



Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας- βιοτεχνολογίας

**"Αποδιάταξη του παράγοντα αιμόστασης von Willebrand σε ουρία  
συγκέντρωσης 8 Μ με Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής"**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΤΣΙΓΑΡΙΔΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

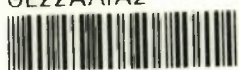
**Στοιχεία διπλωματικής εργασίας**



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

Αριθ. Εισ.: 8173/1  
Ημερ. Εισ.: 16-04-2010  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2010  
ΤΣΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

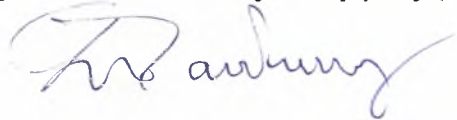


004000087106

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στην ομάδα Βιοφυσικής του εργαστηρίου Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2009-Ιανουάριος 2010 υπό την επίβλεψη του κ. Γεώργιου Παπαδόπουλου.

**Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:**

**Δρ. Παπαδόπουλος Γεώργιος (επιβλέπων), Λέκτορας Βιοφυσικής**



**Δρ. Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Βιοχημείας**



**Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας**



# Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	1
Σκοπός.....	2
Περίληψη .....	2
1.Θεωρητικό Μέρος .....	3
1.1 Ο παράγοντας αιμόστασης von Willebrand .....	3
1.2. Πρωτεϊνική αποδιάταξη-μετουσίωση. ....	9
1.2.1 Αποδιάταξη-μετουσίωση πρωτεϊνών .....	9
1.2.2 Παράγοντες αποδιάταξης. ....	11
1.2.3 Παράγοντας αποδιάταξης της μελέτης, η ουρία. ....	14
2.Μέθοδοι .....	16
2.1 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής .....	16
2.2 Πρόγραμμα μοριακής απεικόνισης (VMD) .....	19
2.3 Το πρόγραμμα μοριακής δυναμικής (NAMD) .....	19
2.4 Υπολογισμός του RMSD .....	20
2.5 Υπολογισμός της Γυροσκοπικής Ακτίνας (Radius of gyration). ....	20
2.6 Υπολογισμός των Δεσμών Υδρογόνου. ....	21
2.7 Υπολογισμός της δευτεροταγούς δομής .....	21
2.8 Υπολογισμός Native Contacts (τοπικών επαφών) .....	22
3.Πρακτικό Μέρος .....	23
3.1 Προετοιμασία για την προσομοίωση της αποδιάταξης. ....	23
3.1.1 Δημιουργία του αρχείου psf και του αρχείου pdb μαζί με τα υδρογόνα .....	23
3.1.2. Ενυδάτωση (solvate) .....	25

3.1.3. Τοποθέτηση μορίων ουρίας .....	26
3.1.4 Προσθήκη Ιόντων (Neutralization / Add Ions) .....	28
3.1.5 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (Minimization) .....	30
3.1.6 Εξισορρόπηση (Equilibration) .....	31
3.2 Πορεία των προσομοιώσεων .....	32
4. Αποτελέσματα .....	34
Παράρτημα .....	43
Βιβλιογραφία .....	45

## Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γ. Παπαδόπουλο για την συνεργασία που είχαμε, τις συμβουλές που μου έδινε, την προσοχή που επιδείκνυε κάθε φορά που αντιμετώπιζα κάποιο πρόβλημα με την πτυχιακή μου εργασία καθώς και τον χρόνο που αφιέρωσε για να μου λύνει οποιαδήποτε απορία μου δημιουργούταν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και την κ. Μ. Κοντού καθώς και τον κ. Ν. Μπαλατσό. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την στήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια που σπουδάζω. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήτρια μου Βάια Στάθη για τις συμβουλές που μου έδινε καθώς και τον Σταύρο Παπατζέλο και Νατάσσα Χαϊδεμένου με τους οποίους ήμασταν στην ίδια ομάδα εκπόνησης διπλωματικών και είχαμε άριστη συνεργασία.

