, να ενεργοποιηθεί στο πυρηνόπλασμα, και να αλληλεπιδράσει έτσι με ένα άλλο μόριο ιμφορτίνης β [4].



Εικόνα 2. Ο ρόλος της RanGAP στην κυτταρική διαίρεση [4].

Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται ο ρόλος των Ran και Ran GAP στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων. Ανάλογα με την εικόνα 1, η μπορτίνη β απελευθερώνει το φορτίο (εδώ μια πρωτεΐνη NuMA που συμμετέχει στον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου) με την βοήθεια της ενεργής Ran (RanGTP). Μόνο η διαφορά εδώ είναι ότι ο κύκλος ενεργοποίησης-απενεργοποίησης της Ran λαμβάνει χώρα στο μιτωτικό κυτταρόπλασμα, όπου ο πυρηνικός φάκελος έχει διαλυθεί. Επίσης, στην εικόνα 2, βλέπουμε ότι η πρωτεΐνη RCC1 ενεργοποιείται κατά προτίμηση κοντά στην χρωματίνη, καθιστώντας ενεργή την Ran και την πρωτεΐνη NuMA ικανή να συμμετάσχει στον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου [4].

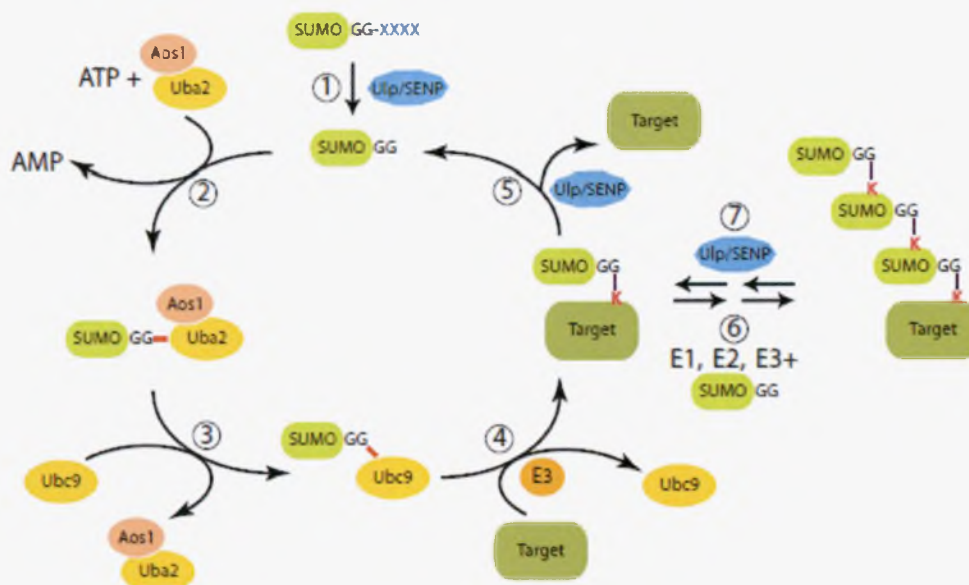
2.1.2 Η πρωτεΐνη λιγάση E2 Ubc9

Από την κυτταρική βιολογία γνωρίζουμε ότι για να αποικοδομηθούν οι πρωτεΐνες από το πρωτεάσωμα, πρέπει να συζευχθούν με την ουβικουΐτίνη, ένα μικρό πεπτίδιο 76 αμινοξέων. Η σύζευξη αυτή καταλύεται από τρία είδη ενζύμων γνωστών ως λιγάσες ουβικουΐτίνης E1, E2, και E3.

Στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα όμως, υπάρχει και το λεγόμενο μονοπάτι SUMO, το οποίο είναι σχεδόν ίδιο με το μονοπάτι της ουβικουΐτίνης: Σ' αυτό το μονοπάτι, μία πρωτεΐνη SUMO, που είναι μία πρωτεΐνη αντίστοιχη της ουβικουΐτίνης και ανήκει στους λεγόμενους τροποποιητές όμοιους με την ουβικουΐτίνη (ubiquitin-like modifiers), συζεύγνυται με διάφορες πρωτεΐνες στόχους, πάλι με την βοήθεια τριών λιγασών E1, E2, και

E3 [5]. Αυτή η σύζευξη βέβαια δεν οδηγεί σε πρωτεόλυση όπως συμβαίνει με την ουβικουΐνη, αλλά σε μία περαιτέρω ρύθμιση των μορίων-στόχων και των διαδικασιών που αυτά επιτελούν.

Στην περίπτωση μας, η λιγάση E2 Ubc9 καταλύει την σύζευξη πρωτεϊνών SUMO στην Ran GAP1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ρυθμίζεται ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου και κατ' επέκταση η κυτταροδιαίρεση. Έρευνες [6] έχουν δείξει ότι η σύζευξη της 5 an GA3 1 με την πρωτεΐνη SUMO, είναι απαραίτητη για να συσσωρευθεί η Ran GAP 1 κοντά στον πυρηνικό φάκελο, και να προαγάγει την κυτταροδιαίρεση, όπως περιγράφηκε στην εικόνα 2. Στην εικόνα 3 φαίνεται το μονοπάτι SUMO:



Εικόνα 3. Η διαδικασία σύζευξης μιας πρωτεΐνης-στόχου με την πρωτεΐνη SUMO, η οποία catalύεται από τρία είδη λιγασών, όμοιων με αυτές που καταλύουν την σύζευξη της ουβικουΐνης [5].

Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η λιγάση Ubc9. Συνοψίζοντας λοιπόν, το σύμπλοκο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, είναι μεταξύ μιας πρωτεΐνης Ran GAP 1 και μιας λιγάσης E2 Ubc9, το οποίο σχηματίζεται στην πλειοψηφία των ευκαρυωτικών κυττάρων, ούτως ώστε να συζευχθεί η 5 an GA31 με μία πρωτεΐνη SUMO, και να προχωρήσει ομαλά η κυτταροδιαίρεση.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

2.2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται μία σειρά πειραματικών μεθόδων:

Πίνακας 1. Πειρατικές μέθοδοι για την μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

1	Ανοσοσυνκατακρύμνιση (Co-immunoprecipitation)
2	Εν σειρά χρωματογραφία συγγένειας (Tandem affinity purification)
3	Φθορισμός από ενεργειακή μεταφορά λόγω συντονισμού (Fluorescence resonance energy transfer)
4	Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Surface plasmon resonance)
5	Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (X-ray crystallography)
6	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR spectroscopy)
7	Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscopy)
8	Ηλεκτρονική μικροσκοπία (Electron Microscopy)

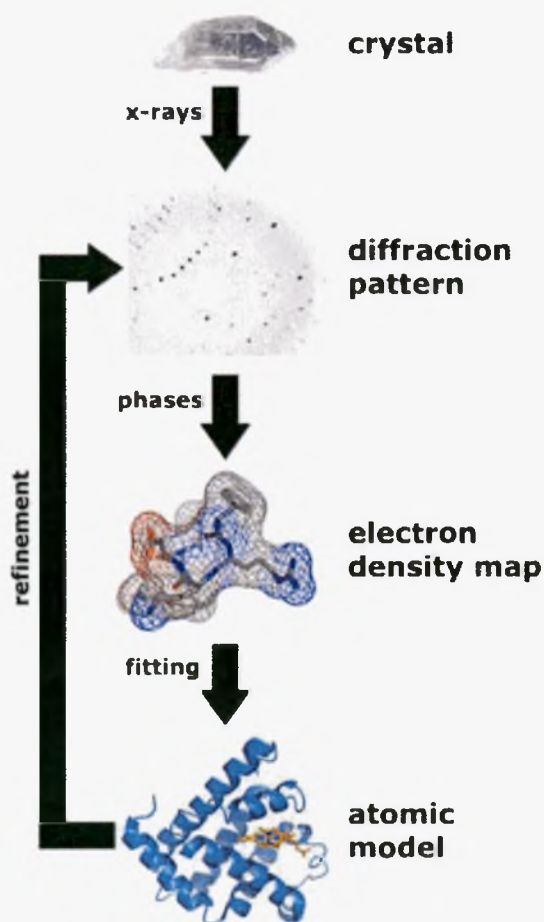
Από αυτές τις μεθόδους, κάποιες χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση πιθανών αλληλεπιδράσεων, ενώ οι υπόλοιπες χρησιμοποιούνται για τον δομικό, βιοχημικό, και βιολογικό προσδιορισμό γνωστών αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα, οι τρεις πρώτες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για ταυτοποίηση, ενώ οι τρεις τελευταίες για δομικό χαρακτηρισμό γνωστών αλληλεπιδράσεων. Σε γενικές γραμμές, κάθε πειραματική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δομής μιας πρωτεΐνης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό της δομής ενός συμπλόκου μεταξύ δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών τμημάτων. Η παρούσα εργασία αφορά τη μελέτη μιας γνωστής αλληλεπίδρασης, οπότε θα γίνει μια σύντομη αναφορά μόνο στις μεθόδους για αναλύσεις δομικού χαρακτηρισμού.

Κρυσταλλογραφία με ακτίνες Χ

Με αυτήν την μέθοδο μπορεί να προσδιοριστεί η διάταξη των ατόμων σ' έναν κρύσταλλο [7]. Ακτίνες Χ προσπίπτουν πάνω στον κρύσταλλο και περιθλώνται σε διάφορες

κατευθύνσεις. Από τις γωνίες και τις εντάσεις των ακτίνων που έχουν περιθλαστεί, ένας κρυσταλλογράφος μπορεί να παραγάγει μία τριδιάστατη εικόνα της ηλεκτρονικής πυκνότητας μέσα στον κρύσταλλο [7]. Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται η πορεία της εύρεσης της δομής ενός μορίου, με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X. Το πρώτο βήμα είναι η κρυστάλλωση του μορίου. Στη συνέχεια ο κρύσταλλος βομβαρδίζεται με ακτίνες X και λαμβάνεται ένα μοτίβο περίθλασης, το οποίο αναλύεται μαθηματικά, και από το οποίο προκύπτει ένας χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας του μορίου. Από τον χάρτη αυτό, υπολογίζονται οι θέσεις των ατόμων του μορίου.

Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X εφαρμόζεται ευρέως στον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών. Ο κύριος περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών για την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης [7].



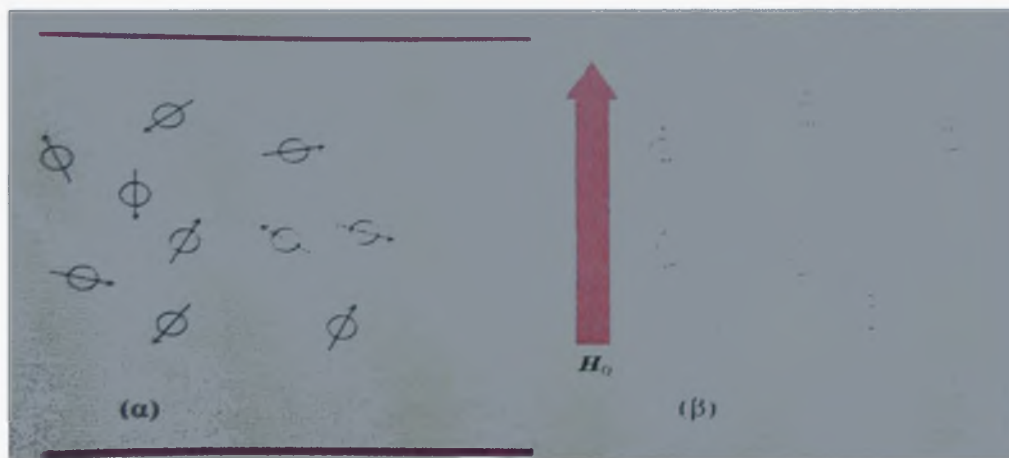
Εικόνα 4. Απλοποιημένο διάγραμμα της διαδικασίας που ακολουθείται για τον προσδιορισμό της δομής μιας πρωτεΐνης, με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X [7].

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Είναι μία μέθοδος που αξιοποιεί την συμπεριφορά ορισμένων πυρήνων από συγκεκριμένα χημικά στοιχεία, όταν βρεθούν σε ένα μαγνητικό πεδίο. Όταν πυρήνες με ολικό σπιν $\neq 0$, βρεθούν σε μαγνητικό πεδίο, τα σπιν τους προσανατολίζονται προς μία κατεύθυνση, ενώ πριν την εφαρμογή του πεδίου είχαν τυχαίες κατευθύνσεις [8]. Πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό των πυρήνων αυτών μπορεί να προσανατολισθεί ακόμη και σε ισχυρότατα μαγνητικά πεδία. Ακολούθως, εφαρμόζεται ένας ραδιοπαλμός στο δείγμα που περιέχει το μόριο προς ανάλυση, με αποτέλεσμα οι πυρήνες να απορροφούν την ενέργεια αυτού του παλμού και να αλλάζουν κατεύθυνση του σπιν [9]. Εννοείται ότι για να απορροφηθεί η ενέργεια, ο παλμός πρέπει να έχει μία συγκεκριμένη συχνότητα. Η συχνότητα αυτή είναι ανάλογη του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται.

Η μέθοδος του NMR χρησιμοποιείται για την εύρεση της δομής οργανικών μορίων, μορίων δηλαδή που περιέχουν άτομα άνθρακα και υδρογόνου, καθώς και άτομα όπως φώσφορο, μαγνήσιο, άζωτο, κτλ. [9]. Από μία ανάλυση, προκύπτει ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης, το οποίο περιέχει διάφορες κορυφές, που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους πυρήνες. Αυτό που επιτρέπει στον κάθε πυρήνα να δίνει διαφορετική κορυφή, είναι το ηλεκτρονικό του περιβάλλον. Επειδή κάθε πυρήνας περιβάλλεται από διαφορετικό αριθμό ηλεκτρονίων, ανάλογα με τη θέση του μέσα σε ένα μόριο, «αισθάνεται» διαφορετικά το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο που εφαρμόζεται. Οπότε, απορροφά σε διαφορετική συχνότητα, από έναν πυρήνα ίδιου τύπου που βρίσκεται σε άλλη θέση του μορίου. Οι διαφορετικές συχνότητες απορρόφησης ονομάζονται χημικές μετατοπίσεις, και εκφράζονται σε κλασματικές μονάδες δ , σε σχέση με τις μετατοπίσεις μιας χημικής ένωσης αναφοράς όπως το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) [25]. Για να προκύψει η δομή μιας πρωτεΐνης, αξιοποιείται το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser, που είναι μια αλληλεπίδραση μεταξύ πυρήνων, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη της έκτης δύναμης της μεταξύ τους απόστασης. Έτσι, αν δύο πυρήνες βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη από 5 Å, τότε ο μαγνητισμός μεταφέρεται από έναν διεγερμένο πυρήνα σε έναν άλλο μη ενεργοποιημένο [25]. Έτσι προκύπτει ένα φάσμα καλούμενο φάσμα NOESY, από το οποίο καθορίζονται τα ζεύγη των πυρήνων των ατόμων μιας πρωτεΐνης που απέχουν μεταξύ τους λιγότερο από 5 Å [25]. Το φάσμα αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί για να καθορισθεί η σχετική θέση των ατόμων της τριδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης.

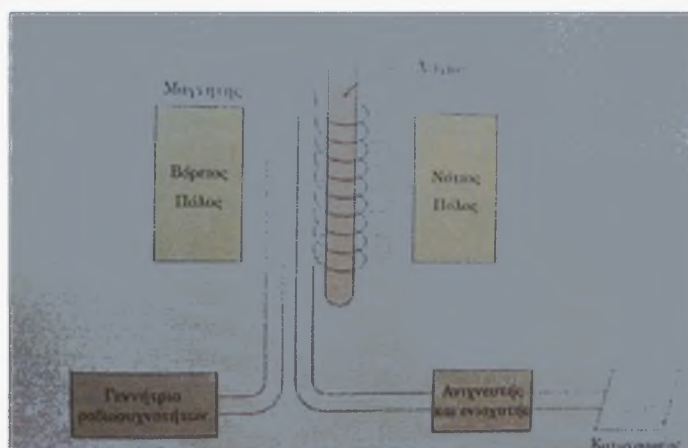
Για να γίνουν πιο κατανοητά τα παραπάνω, παρατίθενται σχετικές εικόνες. Στην εικόνα 5, φαίνεται ο τρόπος που προσανατολίζονται οι πυρήνες που διαθέτουν σπιν, όταν βρεθούν σε μαγνητικό πεδίο.



Εικόνα 5. Ο προσανατολισμός των πυρήνων που διαθέτουν σπιν όταν α) δεν βρίσκονται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και β) όταν βρίσκονται υπό την επίδραση αυτού [9].

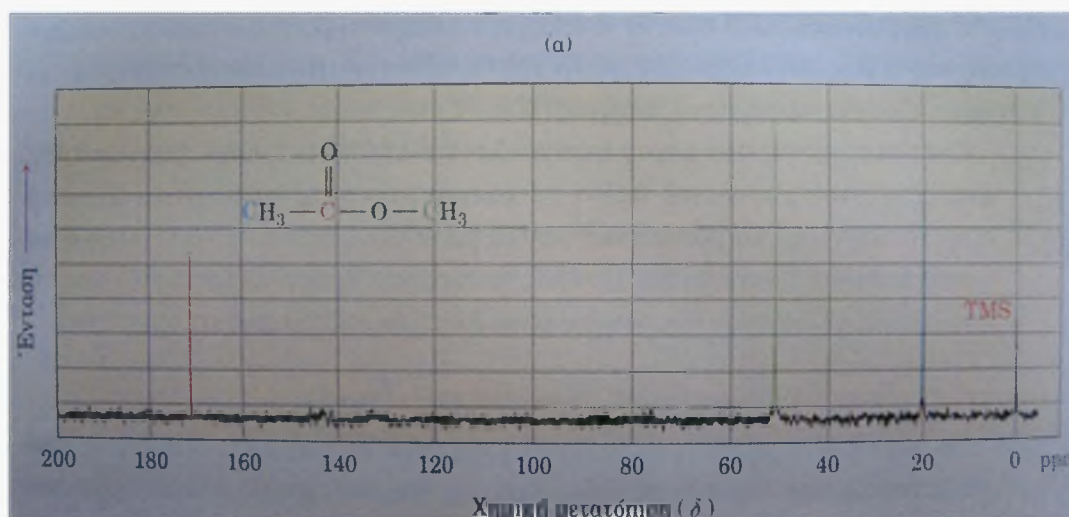
Βλέπουμε ότι στην περίπτωση (α) οι πυρήνες είναι τυχαία προσανατολισμένοι, ενώ στην περίπτωση (β) όπου εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο H_0 , άλλοι πυρήνες προσανατολίζονται παράλληλα μ' αυτό, ενώ άλλοι αντιπαράλληλα. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι ενεργειακά χαμηλότερος από τον αντιπαράλληλο, κι αυτό ακριβώς το γεγονός αξιοποιείται στην φασματοσκοπία NMR [9]. Δηλαδή, το μόριο βομβαρδίζεται με παλμούς συγκεκριμένης συχνότητας, για να απορροφηθεί η ενέργειά τους από τους πυρήνες, και το σπιν των τελευταίων να αλλάξει κατεύθυνση.

Στην εικόνα 6, παρουσιάζεται σχηματικά η λειτουργία ενός φασματομέτρου NMR.



Εικόνα 6. Διαγραμματική απεικόνιση των μερών που απαρτίζουν ένα φασματομέτρο NMR [9].

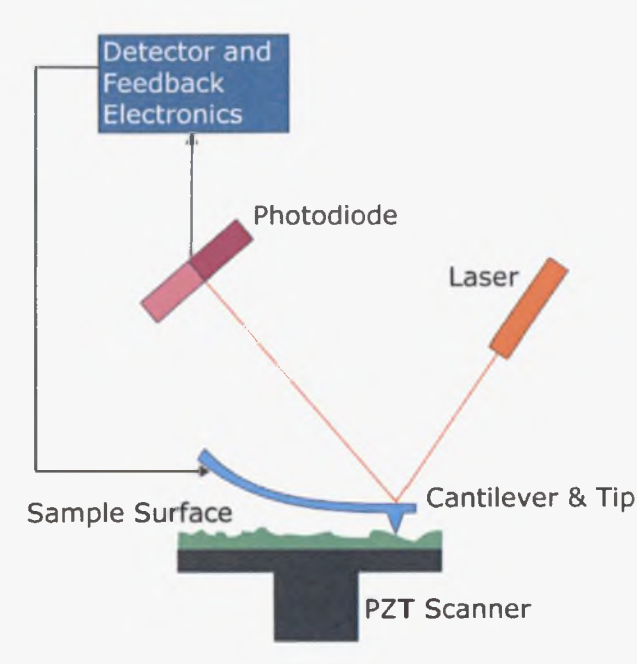
Τέλος στην εικόνα 7, παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα απορρόφησης NMR.



Εικόνα 7. Το φάσμα NMR για την οργανική ένωση οξικό μεθύλιο. Στο διάγραμμα φαίνονται οι διαφορετικές κορυφές απορρόφησης (χημικές μετατοπίσεις) που αντιστοιχούν στους πυρήνες των ατόμων άνθρακα που συναντώνται στην παραπάνω ένωση. Το TMS είναι το στοιχείο αναφοράς τετραμεθυλοσιλάνιο.

Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων

Σ' αυτήν την μέθοδο χρησιμοποιείται ένα όργανο που λέγεται μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων. Ένα διάγραμμα της αρχής λειτουργίας αυτού φαίνεται στην εικόνα 8. Το μικροσκόπιο αυτό αποτελείται από έναν βραχίονα με μία πολύ λεπτή ακίδα, η οποία σαρώνει μία επιφάνεια, ενός υλικού προς ανάλυση [10]. Όταν η ακίδα περνάει πάνω από την επιφάνεια, αναπτύσσονται δυνάμεις μεταξύ αυτής και των ατόμων της επιφάνειας, και προκαλείται μία ταλάντωση του βραχίονα. Τέτοιες δυνάμεις μπορεί να είναι δυνάμεις Van der Waals, ηλεκτροστατικές δυνάμεις, κλπ. [10]. Με την βοήθεια ενός μηχανισμού ανάδρασης ρυθμίζεται κατά την διάρκεια της σάρωσης η απόσταση ακίδας-επιφάνειας, έτσι ώστε να διατηρείται η δύναμη σταθερή. Οι μεταβολές στο ύψος της ακίδας ανιχνεύονται μέσω της ανάκλασης μιας ακτίνας Laser που προσπίπτει στο άκρο του βραχίονα. Η ανακλώμενη δέσμη Laser προσπίπτει πάνω σε ένα σύστημα φωτοδιόδων, και το σήμα που δίνει το τελευταίο, επεξεργάζεται ηλεκτρονικά για να δοθεί η εικόνα της ατομικής δομής της επιφάνειας που σαρώνεται από την ακίδα.



Εικόνα 8. Διαγραμματική απεικόνιση της λειτουργίας ενός μικροσκοπίου ατομικής δύναμης [10].

2.2.2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ Ή ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Όπως και στις πειραματικές μεθόδους, έτσι και με τις θεωρητικές, υπάρχουν μέθοδοι με τις οποίες μπορούμε να προβλέψουμε μία πρωτεϊνική αλληλεπίδραση [11], καθώς και να μελετήσουμε μία ήδη γνωστή. Όσον αφορά την πρόβλεψη μιας αλληλεπίδρασης, υπάρχουν εργαλεία της Βιοπληροφορικής που συγκρίνουν τις αμινοξικές αλληλουχίες της υπό μελέτη πρωτεΐνης με αλληλουχίες κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων για τον εντοπισμό τμημάτων των αλληλουχιών, που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.

Για την μελέτη και τον χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο πρωτεϊνών για τις οποίες γνωρίζουμε ότι αλληλεπιδρούν αλλά όχι πώς, εφαρμόζεται η μέθοδος του docking σε συνδυασμό με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Όταν η δομή των υπομονάδων ενός συμπλόκου είναι άγνωστη, τότε για τον προσδιορισμό τους καταφεύγουμε στην μέθοδο του σχεδιασμού της δομής με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας (homology modelling).

Επειδή η παρούσα εργασία πραγματεύεται τη μελέτη ενός γνωστού, συγκεκριμένου συμπλόκου, θα αναφερθούμε εν συντομία μόνο σε μεθόδους που αφορούν στον προσδιορισμό της δομής μιας πρωτεΐνης.

Σχεδιασμός δομής με βάση την ομοιότητα της ακολουθίας (Homology Modelling)

Η μέθοδος βασίζεται στην υπόθεση ότι δύο πρωτεΐνες, όσο μεγαλύτερη ομοιότητα έχουν, δηλαδή όσο περισσότερο όμοια αλληλουχία αμινοξέων έχουν, τόσο πιθανότερο είναι να έχουν παρόμοια δομή [12]. Πρακτικά γίνεται αναζήτηση μέσα στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων Brookhaven (www.rcsb.org), όπου είναι κατατεθειμένες οι επιλυμένες δομές πρωτεϊνών, με σκοπό τον εντοπισμό της πρωτεΐνης με την μεγαλύτερη ομοιότητα ακολουθίας με αυτήν της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Ακολούθως προσαρμόζεται η ακολουθία της πρωτεΐνης αγνώστου δομής στον σκελετό της γνωστής.

Πρόσδεση (Docking)

Αυτή η υπολογιστική μέθοδος χρησιμοποιείται όχι για την εύρεση της δομής μιας πρωτεΐνης, αλλά για την εύρεση του καταλληλότερου σχετικού προσανατολισμού των μορίων, ούτως ώστε να σχηματισθεί ένα σταθερό σύμπλοκο [13]. Μ' άλλα λόγια, με την μέθοδο του Docking ουσιαστικά μπορούμε να μελετήσουμε αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων, και φυσικά πρωτεϊνών. Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή στον σχεδιασμό νέων φαρμάκων, καθώς πολλά φάρμακα ασκούν τη δράση τους με το να προσδένονται και να σχηματίζουν σύμπλοκο με μία πρωτεΐνη-στόχο, π.χ. έναν υποδοχέα πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη [13]. Με το docking, μπορεί επίσης να υπολογιστεί η συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ δύο μορίων [13]. Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται η πρόσδεση ενός μικρού προσδέτη πάνω σε έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα, μία αλληλεπίδραση που μελετάται με την μέθοδο του Docking.