## Σκοπός

Σκοπός της ανά χείρας εργασίας είναι η σύγκριση της δομικής σταθερότητας των επικρατειών A1 και A2 του παράγοντα αιμόστασης von Willebrand (vWF) σε περιβάλλον ουρίας συγκέντρωσης 8 M καθώς και η μελέτη του τρόπου αποδιάταξης αυτών σε ατομικό επίπεδο. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής.

## Περίληψη

Η ρύθμιση του μεγέθους του πολυμερούς vWF γίνεται εν μέρει μέσω της πρωτεόλυσης της επικράτειας A2 από την πρωτεάση ADAMTS13, η οποία διασπά τον δεσμό μεταξύ της τυροσίνης 1605 και της μεθειονίνης 1606. Η πρόσβαση της ADAMTS13 στην θέση κοπής εξασφαλίζεται από την μερική αποδιάταξη της A2 υπό την επίδραση μηχανικών τάσεων λόγω της ροής του αίματος. Τόσο η A1 όσο και η A3 εμφανίζουν εξαιρετική σταθερότητα απέναντι στις προαναφερθείσες τάσεις. Με σκοπό την σύγκριση της σταθερότητας των A1 και A2 χρησιμοποιήσαμε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για να μελετήσουμε την αποδιάταξη των επικρατειών A1 και A2 του vWF σε περιβάλλον ουρίας 8M και θερμοκρασία 500K. Για τις ανάγκες της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές για τις A1(1AUQ.pdb)[37] και A2(3GXB\_A2.pdb)[38], τα pdb των οποίων παρατίθενται στο παράρτημα. Οι δομικές μεταβολές των δύο επικρατειών με την πάροδο του χρόνου προσομοίωσης ποσοτικοποιήθηκαν με την βοήθεια των παραμέτρων όπως το RMSD, το ποσοστό δευτεροταγούς δομής, το πλήθος των υδρογονικών δεσμών και των native contacts (αριθμός τοπικών επαφών). Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων έδειξαν ότι η επικράτεια A2 χάνει σε συντομότερο χρονικό διάστημα τα δομικά της χαρακτηριστικά απ' ό,τι η A1. Η σχετική σταθερότητα της A1 οφείλεται πιθανότατα στην παρουσία του δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της cys 509 και της cys 695.