Εικόνα 9. Η διαδικασία της πρόσδεσης ενός μικρού προσδέτη πάνω σε έναν μεγαλύτερο πρωτεϊνικό υποδοχέα [13].

Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Μία από τις θεωρητικές μεθόδους με τις οποίες μπορούμε να μελετήσουμε πρωτεΐνες, και γενικότερα μακρομόρια, είναι οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics Simulations). Όπως υποδηλώνει και το όνομα, ουσιαστικά πραγματοποιείται μία προσομοίωση των μεταβολών των ιδιοτήτων (θέσεις ατόμων, ταχύτητες, κτλ.) ενός μοριακού συστήματος, ως συνάρτηση του χρόνου. Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής έγιναν δυνατές χάρη στην ανάπτυξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Ουσιαστικά, όλη η εργασία γίνεται σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων. Οι προσομοιώσεις που εκτελούνται στον υπολογιστή, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ μικροσκοπικών μεγεθών και χρονικών κλιμάκων και του μακροσκοπικού κόσμου του εργαστηρίου [14]. Επίσης, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος [14].

Η Μοριακή Δυναμική σχετίζεται με διαδικασίες που εξαρτώνται από τον χρόνο και που λαμβάνουν χώρα σε μοριακά συστήματα [15]. Κάθε δυναμική διεργασία (π.χ. κίνηση) έχει μία χρονική κλίμακα, ένα πλάτος, καθώς και ένα ενεργειακό εύρος [15]. Τα μακρομόρια, και συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες, εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος χαρακτηριστικών κινήσεων, από τις ατομικές ταλαντώσεις που είναι πολύ γρήγορες (fs) και πολύ εντοπισμένες, έως τις αργές κινήσεις που γίνονται στην κλίμακα ολόκληρου του μορίου, όπως μία αναδίπλωση (μs-ms) [15]. Αρκετές από αυτές τις κινήσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημική λειτουργία της πρωτεΐνης [15].

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αναλύσεων Μοριακής Δυναμικής, ανάλογα με το μοντέλο (και κατ' επέκταση τον μαθηματικό φορμαλισμό) που επιλέγεται για να αναπαραστήσει ένα φυσικό σύστημα: Οι αναλύσεις που χρησιμοποιούν τους νόμους της κλασικής μηχανικής και οι αναλύσεις που λαμβάνουν υπ' όψιν τους την κβαντομηχανική φύση του χημικού δεσμού [16]. Προς το παρόν, μόνο η «κλασική» Μοριακή Δυναμική, αυτή δηλαδή που χρησιμοποιεί τους νόμους της κλασικής μηχανικής, είναι πρακτικά εφαρμόσιμη σε προσομοιώσεις βιομοριακών συστημάτων [16].

Μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής αποτελείται από την αριθμητική, βήμα προς βήμα, επίλυση των κλασικών εξισώσεων της κίνησης [14]:

$$m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = \mathbf{f}_i \quad \mathbf{f}_i = -\frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_i}$$

Η πρώτη εξίσωση είναι η γνωστή εξίσωση του 2^{ου} Νόμου του Νεύτωνα, που μας λέει ότι η δύναμη f ισούται με τη μάζα m επί την επιτάχυνση (δεύτερη παράγωγος του r ως προς τον χρόνο). Η δεύτερη εξίσωση μας λέει ότι η δύναμη είναι η μεταβολή της δυναμικής ενέργειας u συναρτήσει της θέσης r .

Όπως γίνεται αντιληπτό, τα άτομα ενός βιομορίου δέχονται ένα σύνολο δυνάμεων λόγω της θέσης τους, για τον υπολογισμό των οποίων χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες μαθηματικές εκφράσεις που περιγράφουν το δυναμικό συναρτήσει της θέσης (συναρτήσεις δυναμικού ή force fields), όπως είναι το AMBER και το CHARMM. Στις προσομοιώσεις της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικού CHARMM, όπως θα δούμε πιο αναλυτικά παρακάτω. Μια μαθηματική συνάρτηση δυναμικού, περιλαμβάνει εξισώσεις που περιγράφουν την μεταβολή της δυναμικής ενέργειας που οφείλεται α) σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων που δεν συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό και β) σε αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εξισώσεις αυτές:

Η εξίσωση:
$$v^{LJ}(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

αφορά στην δυναμική ενέργεια λόγω αλληλεπιδράσεων Van der Waals [14]. Το δυναμικό αυτό καλείται δυναμικό Lennard-Jones. Το σ είναι η απόσταση κατά την οποία η δυναμική ενέργεια μεταξύ δύο ατόμων είναι μηδέν. Το ε έχει διαστάσεις ενέργειας. Το r είναι η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων.

Η εξίσωση:
$$v^{\text{Coulomb}}(r) = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon_0 r}$$

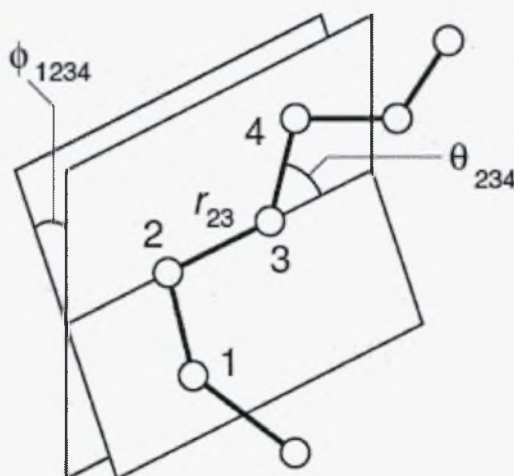
αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, και οι οποίες διέπονται από τον νόμο του Coulomb. Τα Q_1 και Q_2 είναι τα φορτία δύο ατόμων, το r είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων, ενώ το ϵ_0 είναι η διηλεκτρική σταθερά του κενού και το π είναι η γνωστή σταθερά που ισούται με 3,14.

Τέλος, η εξίσωση:

$$\begin{aligned}
 U_{\text{intramolecular}} &= \frac{1}{2} \sum_{\text{bonds}} k_{ij}^r (r_{ij} - r_{\text{eq}})^2 \\
 &+ \frac{1}{2} \sum_{\text{bend angles}} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{\text{eq}})^2 \\
 &+ \frac{1}{2} \sum_{\text{torsion angles}} \sum_m k_{ijkl}^{\phi, m} (1 + \cos(m\phi_{ijkl} - \gamma_m))
 \end{aligned}$$

αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Το δυναμικό αυτό αποτελείται από τρεις όρους: Ο πρώτος όρος περιγράφει την δυναμική ενέργεια λόγω απομάκρυνσης των ατόμων από την θέση ισορροπίας σε ομοιοπολικό δεσμό. Ο δεύτερος όρος αναφέρεται στην δυναμική ενέργεια λόγω κάμψεων και ο τρίτος στην δυναμική ενέργεια λόγω στρέψεων [14].

Τα παραπάνω γίνονται κατανοητά με την βοήθεια της εικόνας 10:



Εικόνα 10. Αναπαράσταση των γωνιών που σχηματίζονται σε ένα απλουστευμένο σύστημα επτά ατόμων που συνδέονται το ένα με το άλλο [14].

Η απόσταση r_{23} συμβολίζει την απόσταση μεταξύ των ατόμων 2 και 3, τα οποία είναι συνδεδεμένα με χημικό δεσμό [14]. Η γωνία θ_{234} συμβολίζει των γωνία μεταξύ των φορέων 2 διαδοχικών χημικών δεσμών. Τέλος, η γωνία ϕ_{1234} συμβολίζει την γωνία στρέψης. Συνοψίζοντας λοιπόν, ένα πρόγραμμα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, χρησιμοποιεί μια συνάρτηση δυναμικού και υπολογίζει από τις τρέχουσες συντεταγμένες των ατόμων σε

κάθε βήμα της προσομοίωσης και για κάθε άτομο, την συνισταμένη δύναμη που ασκείται πάνω του. Από τις δυνάμεις υπολογίζονται οι επιταχύνσεις και ακολούθως οι νέες θέσεις και ταχύτητες για χρονικό βήμα Δt (συνήθως 2 fs). Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για χιλιάδες ή εκατομμύρια βήματα.

2.2.3 Η διαδικασία μιας προσομοίωσης

Ας δούμε τώρα εν συντομία τα βήματα που ακολουθούμε σε μία προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής:

Προετοιμασία του συστήματος:

Στις προσομοιώσεις βιομορίων, συνήθως χρησιμοποιείται ως αφετηρία μία δομή που έχει αποκτηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X ή με NMR, και την οποία μπορούμε να βρούμε στην βάση δεδομένων για πρωτεΐνες Brookhaven (www.rcsb.org) [15].

Πριν αρχίσει η προσομοίωση, καλό θα ήταν να προηγηθεί μία ελαχιστοποίηση ενέργειας (βλ. υποενότητα 3.6.2.5), η οποία αφαιρεί τις ισχυρές δυνάμεις van der Waals, οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε τοπική παραμόρφωση της δομής, και κατ' επέκταση, σε μία ασταθή προσομοίωση.

Διαλυτοποίηση:

Εν συνεχεία, προστίθενται μόρια νερού για να διαλυτοποιήσουν το μόριο. Σ' αυτό το στάδιο, μπορεί να πραγματοποιηθεί μία ακόμη ελαχιστοποίηση, για να διευθετηθούν τα μόρια του νερού μεταξύ τους και με την πρωτεΐνη [15].

Προσθήκη ιόντων:

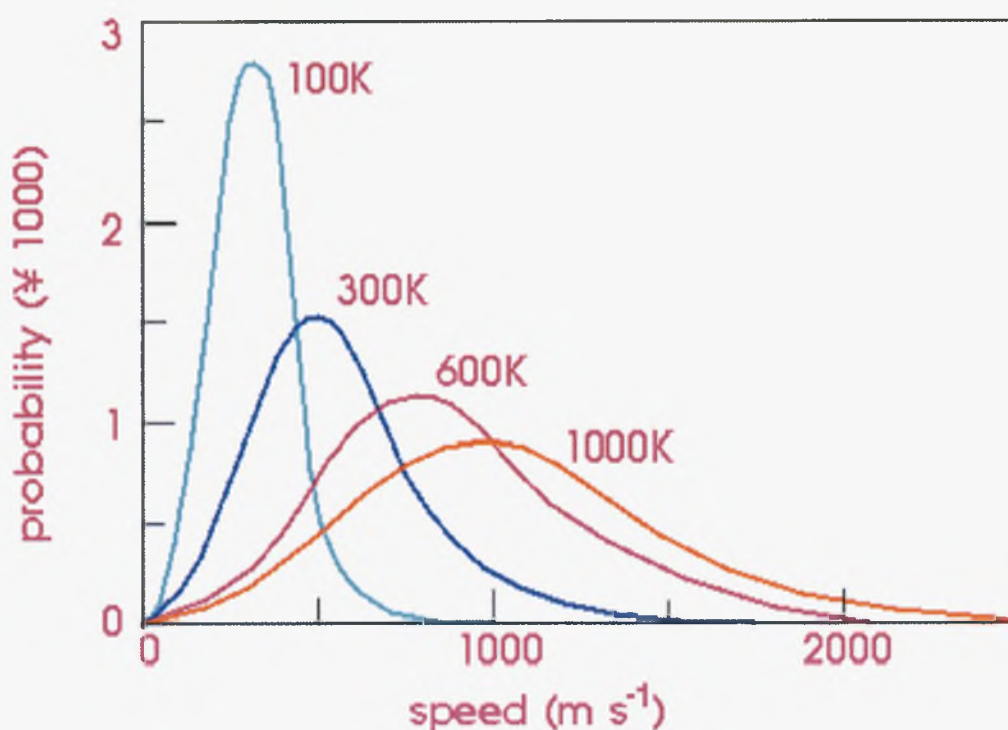
Μετά την διαλυτοποίηση, πρέπει να προστεθούν ιόντα στο σύστημα νερού-μορίου, ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η ηλεκτρική ουδετερότητα του συστήματος [20].

Ελαχιστοποίηση:

Πριν την έναρξη του κυρίως βήματος, της εξισορρόπησης, πρέπει να προηγηθεί μία ελαχιστοποίηση ενέργειας, κατά την οποία το πρόγραμμα που εκτελεί τις προσομοιώσεις, αναζητά στην ενέργεια του συστήματος ένα τοπικό ελάχιστο, μεταβάλλοντας σταδιακά τις θέσεις των ατόμων και υπολογίζοντας την ενέργεια.

Θέρμανση του συστήματος:

Ο ερευνητής επιλέγει σε ποια θερμοκρασία θα πραγματοποιηθεί η προσομοίωση, και το πρόγραμμα που εκτελεί την προσομοίωση, δίνει μία αρχική ταχύτητα σε κάθε άτομο του συστήματος, σύμφωνα με την κατανομή Maxwell-Boltzmann [15]. Στην εικόνα 11 φαίνεται η κατανομή Maxwell-Boltzmann για τις ταχύτητες των ατόμων ενός συστήματος σε διάφορες θερμοκρασίες:



Εικόνα 11. Η κατανομή Maxwell για την ταχύτητα των ατόμων ενός συστήματος σε διάφορες θερμοκρασίες [15].

Επιλογή οριακών συνθηκών:

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής μπορούν να πραγματοποιηθούν είτε σε σφαιρικές (ή και κυλινδρικές οριακές συνθήκες) οριακές συνθήκες είτε σε περιοδικές. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν σφαιρικές οριακές συνθήκες.

Στις σφαιρικές οριακές συνθήκες, το σύστημα προς μελέτη είναι τοποθετημένο μέσα σε μία σφαίρα από μόρια νερού, η οποία έχει όρια τα οποία καθορίζονται από το μέγεθος του μορίου προς μελέτη (π.χ. μιας πρωτεΐνης) [20]. Στα άτομα της σφαιρικής επιφάνειας εφαρμόζεται ένα αρμονικό δυναμικό που τα επαναφέρει όταν τείνουν να απομακρυνθούν.

Στις περιοδικές οριακές συνθήκες, το σύστημα προς μελέτη περιβάλλεται από ακριβή αντίγραφά του. Αν για παράδειγμα, μια πρωτεΐνη είναι τοποθετημένη σε έναν κύβο νερού, τότε αυτός ο κύβος περιβάλλεται από κύβους ταυτόσημους με αυτόν. Το πλεονέκτημα στις περιοδικές οριακές συνθήκες είναι ότι δίνεται στο μόριο προς μελέτη μία μεγαλύτερη ελευθερία στην κατεύθυνση που αυτό μπορεί να κινηθεί [20]. Κατά την διάρκεια της προσομοίωσης αν το μόριο ξεφύγει από τα όρια του κύβου που το περιβάλλει, πολύ απλά θα περάσει σε έναν διπλανό κύβο που είναι ακριβές αντίγραφο του αρχικού. Κατ' αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται μία πιο αξιόπιστη αναπαράσταση του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες [20].

Εξισορρόπηση:

Όταν η θερμοκρασία φτάσει στην επιθυμητή, τότε αρχίζει η φάση της εξισορρόπησης. Ο σκοπός αυτής της φάσης είναι να σταθεροποιηθούν αναφορικά με το χρόνο, διάφορες ιδιότητες του συστήματος (ανάλογα με το στατιστικό σύνολο που επιλέγουμε) όπως η ενέργεια, η θερμοκρασία, και η πίεση [15].

Φάση «παραγωγής»:

Αυτή είναι η τελευταία φάση μιας προσομοίωσης, όπου το σύστημα σε ισορροπία αφήνεται να εξελιχθεί για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα που μπορεί να ποικίλει από αρκετά πικοδευτερόλεπτα (picoseconds) έως μερικά νανοδευτερόλεπτα (nanoseconds) ή και περισσότερο [15].

Ανάλυση των αποτελεσμάτων:

Μετά το πέρας της προσομοίωσης ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τα τελευταία είναι στην ουσία μία σειρά συντεταγμένων και ταχυτήτων στο χρόνο [15]. Το πρόγραμμα που εκτελεί την προσομοίωση, αποθηκεύει ανά τακτά χρονικά διαστήματα τις συντεταγμένες και τις ταχύτητες των ατόμων του συστήματος, όπως αυτές μεταβάλλονται με τον χρόνο [15].

Για να δούμε τις αλλαγές που υπέστη το σύστημα προς μελέτη, υπολογίζονται διάφορες χρονοεξαρτώμενες ιδιότητες οι οποίες περιλαμβάνουν [15]:

Την τετραγωνική ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης ή RMSD (Root Mean Square Deviation):

Το RMSD δείχνει την απόκλιση μεταξύ δύο δομών ενός βιομορίου [15]. Η εξίσωσή του είναι η εξής:

$$RMS = \left\langle \left(r_i^\alpha - r_i^\beta \right)^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{N_i} \sum_i \left(r_i^\alpha - r_i^\beta \right)^2}$$

Το r_i^α είναι η θέση του ατόμου i στην δομή α , ενώ το r_i^β είναι η θέση του ίδιου ατόμου στην δομή β .

Η γυροσκοπική ακτίνα (Radius of Gyration), που δίνεται από την εξίσωση:

$$RadiusGyration = \sqrt{\frac{1}{N_i} \sum_i \left(r_i - r_{cm} \right)^2}$$

Η απόσταση $r_i - r_{cm}$ είναι η απόσταση ενός ατόμου από το κέντρο μάζας του μορίου.

Η μέση ενέργεια (Mean Energy), που δίνεται από την εξίσωση:

$$\langle E \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N E_i$$

3. ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο πλαίσιο της ανά χειράς εργασίας, μελετήθηκε με την υπολογιστική μέθοδο των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, το σύμπλοκο που σχηματίζουν δύο πρωτεΐνες, η λιγάση E2 Ubc9 και η Ran GTPase Activating Protein 1, με σκοπό να συγκριθεί η δομή που έχει η κάθε πρωτεΐνη όταν συμμετέχει στο σύμπλοκο, με την δομή που έχει όταν είναι ελεύθερη.

Η δομή του συμπλόκου Ubc9 – Ran GAP1 αποκτήθηκε σε μορφή αρχείου pdb, από την βάση δεδομένων για πρωτεΐνες Brookhaven (www.rcsb.org). Ένα αρχείο pdb περιέχει τις συντεταγμένες στον χώρο, κάθε ατόμου ενός μορίου [20]. Ο κωδικός του συμπλόκου που μελετήθηκε είναι 2GRO, με τον οποίο μπορεί να αναζητηθεί το σύμπλοκο, στην προαναφερόμενη βάση δεδομένων.

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το λειτουργικό σύστημα Linux.

Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος NAMD [17], σε θερμοκρασία 300K και χρήση θερμοστάτη Langevin. Χρησιμοποιήθηκαν οι συναρτήσεις δυναμικού CHARMM 27 για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Για την προετοιμασία των αρχείων για τις προσομοιώσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα VMD [18]. Για την παραγωγή των διαγραμμάτων RMSD χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Excel.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις προσομοιώσεις, από μία για τις πρωτεΐνες RanGAP1 και Ubc9 καθώς και μία για το σύμπλόκό τους. Επειδή η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια και για τις τρεις, θα περιγράψουμε αντιπροσωπευτικά μόνο την διαδικασία για την RanGAP1.

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε κατά την παρούσα εργασία, μπορεί να διαχωριστεί σε τρία μέρη: Μέρος πρώτο, στο οποίο μελετήθηκε η πρωτεΐνη Ubc9, μέρος δεύτερο, στο οποίο μελετήθηκε η πρωτεΐνη Ran GAP1, και μέρος τρίτο, στο οποίο μελετήθηκε το σύμπλοκο των δύο προαναφερθέντων πρωτεϊνών. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στο κάθε μέρος είναι τα ίδια, και παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

3.1 Προετοιμασία των αρχείων

3.1.1 Τεμαχισμός του συμπλόκου

Πριν μελετηθούν το σύμπλοκο, και οι πρωτεϊνικές συνιστώσες του, πραγματοποιήθηκε η εξής επεξεργασία του αρχείου 2GRO.pdb, που όπως είπαμε περιέχει τις συντεταγμένες των ατόμων του συμπλόκου: Με τη βοήθεια του προγράμματος VMD δημιουργήσαμε νέα αρχεία pdb, ένα αρχείο με τις συντεταγμένες της πρωτεΐνης Ubc9 μόνο, και ένα αρχείο με τις συντεταγμένες της πρωτεΐνης Ran GAP1 μόνο. Μ' άλλα λόγια, διαχωρίσαμε το σύμπλοκο στις δύο πρωτεϊνικές συνιστώσες του. Αυτός ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Ανοίξαμε το πρόγραμμα VMD, φορτώσαμε το αρχείο 2GRO.pdb και εν συνεχεία στη γραμμή εντολών του προγράμματος δώσαμε τις εξής εντολές:

- 1) `set E2 [atomselect top "protein and chain A"]`
`$E2 write E2p.pdb`
- 2) `set RAN [atomselect top "protein and chain B"]`
`$RAN writepdb RANp.pdb`

Με την πρώτη σειρά εντολών, δημιουργήσαμε το αρχείο E2p.pdb το οποίο περιέχει τις συντεταγμένες μόνο της λιγάσης E2 Ubc9. Πιο συγκεκριμένα, με την πρώτη σειρά εντολών, το πρόγραμμα επιλέγει όλα τα άτομα της αλυσίδας A, η οποία στην περίπτωσή μας, αντιστοιχεί στην λιγάση Ubc9, και αποθηκεύει ως αρχείο pdb, την αλυσίδα που επιλέξαμε. Το όνομα του νέου αρχείου pdb, είναι καθαρά επιλογή του χρήστη του προγράμματος.

Παρομοίως, με τη δεύτερη σειρά εντολών, επιλέξαμε την άλλη αλυσίδα του συμπλόκου, δηλαδή την Ran GAP 1, και την αποθηκεύσαμε ως αρχείο pdb με το όνομα RANp.pdb.

Αυτά τα 2 νέα αρχεία pdb, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της κάθε πρωτεϊνικής συνιστώσας του συμπλόκου, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, με την βοήθεια του VMD, δημιουργήσαμε το αρχείο RANp.pdb το οποίο περιέχει τις συντεταγμένες όλων των ατόμων της πρωτεΐνης Ran GAP1, εκτός των υδρογόνων, τα οποία απουσιάζουν από δομές που επιλύθηκαν με περίθλαση ακτίνων X.

3.1.2 Δημιουργία του αρχείου psf και του αρχείου pdb μαζί με τα υδρογόνα

Ένα αρχείο pdb, δεν περιέχει καμία πληροφορία για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων, των οποίων τις συντεταγμένες περιέχει. Για να πραγματοποιηθεί όμως μία προσομοίωση, είναι απαραίτητη αυτή η πληροφορία [20]. Έτσι πρέπει να δημιουργηθεί ένα αρχείο psf, που περιέχει αυτήν την πληροφορία. Το αρχείο αυτό μπορεί να δημιουργηθεί από το πρόγραμμα psfgen με βάση το αρχικό αρχείο pdb και ένα αρχείο τοπολογίας (topology file), το οποίο στην δική μας ανάλυση είναι το top_all27_prot_na.inp

Ακολουθώντας τις οδηγίες του tutorial του προγράμματος NAMD, γράψαμε ένα script, δηλαδή ένα σύνολο εντολών, με τις οποίες δημιουργήθηκε το αρχείο psf ταυτόχρονα με ένα νέο αρχείο pdb, το οποίο περιέχει ΚΑΙ τις συντεταγμένες των ατόμων υδρογόνου, όπως αυτές υπολογίστηκαν από την εφαρμογή psfgen. Το script αυτό, το οποίο αποθηκεύσαμε ως αρχείο κειμένου, με το όνομα ran.pgn, είναι το παρακάτω:

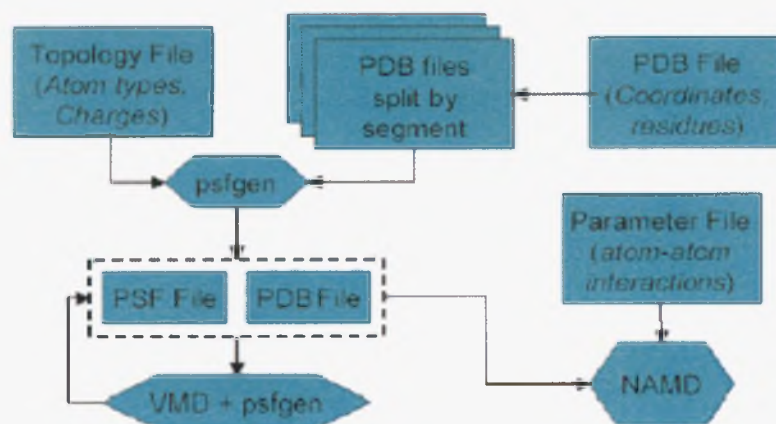
```
package require psfgen
topology top_all27_prot_na.inp
pdbalias residue HIS HSE
pdbalias atom ILE CD1 CD
segment U {pdb RANp.pdb}
coordpdb RANp.pdb U
guesscoord
writepdb ran.pdb
writepsf ran.psf
```

Για να εκτελεστούν οι εντολές του παραπάνω script, πληκτρολογήσαμε στην Tk Console του VMD την εξής εντολή:

```
source ran.pgn
```

Έτσι λοιπόν δημιουργήσαμε τα αρχεία ran.pdb και ran.psf με βάση τα οποία πραγματοποιήθηκε η προσομοίωση.