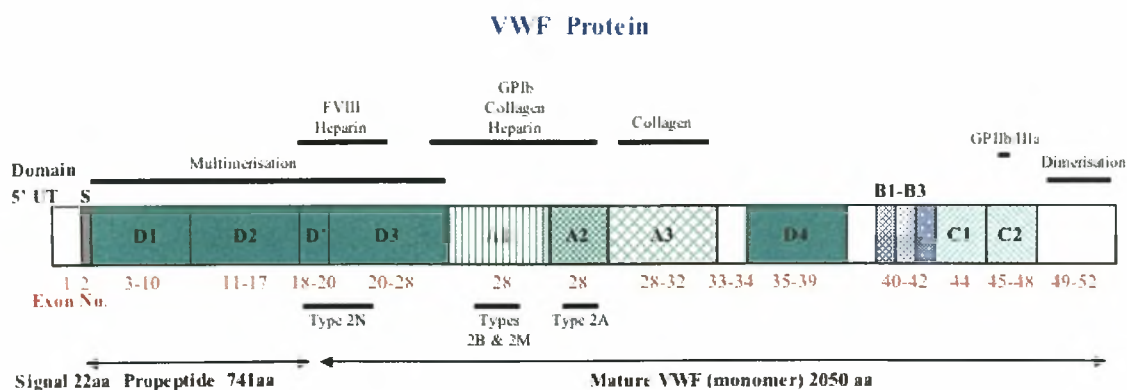
# 1.Θεωρητικό Μέρος

## 1.1 Ο παράγοντας αιμόστασης von Willebrand

Ο παράγοντας vWF είναι παράγοντας αιμόστασης. Συγκεκριμένα είναι μία γλυκοπρωτεΐνη του αίματος που διαδραματίζει τουλάχιστον δύο σημαντικούς ρόλους στα αρχικά στάδια της αιμόστασης. Συγκεκριμένα συμμετέχει στην πρόσδεση και προσκόλληση των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων στο κατεστραμμένο αγγειακό ενδοθήλιο, στο συνδετικό ιστό και σε άλλα προσκολλημένα αιμοπετάλια και τέλος σταθεροποιεί τον παράγοντα VII στο πλάσμα, έχοντας το ρόλο του μορίου το οποίο μεταφέρει τον παράγοντα VII. Ο vWF είναι μια πολυμερής πρωτεΐνη που βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος και παράγεται συνεχώς στο ενδοθήλιο (στα σωμάτια Weibel-palade), στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και υπό ενδοθηλιακά στον συνδετικό ιστό [1,2]. Οι ασθένειες με τις οποίες σχετίζεται ο vWF είναι η νόσος vWF, στην οποία νόσο ο παράγοντας είναι ελλιπής ή ελαττωματικός. Ο vWF συμμετέχει επίσης σε ένα μεγάλο αριθμό άλλων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας του συνδρόμου Χάιντε (Heyde's syndrome) και ενδεχομένως στο αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο.[3]

Το γονίδιο του vWF βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 (12p 13.2). Ο πρόδρομος vWF περιέχει 13 επικράτειες στη μονομερή του δομή, που είναι πολλαπλάσιες των τεσσάρων κύριων τύπων από το A έως το D σύμφωνα με την εικόνα 1.1 [4].





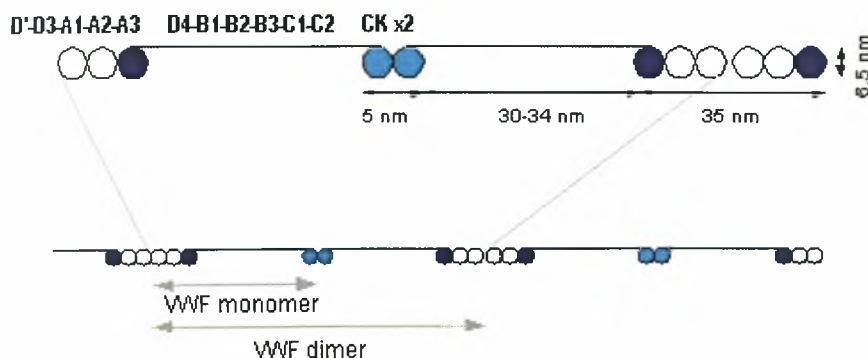
Εικ. 1.1 Η δομή ενός μονομερούς του vWF

Συντίθεται ως μονομερές των 250 kDa. Το βασικό μονομερές του είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 220.000. Ο πολυμερής vWF περιέχει 2 έως 100 υπομονάδες με μοριακά βάρη που κυμαίνονται μέχρι  $20 \times 10^6$ . Κάθε μονομερές περιέχει έναν αριθμό ειδικών περιοχών εξειδικευμένης λειτουργίας, στοιχεία των οποίων είναι:

- \* η D' / D3 επικράτεια, η οποία προσδένεται με τον Παράγοντα VIII
- \* η A1 επικράτεια, η οποία συνδέεται με:
  - α) τον υποδοχέα GPIb των αιμοπεταλίων
  - β) την ηπαρίνη
  - γ) και ενδεχομένως με το κολλαγόνο
- \* η A3 επικράτεια, η οποία συνδέεται με το κολλαγόνο
- \* η C1 επικράτεια, στην οποία ο τομέας RGD συνδέεται με την ιντεγκρίνη των αιμοπεταλίων  $\alpha IIb\beta 3$  όταν είναι ενεργοποιημένη
- \* η επικράτεια "κόμπος κυστεΐνης" (στο C-άκρο της πρωτεΐνης).

Μετά τη σύνθεσή του το πρόδρομο μόριο υφίσταται εκτεταμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση, κατά την οποία διμερίζεται μέσω πολλαπλών διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των καρβοξυτελικών άκρων των πρωτεϊνών, όπου αποκόπτονται τα προπολυπεπτίδια D1-D2 και εν συνεχεία μόλις μεταφερθεί στο σύμπλεγμα Golgi, πολυμερίζεται μέσω των δισουλφιδικών δεσμών που βρίσκονται ανάμεσα από τα διμερή μεταξύ των αμινοτελικών τους άκρων [5,6,7]. Τα τελικά πολυμερή κυμαίνονται σε μέγεθος μεταξύ 500 και 20.000 kDa και είναι τα πολυμερή

με το υψηλότερο μοριακό βάρος και με τη μέγιστη λειτουργικότητα [8,9]. Διαφέρουν μόνο ως προς τον αριθμό των μονομερών από τα οποία συνίσταται (Εικ. 1.2).



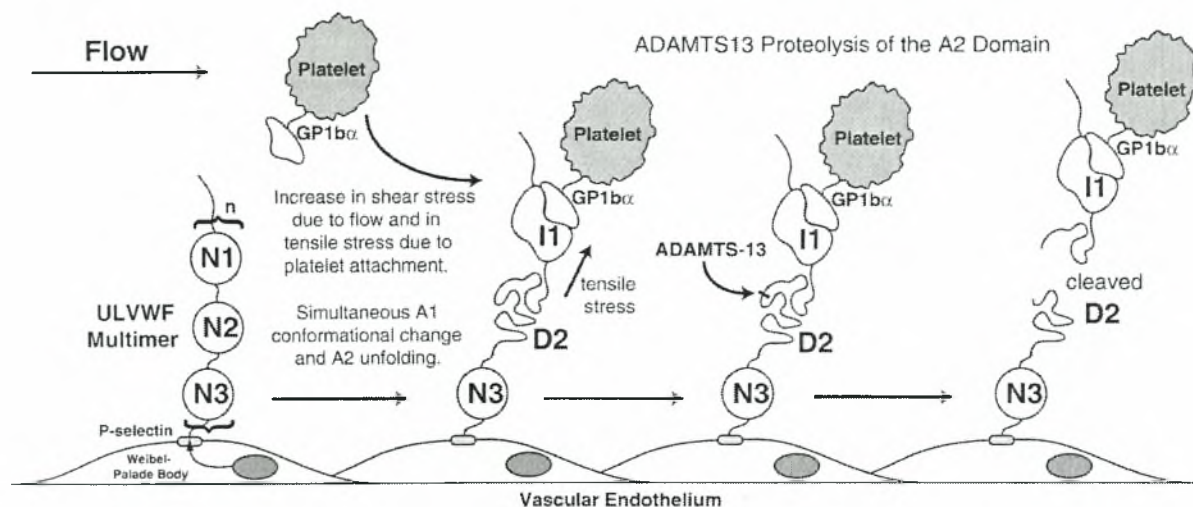
Εικ. 1.2. Το μονομερές του vWF και τα πολυμερή

Τα μεγαλύτερα πολυμερή ξεδιπλώνονται πιο άμεσα και πιο εύκολα και περιέχουν πιο πολλές θέσεις πρόσδεσης των αιμοπεταλίων [10]. Τα συγκεκριμένα πολυμερή διακρίνονται για τη μεγαλύτερη ικανότητα τους να σχηματίζουν θρόμβους. Το μέγεθος του vWF και συνεπώς η ικανότητα προσκόλλησης των αιμοπεταλίων ρυθμίζονται ώστε να εμποδιστεί ο παρεκκλίνων σχηματισμός θρόμβων πλούσιων σε αιμοπετάλια. Πιο αναλυτικά, η ρύθμιση του μεγέθους του πολυμερούς είναι επιβεβλημένη για την σωστή αιμόσταση, επειδή η κυκλοφορία των πολύ μεγάλων πολυμερών του καταλήγει σε θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, μια ασθένεια που απειλεί τη ζωή και χαρακτηρίζεται από διάχυτη μικροαγγειακή θρόμβωση [11,12,13].