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα διάφορα αρχεία, και τα προγράμματα VMD και NAMD:



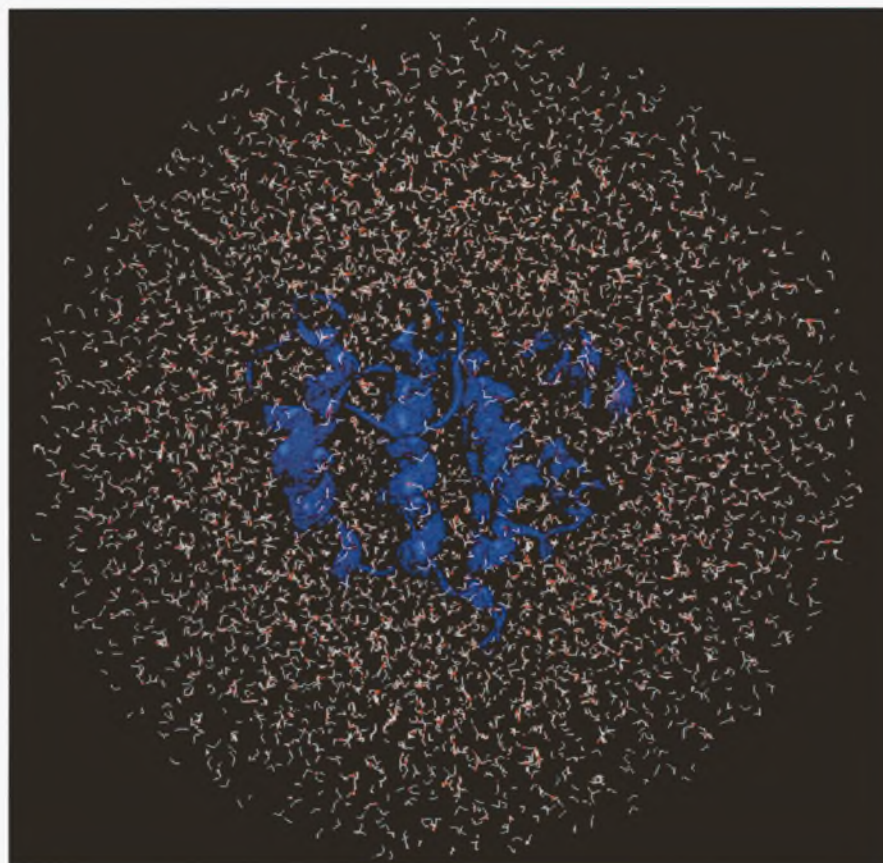
Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής που δείχνει τον τρόπο χρήσης των διαφόρων αρχείων από τα προγράμματα VMD και NAMD [20]

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1, το πρόγραμμα NAMD είναι ο τελικός προορισμός, είναι δηλαδή το πρόγραμμα που εκτελεί τις προσομοιώσεις. Το parameter file, δηλαδή το αρχείο παραμέτρων, το οποίο δεν σχολιάστηκε παραπάνω, είναι ένα αρχείο που περιέχει τις σταθερές της συνάρτησης δυναμικού για κάθε τύπο ατόμου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το αρχείο παραμέτρων `par_all27_prot_na.inp` για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.

3.1.3 Διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης σε νερό

Το επόμενο βήμα ήταν η διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης Ran GAP 1 σε μία σφαίρα νερού. Καθώς το περιβάλλον μέσα ή έξω από τα κύτταρα, όπου υπάρχουν και δρουν οι πρωτεΐνες είναι υγρό, θεωρούμε ότι η διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης προς μελέτη σε νερό, προσεγγίζει το πραγματικό της περιβάλλον [20].

Η διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης έγινε πάλι με την βοήθεια ενός script με το όνομα `Polvate.txt` και το οποίο παρατίθεται στο Παράρτημα. Αυτό το script αξιοποιεί τα αρχεία `ran.pdb` και `ran.psf`, και παράγει δύο νέα αρχεία, ένα νέο αρχείο `pdb` που περιέχει τις συντεταγμένες όλων των ατόμων της πρωτεΐνης συν των ατόμων των μορίων του νερού, και ένα νέο αρχείο `psf`, το οποίο περιέχει την πληροφορία για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων της πρωτεΐνης και των μορίων του νερού. Στην εικόνα 12, φαίνεται η πρωτεΐνη Ran GAP1, περιβαλλόμενη από μία σφαίρα νερού, όπως την παρουσιάζει το πρόγραμμα οπτικοποίησης μορίων^S MD.



Εικόνα 12. Η πρωτεΐνη RanGAP1 περιβαλλόμενη από μία σφαίρα νερού.

Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η πρωτεΐνη, ενώ με κόκκινο και άσπρο, τα μόρια νερού που την περιβάλλουν. Για να «τρέξουν» οι εντολές του script της διαλυτοποίησης από το VMD, στην Tk Console, δώσαμε την εντολή `play Solvate.txt`, αφού τροποποιήσαμε κατάλληλα το script, ούτως ώστε να αξιοποιήσει τα αρχεία `ran.pdb` και `ran.psf`.

3.1.4 Προσθήκη ιόντων

Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη ιόντων στο σύστημα, για να το καταστήσει ηλεκτρικά ουδέτερο. Η προσθήκη αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω της εφαρμογής «Autoionize» του προγράμματος VMD. Πιο συγκεκριμένα, φορτώσαμε πρώτα το αρχείο `ran_w.psf` ακολουθώντας τις επιλογές `New Molecule` → `Browse` → `i oad`. Το αρχείο αυτό είναι το αρχείο `psf` που προέκυψε από την διαλυτοποίηση. Στη συνέχεια μέσω της επιλογής `i oad Data Into Molecule`, φορτώσαμε το αρχείο `ran_w.pdb`, που ομοίως, είναι το αρχείο `pdb` που προέκυψε από την διαλυτοποίηση. Τελικά ακολουθώντας τις επιλογές `Extensions` → `Modeling` → `Add Ions` ανοίξαμε το παράθυρο με την εφαρμογή «Autoionize», και μέσω αυτής δημιουργήσαμε πάλι, δύο νέα αρχεία `pdb` και `psf`, το αρχείο `ion_ran_w.pdb` που

περιέχει τις συντεταγμένες όλων των ατόμων της πρωτεΐνης, συν των ατόμων των μορίων νερού, συν τις συντεταγμένες των ιόντων που προστέθηκαν, και το αρχείο `ion_ran_w.psf`, το οποίο περιέχει την πληροφορία σύνδεσης των ανωτέρω ατόμων.

3.2 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας

Αυτό είναι το τελευταίο βήμα πριν την εξισσορόπηση. Κατά την ελαχιστοποίηση, το πρόγραμμα που εκτελεί τις προσομοιώσεις, εδώ το NAMD, προσπαθεί να βρει ένα τοπικό ελάχιστο της ενέργειας του συστήματος προς μελέτη, από το οποίο μετά θα ξεκινήσει η εξισσορόπηση του συστήματος. Η μέθοδος ελαχιστοποίησης που εφαρμόζεται από το NAMD είναι της «συζυγούς κλίσης» (conjugate gradient). Η μέθοδος αυτή αναζητά διαδοχικές κατευθύνσεις μείωσης της δυναμικής ενέργειας με αποφυγή ελαχιστοποιήσεων στην ίδια κατεύθυνση.

Για την ελαχιστοποίηση, χρειάζεται πάλι ένα script, το οποίο υπαγορεύει στο πρόγραμμα των προσομοιώσεων, ποια αρχεία να χρησιμοποιήσει, σε ποιες συνθήκες να πραγματοποιηθεί η ελαχιστοποίηση, κτλ. Το script που χρησιμοποιήσαμε εμείς, είναι το `min_neutr.txt` και παρατίθεται στο Παράρτημα. Σ' αυτό το script ορίσαμε ότι τα αρχεία που θα χρησιμοποιηθούν από το πρόγραμμα NAMD είναι τα `ion_ran_w.psf` και `ion_ran_w.psf`, το αρχείο παραμέτρων θα είναι το `par_all27_prot_na.inp`, ορίσαμε ότι όλα τα αρχεία που θα προκύψουν από την ελαχιστοποίηση θα έχουν το πρόθεμα `min_ran`, και ότι η ελαχιστοποίηση θα πραγματοποιηθεί για 1500 βήματα. Η εντολή για την ελαχιστοποίηση δόθηκε μέσα από τη γραμμή εντολών του λειτουργικού συστήματος (εδώ του Linux) και ήταν η εξής:

```
./charmrun ++local namd2 + p2 min_neutr.txt > log_min.txt
```

Αυτή η εντολή πληροφορεί το λειτουργικό σύστημα ότι θα χρησιμοποιηθούν τα εκτελέσιμα αρχεία `charmrun` (αυτό το αρχείο χρειάζεται μόνο στο Linux) και `namd2` (το πρόγραμμα NAMD δηλαδή), ότι η ελαχιστοποίηση θα πραγματοποιηθεί «τοπικά» και παράλληλα σε δύο επεξεργαστές, και τέλος ότι το script της ελαχιστοποίησης, είναι το `min_neutr.txt`. Το `log_min.txt` είναι ένα αρχείο κειμένου στο οποίο το πρόγραμμα NAMD αποθηκεύει ανά τακτά χρονικά διαστήματα πληροφορίες για την πορεία της ελαχιστοποίησης. Στο τέλος της ελαχιστοποίησης προέκυψαν τρία νέα αρχεία, τα

min_ran.coor, min_ran.vel, και min_ran.xls. Στην παρούσα εργασία, απαραίτητο ήταν μόνο το αρχείο τύπου.coor το οποίο είναι ένα αρχείο τύπου ASCII, και το οποίο όπως ένα αρχείο pdb, περιέχει τις συντεταγμένες των ατόμων του συστήματος που προέκυψαν μετά την ελαχιστοποίηση. Αυτό το αρχείο χρησιμοποιήθηκε για την εξισορρόπηση. Η ελαχιστοποίηση θεωρείται ικανοποιητική, όταν ένα μέγεθος καλούμενο gradient tolerance, είναι μικρότερο του 10. Τα 1500 βήματα που ορίστηκαν στο script της ελαχιστοποίησης, ικανοποιούν αυτό το κριτήριο.

3.3 Εξισορρόπηση

Αυτό είναι το κυρίως βήμα της μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Ομοίως με την ελαχιστοποίηση, χρειάζεται ένα script στο οποίο ορίζονται οι συνθήκες της προσομοίωσης, τα αρχεία που θα χρησιμοποιηθούν, κτλ. Εμείς χρησιμοποιήσαμε το script με το όνομα eq.txt που παρατίθεται στο Παράρτημα. Σ' αυτό το script, ορίζουμε ότι το αρχείο παραμέτρων θα είναι το par_all27_prot_na.inp, ότι η εξισορρόπηση θα χρησιμοποιήσει τα αρχεία min_ran_w.psf και min_ran.coor (το οποίο προέκυψε από την ελαχιστοποίηση), ότι η εξισορρόπηση θα πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία 300 βαθμών Kelvin, και τέλος ότι θα πραγματοποιηθεί για 1500000 βήματα διάρκειας 2fs το καθένα, δηλαδή συνολικά για 3ns. Επίσης, ορίσαμε το κέντρο και την ακτίνα των σφαιρικών οριακών συνθηκών, πληροφορίες που πήραμε από την Tk Console του VMD, αμέσως μετά την διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης.

Ομοίως με την ελαχιστοποίηση, έτσι και στην εξισορρόπηση, η εντολή δίνεται από την γραμμή εντολών του λειτουργικού συστήματος:

```
./charmrun ++local namd2 + p2 eq.txt > log_eq.txt
```

Αυτή η εντολή διαφέρει από αυτήν για την ελαχιστοποίηση, μόνο στο script και στο αρχείο log. Με την εντολή αυτή ορίζουμε ότι το script που θα εκτελεστεί είναι το eq.txt και ότι οι πληροφορίες για την πορεία θα αποθηκεύονται στο αρχείο log_eq.txt. Στο τέλος της εξισορρόπησης προέκυψαν 10 νέα αρχεία, τα eq_ran.dcd, eq_ran.coor, eq_ran.vel, eq_ran.xsc, eq_ran.restart.xsc.old, eq_ran.restart.xsc, eq_ran.restart.vel.old, eq_ran.restart.vel, eq_ran.restart.coor.old, και eq_ran.restart.coor. Για την δική μας μελέτη, απαραίτητα είναι μόνο τα αρχεία eq_ran.dcd και eq_ran.coor. Το πρώτο είναι ένα αρχείο τύπου trajectory, που σημαίνει ότι περιέχει πληροφορίες για την τροχιά του συστήματος στο

χρόνο, δηλαδή την κατά βήματα μεταβολή των θέσεων των ατόμων στο χώρο, συναρτήσει του χρόνου. Το δεύτερο είναι binary file και περιέχει τις συντεταγμένες όλων του συστήματος, όπως αυτές προέκυψαν μετά την εξισορρόπηση.