Αντίστροφα, μεταλλάξεις στην επικρατεία A2 οδηγούν σε μείωση στο μέγεθος των πολυμερών λόγω υπερβολικής πρωτεόλυσης σε μια αιμορραγική διαταραχή γνωστή ως νόσο von Willebrand class 2 [14].

Όταν ένα αιμοφόρο αγγείο τραυματισθεί, τα υποκείμενα κύτταρα που βρίσκονται στο υποενδοθήλιο εκτίθενται στο αίμα. Ο vWF μπορεί να προσδέεται στο κολλαγόνο του υποενδοθηλίου μέσω των A1 και A3 επικρατειών του και εξαιτίας αυτής της πρόσδεσης και εξαιτίας των δυνάμεων που ασκεί το αίμα όταν ρέει, επάγεται μία δομική αλλαγή στον vWF που οδηγεί στο ξεδίπλωμα του. Αυτή η δομική αλλαγή εκθέτει με τη σειρά της τις θέσεις πρόσδεσης της γλυκοπρωτεΐνης (Gp)Iba, με συνέπεια την εμφάνιση των θέσεων πρόσδεσης των αιμοπεταλίων των επικρατειών A1 και C1. Μόλις προσδεθούν τα αιμοπετάλια γίνονται ενεργά και εκθέτουν στην επιφάνειά τους το GpIb/iiiα, ο οποίος δημιουργεί μία πιο στενή και πιο

σταθερή αλληλεπίδραση και με τον vWF και με το ινωδογόνο. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρέχουν την πλούσια σε φωσφατιδυλοσερίνη επιφάνεια τους, η οποία είναι καθοριστική για τη συγκρότηση των συμπλεγμάτων των προθρομβωτικών ενζύμων που οδηγούν στην παραγωγή της θρομβίνης (Εικ. 1.3).



Εικ. 1.3. Μηχανισμός πρόσδεσης του vWF στα αιμοπετάλια

Οι επικράτειες A1, A2 και A3 μεσολαβούν στις μακρομοριακές αλληλεπιδράσεις του vWF, δηλαδή μέσω αυτών πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις που αφορούν αυτόν τον παράγοντα. Όσον αφορά την πρώτη επικράτεια, της οποίας το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο ενώνονται με ένα δισουλφιδικό δεσμό, συμμετέχει στην πρόσδεση του vWF στον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα των αιμοπεταλίων Ib (GpIb). Η συγκεκριμένη επικράτεια αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 1261-1468. Αυτός είναι ο πρωταρχικός μηχανισμός μέσω του οποίου ο vWF προσδένεται στα αιμοπετάλια υπό την επίδραση ισχυρών δυνάμεων συνάφειας. Ο vWF δεν προσδένεται αμέσως αυθόρμητα στον συγκεκριμένο υποδοχέα. Πιστεύεται ότι καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν οι δομικές αλλαγές που επέρχονται μετά την πρόσδεση του παράγοντα στο κολλαγόνο του υποενδοθηλίου. Πειράματα *in vitro* απέδειξαν, ότι η πρόσδεση του vWF στα αιμοπετάλια μπορεί να επαχθεί από το αντιβιοτικό πιστοσετίνη και δύο τύπους παραγώγων της βοτροσετίνης από το δηλητήριο του φιδιού, παρόλο που οι δύο αυτές ενώσεις αντιδρούν με διαφορετικά κατάλοιπα της επικράτειας A1 [15]. Και ενώ η πρόσδεση με το κολλαγόνο επάγει την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα των αιμοπεταλίων, η σύνδεση με την ηπαρίνη, που είναι ο τρίτος προσδέτης της A1, την αναστέλλει. Η επικράτεια A2, που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα

1496-1669, περιέχει μία φυσιολογική θέση κοπής για τη μεταλλοπρωτεάση η οποία είναι συνδεδεμένη με την πρωτεάση υπό συνθήκες κανονικής κυκλοφορίας [16].