3.4 Υπολογισμός του RMSD

Για να ολοκληρωθεί η μελέτη μας, πραγματοποιήσαμε τον υπολογισμό του RMSD, δηλαδή την απόκλιση που παρουσιάζει η δομή της πρωτεΐνης σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή, από την αρχική δομή. Μπορούμε σε ένα διάγραμμα, να αναπαραστήσουμε την μεταβολή του RMSD για κάθε στιγμιότυπο της εξισορρόπησης. Αυτά τα στιγμιότυπα περιέχονται στο αρχείο τύπου.dcd, και η συχνότητά τους ορίζεται στο script της εξισορρόπησης. Στο δικό μας script ορίστηκε ότι θα καταγράφονται στιγμιότυπα για κάθε 500 βήματα της εξισορρόπησης. Άρα συνολικά έχουμε $1500000/500 = 3000$ στιγμιότυπα. Για να θεωρήσουμε ότι η εξισορρόπηση έχει φτάσει σε ένα ικανοποιητικό σημείο, η μεταβολή του RMSD θα πρέπει να φτάνει σε ένα πλατώ, να σταθεροποιείται δηλαδή γύρω από μία τιμή.

Με την βοήθεια τώρα ενός άλλου script, συγκεκριμένα του rmsd_dcd.txt, που παρατίθεται στο Παράρτημα, δημιουργήσαμε ένα αρχείο κειμένου, το οποίο περιέχει σε μία λίστα όλες τις τιμές του RMSD που αντιστοιχούν σε κάθε στιγμιότυπο. Αυτό το script «έτρεξε» με το πρόγραμμα VMD δίνοντας την εντολή

```
play rmsd_dcd.txt
```

στην Tk Console του προγράμματος, αφού προηγουμένως είχαμε φορτώσει το αρχείο min_ran.coor ακολουθώντας τις επιλογές New Molecule→ Browse→Load και το αρχείο eq_ran.dcd ακολουθώντας τις επιλογές Load Data Into Molecule→ Browse→Load.

Τα διαγράμματα με τις μεταβολές του RMSD και για τα τρία μόρια της μελέτης μας, παρουσιάζονται παρακάτω στην ενότητα Αποτελέσματα.

3.5 Τελική ελαχιστοποίηση

Πριν κάνουμε την σύγκριση της δομής της κάθε πρωτεΐνης μέσα στο σύμπλοκο, με την δομή της ως ανεξάρτητο μόριο, πραγματοποιήσαμε μία τελευταία ελαχιστοποίηση των εξισορροπημένων δομών. Όπως και στην πρώτη ελαχιστοποίηση, και εδώ χρησιμοποιήσαμε

ένα script, στο οποίο ορίσαμε ότι θα χρησιμοποιηθεί το αρχείο eq_ran.coor που προέκυψε από την εξισορρόπηση. Κατά τα άλλα, οι υπόλοιπες παράμετροι παρέμειναν ίδιες.

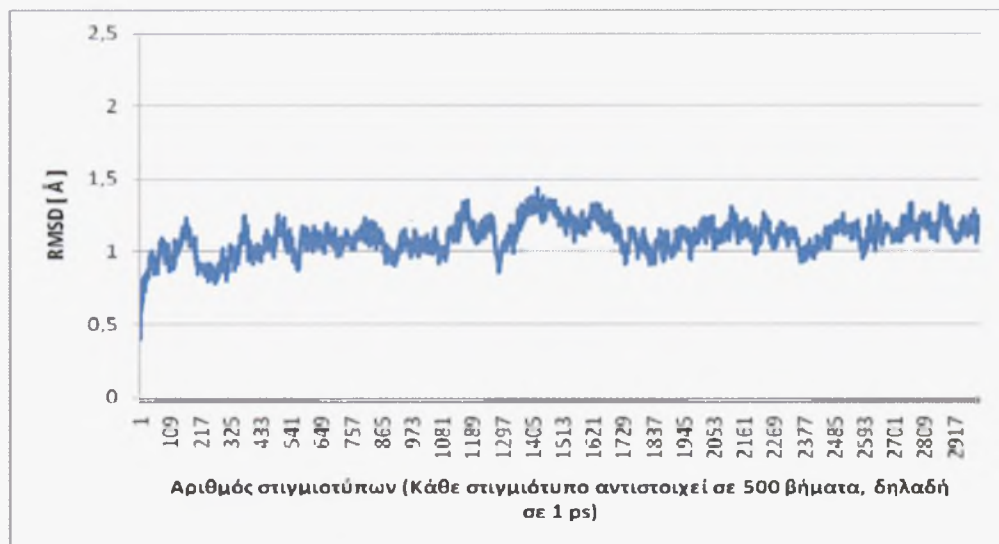
3.6 Η μελέτη της πρωτεΐνης Ubc9 και του συμπλόκου Ubc9-RanGAP1

Παραπάνω μόλις περιγράψαμε την διαδικασία για την μελέτη της πρωτεΐνης RanGAP1, με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής. Την ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθήσαμε για την άλλη συνιστώσα του συμπλόκου Ubc9-RanGAP1, την λιγάση E2 Ubc9, καθώς και για το ίδιο το σύμπλοκο. Τα αποτελέσματα της μελέτης τόσο των 2 πρωτεϊνών, όσο και του συμπλόκου τους, παρουσιάζονται παρακάτω.

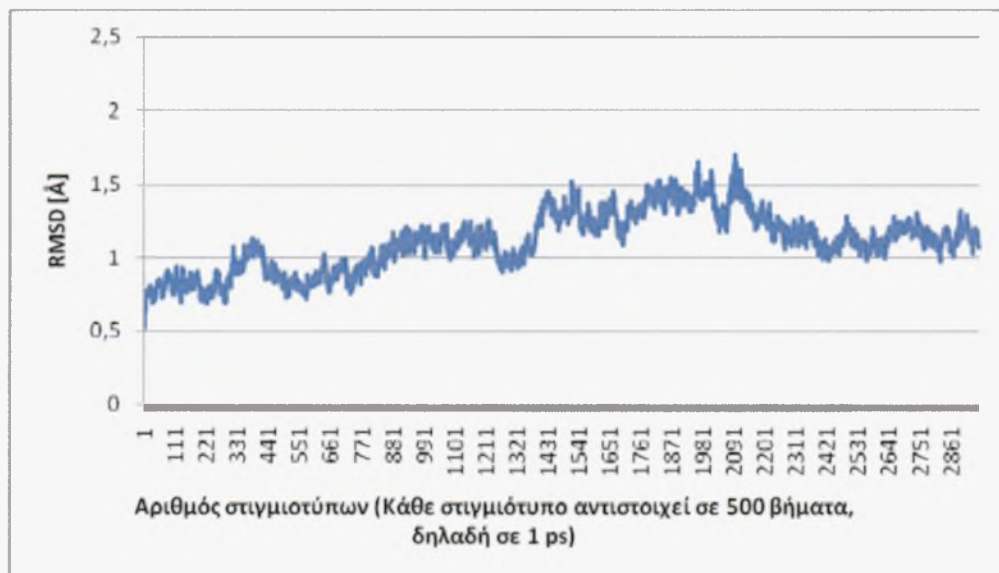
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Τα RMSD των εξισορροπήσεων

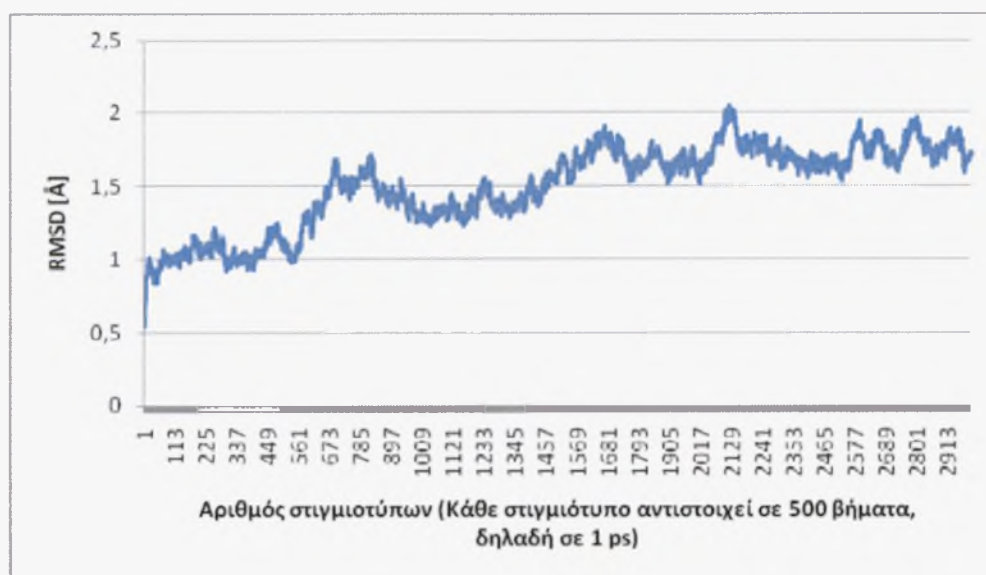
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα διαγράμματα της μεταβολής του RMSD, των στιγμιότυπων της εξισορρόπησης για την κάθε πρωτεϊνική συνιστώσα, καθώς και για το σύμπλοκο αυτών.



Διάγραμμα 2. Χρονική εξέλιξη του RMSD για την RanGAP1



Διάγραμμα 3. Χρονική εξέλιξη του RMSD για την E2 Ubc9



Διάγραμμα 4. Χρονική εξέλιξη του RMSD για το σύμπλοκο Ubc9-RanGAP1

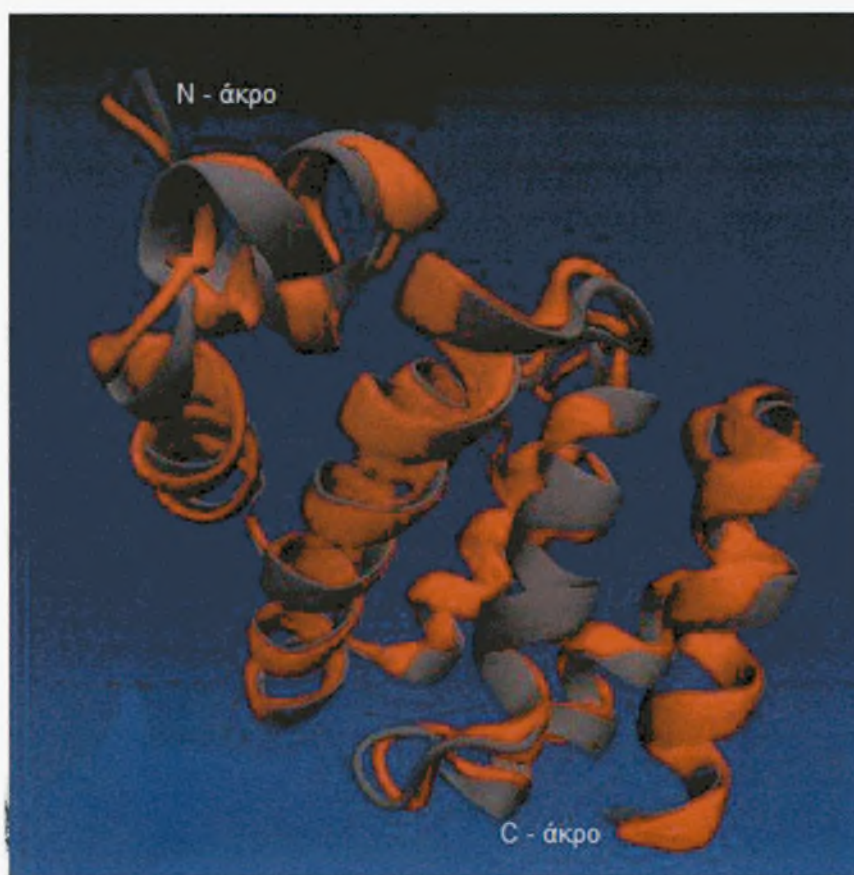
Στα διαγράμματα 2,3, και 4, φαίνεται το πώς μεταβάλλεται το RMSD από στιγμιότυπο σε στιγμιότυπο. Υπενθυμίζεται ότι κάθε στιγμιότυπο ισοδυναμεί με 500 βήματα στην εξισορρόπηση. Στον οριζόντιο άξονα των διαγραμμάτων, είναι ο αριθμός των στιγμιότυπων, ενώ στον κάθετο άξονα είναι ο δείκτης RMSD. Βλέπουμε ότι όσο πλησιάζουμε στα τελευταία στιγμιότυπα, το RMSD αρχίζει και σταθεροποιείται γύρω από μία μέση τιμή. Αυτό σημαίνει ότι η εξισορρόπηση έφτασε σε ένα ικανοποιητικό σημείο.