Το μέγεθος του vWF ρυθμίζεται από την πρόσφατα χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη του πλάσματος ADAMTS13. Η ADAMTS13 είναι μία πολυεπικρατής μεταλλοπρωτεάση που περιορίζει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης στον οποίο ισχυρές διατμητικές τάσεις λόγω ροής (fluid shear stress) επάγουν την πρωτεόλυση του παράγοντα και εμποδίζουν την διάχυτη μικροαγγειακή θρόμβωση [17]. Το αίμα που ρέει ασκεί μία δύναμη στον όλο και αυξανόμενο θρόμβο πλούσιο σε αιμοπετάλια. Η δύναμη αυτή ξεδιπλώνει τον vWF και εμφανίζεται τελικά η θέση κοπής για την μεταλλοπρωτεάση. Η συγκεκριμένη πρωτεάση διασπά τον vWF μεταξύ της τυροσίνης 1605 και της μεθειονίνης 1606 μέσα στην A2 επικράτεια (Εικόνα 1.4), με αποτέλεσμα να τον κόβει σε μικρότερα πεπτίδια και έτσι να απελευθερώνονται προσκολλημένα αιμοπετάλια [18]. Η πρωτεόλυση συμβαίνει μόνο εάν ο vWF έχει ξεδιπλωθεί, είτε εξαιτίας των δυνάμεων που ασκούνται κατά την ροή του αίματος, είτε λόγω παρουσίας αποδιατακτικών παραγόντων. Και οι δύο λόγοι έχουν ως αποτέλεσμα την έκθεση του εύθραυστου δεσμού της επικράτειας A2 [19]. Φυσιολογικά αυτό συμβαίνει λόγω της έκκρισης του παράγοντα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα περιορίζοντας την ικανότητα σχηματισμού θρόμβων των πολύ μεγάλων vWF που έχουν πρόσφατα εκκριθεί μετατρέποντάς τα σε μικρότερα πολυμερή. Η φύση της αναγνώρισης της ADAMTS13 είναι ελλιπώς μελετημένη. Εν μέρει, αυτό οφείλεται στην πολύπλοκη αναδίπλωση και αλληλεξάρτηση των A1-A2-A3 επικρατειών. Κάτω από χαμηλές έως στατικές συνθήκες διατμητικών τάσεων η πρωτεόλυση είναι αργή εξαιτίας της σφαιρικής διαμόρφωσης που αποκτά ο πολυμερής παράγοντας. Επιπλέον, η πολύπλοκη αναδίπλωση της A2 επικράτειας και των περιβαλλόντων επικρατειών, κρύβει πιο πολύ τον εύθραυστο δεσμό. Η πρόσδεση της μεταλλοπρωτεάσης στην A2, καθώς και σε τμήματα αυτής, έχει αποδειχτεί πως είναι υψηλής συγγένειας [20].

A2



*Εικ. 1.4 Η θέση πρωτεόλυσης στην επικράτεια A2 του vWF μεταξύ Tyr1605(μπλε) και Met1606(κόκκινο)*

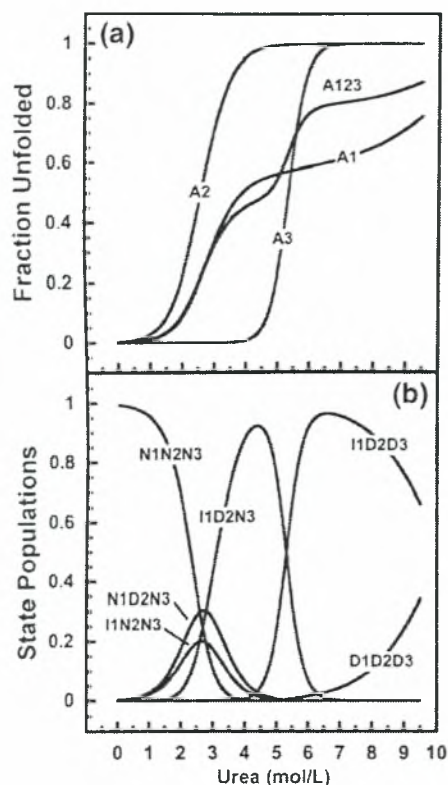
Φυσιολογικά, φαίνεται ότι η πρωτεάση κυκλοφορεί σε σύμπλεγμα με τον πολυμερή παράγοντα. Όμως η πρόσδεσή της δε χρειάζεται απαραίτητα να συνοδεύεται από πρωτεόλυση [21].