4.2 Σύγκριση της δομής της κάθε πρωτεϊνικής συνιστώσας σε ελεύθερη μορφή, με την δομή της μέσα στο σύμπλοκο

Η σύγκριση αυτή έγινε με το πρόγραμμα του VMD, και ουσιαστικά, και εδώ υπολογίστηκε το RMSD, η απόκλιση δηλαδή της δομής της πρωτεΐνης σε ελεύθερη μορφή, από την δομή της μέσα στο σύμπλοκο.

4.3 Επεξεργασία των αρχείων .coor της τελευταίας ελαχιστοποίησης

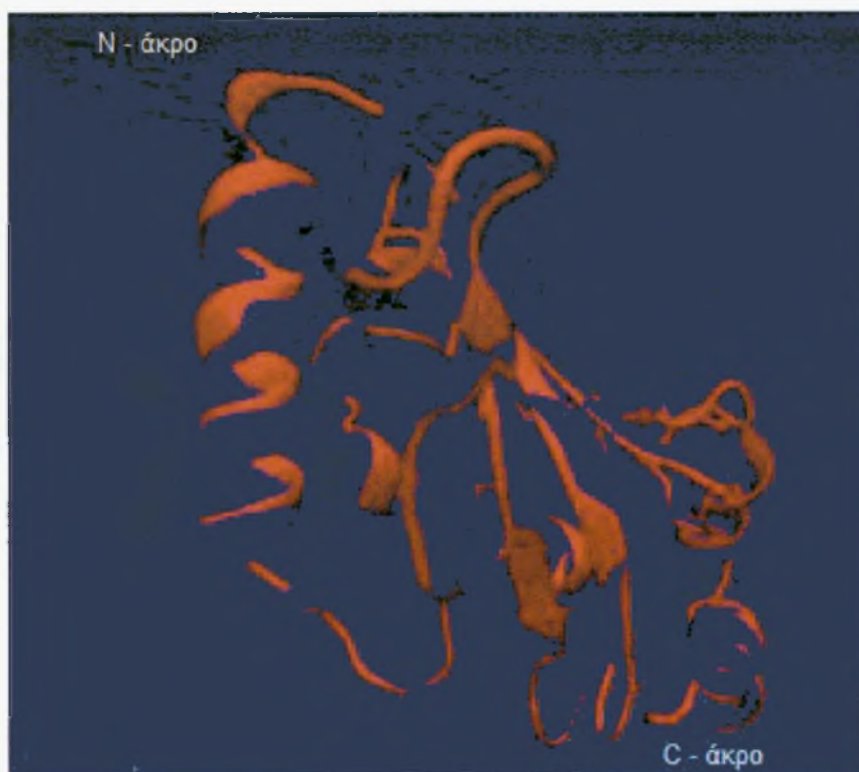
Πριν γίνει η σύγκριση, επεξεργαστήκαμε τα αρχεία .coor της τελευταίας ελαχιστοποίησης (η σύγκριση έγινε με βάση αυτά τα αρχεία, και όχι τα αρχεία .coor των εξισορροπήσεων) ως εξής: Και από τα τρία αρχεία .coor, αφαιρέσαμε χειροκίνητα (με επιλογή και delete) τα άτομα των μορίων νερού και τα ιόντα. Επίσης, από το αρχείο .coor του συμπλόκου, δημιουργήσαμε δύο νέα αρχεία pdb (υπενθυμίζεται ότι τα αρχεία pdb και .coor περιέχουν αμφότερα συντεταγμένες), ένα αρχείο που περιέχει μόνο τις συντεταγμένες



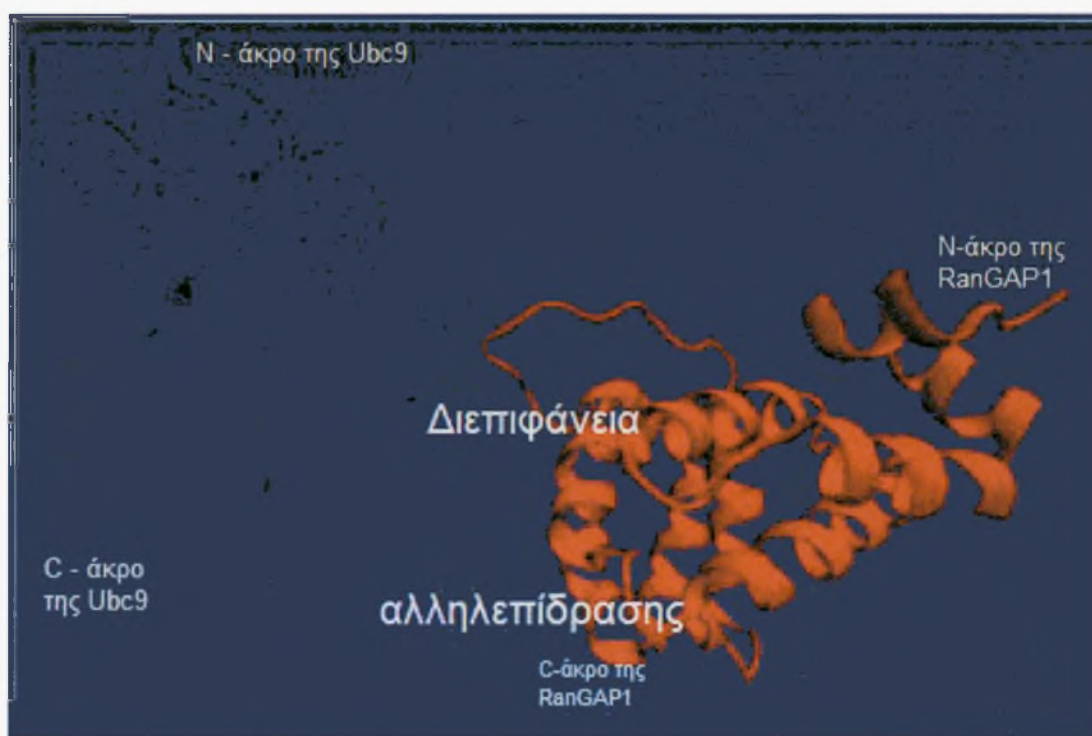
Εικόνα 13. Στοίχιση των δύο δομών της RanGAP1. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η δομή της πρωτεΐνης μέσα στο σύμπλοκο, ενώ με γκρι η δομή της σε ελεύθερη μορφή.

4.5 Σύγκριση των δομών της E2 Ubc9

Με την ίδια ακριβώς διαδικασία που ακολουθήσαμε για την RanGAP1 συγκρίναμε την ελεύθερη μορφή της Ubc9 με την δομή της μέσα στο σύμπλοκο με την RanGAP1. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 2. Οι διαφορές εντοπίζονται κυρίως στο αμινοτελικό άκρο και σε αναστροφές. Ομοίως με την RanGAP1, στην εικόνα 14 φαίνεται η στοίχιση των δύο δομών της Ubc9.

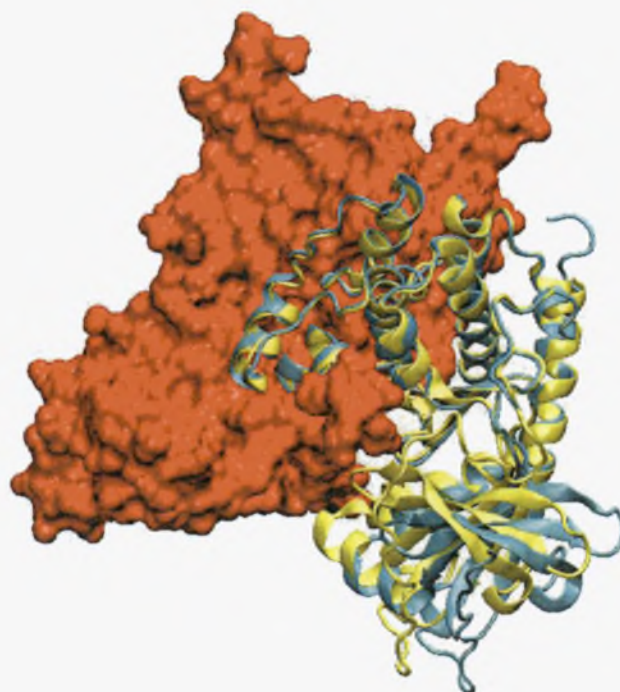


Εικόνα 14. Στοίχιση των δύο δομών της Ubc9 [18]. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η δομή της 8 bc9 μέσα στο σύμπλοκο, ενώ με μπλε η δομή της ως ελεύθερη πρωτεΐνη. Τέλος, στην εικόνα 15, φαίνεται η τελευταία ελαχιστοποιημένη δομή του συμπλόκου Ubc9-RanGAP1.



Εικόνα 15. Το σύμπλοκο Ubc9-RanGAP1 [18]. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η Ubc9, ενώ με κόκκινο η RanGAP1.

Προκειμένου να έχουμε ένα μέτρο σύγκρισης για την τιμή του RMSD όταν συγκρίνονται δομές πρωτεϊνών μεμονωμένες και σε σύμπλοκο, συγκρίναμε την κρυσταλλική δομή της καταλυτικής υπομονάδας (PDB: 1J3H) της πρωτεϊνικής κινάσης A, με αυτήν, όταν κρυσταλλώθηκε με την ρυθμιστική της υπομονάδα (PDB: 2QCS) [24]. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα οπτικοποίησης βιομορίων Swiss PDB Viewer [21], στοιχίσαμε την δομή της καταλυτικής υπομονάδας στην ελεύθερη μορφή, με την δομή που έχει στο σύμπλοκο με την ρυθμιστική υπομονάδα. Λόγω των διακοπών στην αλληλουχία που εμφανίζει το αρχείο pdb, η τιμή του RMSD=0,81 Å προέκυψε από μέρος του μορίου. Στην εικόνα 1S απεικονίζεται το σύμπλοκο μεταξύ της ρυθμιστικής και της καταλυτικής υπομονάδας, της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA).



Εικόνα 16. Ένα σύμπλοκο μεταξύ ρυθμιστικής και καταλυτικής υπομονάδας της PKA. Με κόκκινο απεικονίζεται η ρυθμιστική υπομονάδα, με γαλάζιο, η δομή της καταλυτικής υπομονάδας σε ελεύθερη μορφή, και με κίτρινο ή δομή της ίδιας υπομονάδας μέσα στο σύμπλοκο με την ρυθμιστική υπομονάδα [19].

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να μελετηθεί το κατά πόσο διαφέρουν οι δομές δύο πρωτεϊνών ενός συμπλόκου μετά από εξισορρόπηση προσομοίωσης μοριακής δυναμικής στην ελεύθερη μορφή τους από αυτήν του εξισορροπημένου συμπλόκου τους στο παράδειγμα της λιγάσης E2 Ubc9 μεταλλαγμένης στο αμινοξύ 85 (μετάλλαξη ASN→GLN), και του καρβοξυτελικού τμήματος (κατάλοιπα 419-587) ενός παράγοντα Ran GAP.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 2 του προηγούμενου κεφαλαίου, οι τιμές του σκελετικού RMSD τόσο της RanGAP1, όσο και της Ubc9, μετά από εξισορρόπηση σε σύμπλοκο η μία με την άλλη, όπως και ως ανεξάρτητα μόρια είναι μικρές (1,11 Å και 1,38 Å αντίστοιχα) και δεν είναι σημαντικά μεγαλύτερες από την τιμή 0.81 Å που έδωσε η σύγκριση της ελεύθερης καταλυτικής υπομονάδας της PKA με την δεσμευμένη σε σύμπλοκο με την ρυθμιστική της υπομονάδα. Υπενθυμίζεται ότι το RMSD της καταλυτικής υπομονάδας προέκυψε από μέρος του μορίου λόγω των διακοπών στην αλληλουχία που εμφανίζει το αρχείο pdb, και αναμένεται να ήταν μεγαλύτερη αν η σύγκριση ήταν εφικτή για όλο το μόριο. Στην εικόνα 16, οι στοιχισμένες δομές της καταλυτικής υπομονάδας, απεικονίζονται με κίτρινο και γαλάζιο χρώμα. Με κόκκινο απεικονίζεται η ρυθμιστική υπομονάδα. Η απεικόνιση της τελευταίας έγινε με σκοπό να φανεί σε ποια σημεία αλληλεπιδρούν η ρυθμιστική και η καταλυτική υπομονάδα, και πώς αυτή η αλληλεπίδραση σχετίζεται με την δομή της καταλυτικής υπομονάδας.

Εξετάζοντας τις εικόνες 13, 14 και 15, στις οποίες παρουσιάζονται στοιχισμένες οι δομές της κάθε πρωτεϊνικής συνιστώσας του συμπλόκου RanGAP1-Ubc9, όταν η κάθε μία είναι σε ελεύθερη μορφή, και όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με την άλλη, διαπιστώνουμε: α) ότι οι παρατηρούμενες αλλαγές εντοπίζονται σε αναμενόμενα ευέλικτα σημεία, όπως στο N-τελικό άκρο των δύο δομών καθώς και στην β-αναστροφή της Ubc9 και β) ότι οι διαφορές αυτές δεν εντοπίζονται στην διεπιφάνεια αλληλεπίδρασης με την άλλη πρωτεΐνη του συμπλόκου. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι εν λόγω πρωτεΐνες δεν χρειάζεται να μεταβάλουν το σχήμα τους προκειμένου να δημιουργήσουν ευσταθές σύμπλοκο.

Ομοίως, στην εικόνα 16, όπου υπάρχουν δύο σημεία αλληλεπίδρασης της καταλυτικής υπομονάδας της PKA με την ρυθμιστική, βλέπουμε ότι στο σημείο επαφής, στο οποίο φαίνεται η καταλυτική να εισχωρεί στην ρυθμιστική υπομονάδα (κόκκινη), δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές μεταξύ των δύο δομών της καταλυτικής υπομονάδας

(ελεύθερη με γαλάζιο και δεσμευμένη με κίτρινο χρώμα). Οι δύο δομές ταυτίζονται στην περιοχή αυτή της πρωτεΐνης. Αντίθετα, στο δεύτερο σημείο αλληλεπίδρασης (κάτω), διαπιστώνουμε ότι η διαμόρφωση της ελεύθερης καταλυτικής υπομονάδας διατηρεί μία απόσταση από την ρυθμιστική υπομονάδα, που υποδηλώνει, ότι η αποσταθεροποίηση του συμπλόκου επέρχεται με αλλαγή στην δομή της καταλυτικής υπομονάδας σε εκείνο το σημείο. Φαίνεται, ότι η καταλυτική υπομονάδα αποτελείται από δύο σχετικά ευέλικτες επικράτειες των οποίων οι δομές δεν μεταβάλλονται σημαντικά όταν προσδένονται με την ρυθμιστική. Ωστόσο, η σχετική θέση των δύο επικρατειών πιθανώς ρυθμίζει την αγκιστεία της καταλυτικής υπομονάδας με την ρυθμιστική.

Συμπερασματικά μπορούμε να αποφανθούμε, ότι στα δύο συστήματα που μελετήσαμε δεν προκύπτουν εκτεταμένες μεταβολές στην διαμόρφωση μεταξύ ελεύθερης και δεσμευμένης δομής. Ιδιαίτερα στα σημεία επαφής οι διαφορές είναι μηδαμινές, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η πρόσδεση. Το συμπέρασμα αυτό, προφανώς δεν μπορεί να γενικευθεί και σε άλλα συστήματα, αφού βασίζεται σε πολύ λίγες παρατηρήσεις.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] “Principles of protein-protein interactions”, Sarah A. Teichmann, *BIOINFORMATICS*, Vol. 18 Suppl. 2 2002, Page 249
- [2] Shoemaker BA, Panchenko AR (2007) “Deciphering Protein–Protein Interactions. Part I. Experimental Techniques and Databases”, *PLoS Comput Biol* 3(3): e42.
doi:10.1371/journal.pcbi.0030042
- [3] «Διακυτταρική Επικοινωνία – Μεταγωγή Σήματος», Αιμιλία Ζίφα, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Λάρισα, Φεβρουάριος 2007
- [4] “Ran GTPase cycle: One mechanism — two functions”, Frauke Melchior, *Current Biology*, Volume 11, Issue 7, R257-R260, 3 April 2001
- [5] “Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis”, Mary Dasso, *Cell Division* 2008, 3:5
doi:10.1186/1747-1028-3-5
- [6] “The SUMO Pathway Is Essential for Nuclear Integrity and Chromosome Segregation in Mice”, Karim Nacerddine, Francois Lehembre, Mantu Bhaumik, Jérôme Artus, Michel Cohen-Tannoudji, Charles Babinet, Pier Paolo Pandolfi, and Anne Dejean, *Developmental Cell*, Vol. 9, 769–779, December, 2005
- [7] http://en.wikipedia.org/wiki/X-ray_crystallography
- [8] http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_magnetic_resonance
- [9] «Οργανική Χημεία», John McMurry, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2004
- [10] http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_force_microscope
- [11] Shoemaker BA, Panchenko AR (2007) “Deciphering Protein–Protein Interactions. Part II. Computational Methods to Predict Protein and Domain Interaction Partners.”, *PLoS Comput Biol* 3(4): e43. doi:10.1371/journal.pcbi.0030043
- [12] <http://www.biochem.vt.edu/modeling/homology.html>
- [13] http://en.wikipedia.org/wiki/Docking_%28molecular%29
- [14] “Introduction to Molecular Dynamics Simulation”, Michael P. Allen, *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, Lecture Notes, Norbert Attig, Kurt Binder, Helmut Grubmüller, Kurt Kremer (Eds.), John von Neumann Institute for Computing, Juelich, NIC Series, Vol. 23, ISBN 3-00-012641-4, pp. 1-28, 2004.
- [15] <http://staff.science.nus.edu.sg/~phywjs/lecture-notes/cpnote3.pdf>

- [16] "Molecular Dynamics", Jaroslaw Meller, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001*, Nature Publishing Group / www.els.net
- [17] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>, Phillips et al., *J. Comp. Chem.* 26:1781-1802 (2005)
- [18] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>, Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38
- [19] <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>, Roger Sayle and E. James Milner-White. "RasMol: Biomolecular graphics for all", *Trends in Biochemical Sciences (TIBS)*, September 1995, Vol. 20, No. 9, p. 374.
- [20] "NAMD tutorial", University of Illinois at Urbana-Champaign, NIH Resource for Macromolecular Modelling and Bioinformatics, Beckman Institute, Computational Biophysics Workshop, October 2007
- [21] Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723. (<http://www.expasy.org/spdbv/>)
- [22] "Lysine activation and functional analysis of E2-mediated conjugation in the SUMO pathway", Yunus, A.A., Lima, C.D., (2006) *Nat.Struct.Mol.Biol.* 13: 491-499
- [23] "PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation", Kim, C., Cheng, C.Y., Saldanha, S.A., Taylor, S.S., (2007) *Cell(Cambridge,Mass.)* 130: 1032-1043
- [24] "Dynamic Features of cAMP-dependent Protein Kinase Revealed by Apoenzyme Crystal Structure", Akamine, P., Madhusudan, Wu, J., Xuong, N.-H., Ten Eyck, L.F., Taylor, S.S., (2003) *J.Mol.Biol.* 327: 159-171
- [25] «Βιοχημεία», Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2005

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

a. Το script για την διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης RanGAP1, σε μία σφαίρα νερού

```

water sphere tcl script

# finds a center of mass of the molecule (ran.pdb), place a sphere of water
# around it.

# To run execute: vmd -dispdev text -e solvate_ran.txt

proc center_of_mass {selection} {
    # some error checking
    if {[$selection num] <= 0} {
        error "center_of_mass: needs a selection with atoms"
    }
    # set the center of mass to 0
    set com [veczero]
    # set the total mass to 0
    set mass 0
    # [$selection get {x y z}] returns the coordinates {x y z}
    # [$selection get {mass}] returns the masses
    # so the following says "for each pair of {coordinates} and masses,
    # do the computation ..."
    foreach coord [$selection get {x y z}] m [$selection get mass] {
        # sum of the masses
        set mass [expr $mass + $m]
        # sum up the product of mass and coordinate
        set com [vecadd $com [vecscale $m $coord]]
    }
    # and scale by the inverse of the number of atoms
    if {$mass == 0} {
        error "center_of_mass: total mass is zero"
    }
    # The "1.0" can't be "1", since otherwise integer division is done
    return [vecscale [expr 1.0/$mass] $com]
}

#####
#
# MAIN PART STARTS HERE
#
#####

set psf      ran.psf
set pdb      ran.pdb
set box      ran_box
set psfDrop  ran_w.psf
set pdbDrop  ran_w.pdb

package require psfgen
+
resetpsf

```

b. To script για την ελαχιστοποίηση της RanGAP1

```
# NAMD CONFIGURATION FILE FOR ion_ran_w in water sphere
# protocol params

# initial config
coordinates      ion_ran_w.pdb
temperature      300K
seed             12345
outputEnergies   1

# output params
outputname       min_ran
binaryoutput     no

# integrator params
timestep         1.0

# force field params
structure        ion_ran_w.psf
paraTypeCharmm  on
parameters      par_all27_prot_na.inp
exclude          scaled1-4
1-4scaling       1.0
switching        on
switchdist       8.0
cutoff           12.0
pairlistdist     13.5
margin           0.0
stepspercycle    20

# Constraints and restraints
#fixedAtoms on
#fixedAtomsForces off
#fixedAtomsFile 1-57_move_wt.REF
#fixedAtomsCol B

minimize 1500
```

c. To script για την εξισορρόπηση της RanGAP1

```
#####
## JOB DESCRIPTION
#####
# equilibration of min_ran.coor]
#####

## ADJUSTABLE PARAMETERS
#####

structure ion_ran_w.psf
coordinates min_ran.coor
set temperature 300
set outputname eq_ran
firsttimestep 0

#####
## SIMULATION PARAMETERS
#####

# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na.inp
temperature $temperature
# Force-Field Parameters
exclude scaled1-4
l-4scaling 1.0
cutoff 12.
switching on
switchdist 10.
pairlistdist 13.5
# Integrator Parameters
timestep 2.0 # 2fs/step
rigidbonds all # needed for 2fs steps
nonbondedFreq 1
fullElectFrequency 2
stepspercycle 10
# Constant Temperature Control
langevin on # do langevin dynamics
langevinDamping 5 # damping coefficient (gamma) of 5/ps
langevinTemp $temperature
langevinHydrogen off # don't couple langevin bath to hydrogens
# Output
outputName $outputname
restartfreq 500 # 500steps = every 1ps
dcdfreq 500
outputEnergies 100
outputPressure 100

#####
## EXTRA PARAMETERS
#####

# Spherical boundary conditions
sphericalBC on
sphericalBCcenter 6.09391048949 4.09684160981 -15.723068213
sphericalBCr1 36 # distance at which the first boundary potential begins to act
sphericalBck1 10 # force constant for the harmonic boundary potential
sphericalBCex1 2

# Constraints and restraints
fixedAtoms off
fixedAtomsForces off
#fixedAtomsFile
#fixedAtomsCol B
#####
## EXECUTION SCRIPT
#####

# Minimization
#minimize 100
reinitvels $temperature;

run 1500000; # 3ns
```

d. To script για τον υπολογισμό της μεταβολής του RMSD

```
# Load from VMD Main .coor and load in molecule .dcd. (like A_HOH_ws_min.coor and A_HOH_ws_eq.dcd)
# Run from the command line this script.

set outfile [open rmsd.txt w];
set nf [molinfo top get numframes]
set frame0 [atomselect top "protein and backbone and noh" frame 0]
# rmsd calculation loop
for {set i 1} {$i < $nf} {.incr i} {
  set sel [atomselect top "protein and backbone and noh" frame $i]
  $sel move [measure fit $sel $frame0]
  puts $outfile "[measure rmsd $sel $frame0]"
}
close $outfile
```

e. Απόσπασμα από το αρχείο log της εξισορρόπησης της πρωτεΐνης RanGAP1

```
ENERGY:      2000      484.8266      1379.5802      816.2973
83.2340      -66221.4537      5390.3989      4.4222
0.0000      10980.2397      -47082.4547      298.3697
47043.5833      -47037.5419      297.8054
```

WRITING EXTENDED SYSTEM TO RESTART FILE AT STEP 2000

WRITING COORDINATES TO DCD FILE AT STEP 2000

WRITING COORDINATES TO RESTART FILE AT STEP 2000

FINISHED WRITING RESTART COORDINATES

WRITING VELOCITIES TO RESTART FILE AT STEP 2000

FINISHED WRITING RESTART VELOCITIES

PRESSURE: 2100 0 0 0 0 0 0 0 0 0

GPRESSURE: 2100 0 0 0 0 0 0 0 0 0

PRESSAVG: 2100 0 0 0 0 0 0 0 0 0

GPRESSAVG: 2100 0 0 0 0 0 0 0 0 0

```
ENERGY:      2100      495.6027      1454.1564      799.6388
```

```
78.6898      -66296.8612      5442.9388      7.6406
```

```
0.0000      10984.3233      -47033.8709      298.4806
```

```
46994.5366      -46991.4456      298.8264
```

LDB: LOAD: AVG 8.02057 MAX 8.36455 MSGS: TOTAL 48 MAXC 32 MAXP 1

None

LDB: LOAD: AVG 8.02057 MAX 8.16345 MSGS: TOTAL 48 MAXC 32 MAXP 1

Refine

PRESSURE: 2200 0 0 0 0 0 0 0 0 0

GPRESSURE: 2200 0 0 0 0 0 0 0 0 0

PRESSAVG: 2200 0 0 0 0 0 0 0 0 0

GPRESSAVG: 2200 0 0 0 0 0 0 0 0 0

```
ENERGY:      2200      492.6005      1450.2528      800.5327
```

```
71.9418      -66261.0149      5457.8015      4.4504
```

```
0.0000      10960.8771      -47022.5581      297.8435
```

```
46981.5695      -46982.8829      299.1114
```

PRESSURE: 2300 0 0 0 0 0 0 0 0 0

GPRESSURE: 2300 0 0 0 0 0 0 0 0 0

PRESSAVG: 2300 0 0 0 0 0 0 0 0 0