Πρόσφατα έχει αποδειχτεί, ότι η A1 αναστέλλει την πρόσβαση της πρωτεάσης στη θέση κοπής στην A2. Αυτή η αναστολή εξαλείφεται κατά την παρουσία του Grp1b, του κύριου προσδέτη της A1, υποδεικνύοντας ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η πρόσδεση των αιμοπεταλίων μπορεί να αυξάνει την πρωτεόλυση είτε αυξάνοντας την πρόσβαση στον εύθραυστο δεσμό είτε αποκαλύπτοντας τη θέση πρόσβασης της πρωτεάσης. Επίσης πρέπει να τονίσουμε, ότι ο vWF είναι το μοναδικό γνωστό υπόστρωμα για την ADAMTS13 στο πλάσμα [22]. Επιπλέον ο vWF είναι ανθεκτικός στην ADAMTS13 μέχρι να υποβληθεί σε διατμητικές τάσεις ροής.

Η σχετική σταθερότητα των επικρατειών A1, A2 και A3 μελετήθηκε από τους Auton και συνεργάτες [23], οι οποίοι συνέκριναν το ποσοστό της δευτεροταγούς δομής του A2 με αυτή των A1 και A3 υπό διαφορετικές συνθήκες pH και συγκεντρώσεων ουρίας. Συγκεκριμένα βρέθηκε, ότι αυξανόμενου του pH απαιτείται χαμηλότερη συγκέντρωση ουρίας για την επίτευξη του ίδιου βαθμού αποδιάταξης (εικόνα 1.5 a). Συγκρίνοντας τις ελεύθερες ενέργειες αποδιάταξης  $\Delta G_{N \rightarrow D}$ , διαπιστώθηκε τετραπλάσια σταθερότητα της A3 σε σχέση με την A2. Η αποδιάταξη τόσο της A2 όσο και της A3 ακολουθεί κινητική δύο καταστάσεων  $N \rightarrow D$ . N=native (φυσιολογική), D=denaturate (αποδιαταγμένη).

Η A1 επικράτεια ξεδιπλώνεται μέσω μιας ενδιάμεσης δομής (I=intermediate, ενδιάμεση), ακολουθούμενη από την σταδιακή της αποδιάταξη προσεγγίζοντας τις μετουσιωμένες καταστάσεις της A2 και A3 σε υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας. Κατά την μετάβαση  $N \rightleftharpoons I$ , η A1 επικράτεια προχωράει αναστρέψιμα από τη φυσιολογική προς την ενδιάμεση κατάσταση. Ωστόσο, το όριο διαλυτότητας της ουρίας (10 M), επιτρέπουν να προσδιορισθεί μόνο το ήμισυ της μετάβασης  $I \rightarrow D$ . Έτσι δεν μπορεί να ελεγχθεί η αναστρεψιμότητα της  $I \rightleftharpoons D$  και μπορεί μόνο να τεθεί ως υπόθεση. Άρα ενώ η A2 και A3 ξετυλίγονται από την φυσιολογική απευθείας στην αποδιαταγμένη, η A1 έχει και την ενδιάμεση δομή. Όση ενέργεια χρειάζεται σε pH 8 η A2 (3.46 kcal/mol) για να περάσει από την φυσιολογική στην αποδιαταγμένη μορφή, τόση περίπου χρειάζεται και η A1 (3.51 kcal/mol) για να μεταβεί από την φυσιολογική στην ενδιάμεση [23].





Εικ. 1.5 (α) Το ποσοστό αποδιάταξης των μεμονωμένων επικρατειών A1, A2, καθώς και του συνεχόμενου μορίου A1-A2-A3, σε pH 8 και 25°C. Στο (β) βλέπουμε τους σχετικούς πληθυσμούς της κατάστασης του A1-A2-A3 ως συνάρτηση της συγκέντρωσης ουρίας. N = φυσιολογική μορφή, I = ενδιάμεση μορφή, και D = μετουσιωμένη μορφή [23].

Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας βασισθήκαμε στα αποτελέσματα της προαναφερθείσης δημοσίευσης [23], προκειμένου να μελετήσουμε την σχετική σταθερότητα των επικρατειών A1 και A2 καθώς και τον τρόπο με τον οποίο αποδιατάσσονται. Προς τον σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε περιβάλλον ουρίας 8M σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία (500K) για επιτάχυνση της μετουσίωσης.

## 1.2. Πρωτεϊνική αποδιάταξη-μετουσίωση.

### 1.2.1 Αποδιάταξη-μετουσίωση πρωτεϊνών

Ως μετουσίωση πρωτεϊνών ορίζουμε συνήθως την οποιαδήποτε μη-ομοιοπολική αλλαγή στη δομή μιας πρωτεΐνης. Αυτή η αλλαγή μπορεί να τροποποιήσει τη δευτεροταγή, τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή του μορίου. Για παράδειγμα, η εφαρμογή ορισμένων εξωτερικών συνθηκών στρες, χρήση χημικών ουσιών, όπως ισχυρών οξέων ή βάσεων, μεγάλων συγκεντρώσεων

ανόργανων αλάτων, οργανικού διαλύτη (π.χ. ουρία ή χλωροφόρμιο), ή θερμότητα, μπορεί να προκαλέσουν αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης. Αν οι πρωτεΐνες σε ένα ζωντανό κύτταρο είναι μετουσιωμένες, αυτό οδηγεί σε διακοπή της δραστηριότητας των κυττάρων και ενδεχομένως σε κυτταρικό θάνατο. Οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες μπορούν να παρουσιάζουν διάφορα χαρακτηριστικά, όπως απώλεια της αρχικής διαλυτότητας της φυσιολογικής πρωτεΐνης .

Όταν μια πρωτεΐνη μετουσιώνεται, οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές αλλάζουν, αλλά οι πεπτιδικοί δεσμοί μεταξύ των αμινοξέων είναι άθικτοι. Δεδομένου ότι η δομή των πρωτεϊνών καθορίζει τη λειτουργία τους, μια πρωτεΐνη δεν μπορεί να επιτελέσει τη λειτουργία της όταν έχει μετουσιωθεί. Είναι σκόπιμο να εξετάσουμε το πώς γίνεται η αποδιάταξη στα διάφορα επίπεδα της πρωτεϊνικής δομής.

Κατά τη μετουσίωση τεταρτοταγούς δομής, οι υπομονάδες της πρωτεΐνης αποσυνδέονται ή διαταράσσεται η χωρική τους διάταξη.

Στην μετουσίωση τριτοταγούς δομής περιλαμβάνεται η διακοπή αλληλεπιδράσεων μεταξύ γειτονικών στοιχείων δευτεροταγούς δομής. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι:

- \* Οι δισουλφιδικοί δεσμοί (γέφυρες μεταξύ ομάδων κυστεΐνης)
- \* Οι μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου μεταξύ πολικών πλευρικών αλυσίδων
- \* Οι ιοντικές γέφυρες μεταξύ ηλεκτρικά φορτισμένων αμινοξέων
- \* Οι δυνάμεις Van der Waals μεταξύ μη πολικών αμινοξικών πλευρικών αλυσίδων.
- \* Οι υδρογονικοί δεσμοί

Η αποδιάταξη των στοιχείων δευτεροταγούς δομής προέρχεται από ρήξη των δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιούν α-έλικες και β-φύλλα.

Η πρωτοταγής δομή, δηλαδή η αλληλουχία των αμινοξέων που συγκρατούνται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς πεπτιδικούς δεσμούς, δεν διαταράσσεται από μετουσίωση [24].

#### Απώλεια λειτουργίας

Οι περισσότερες πρωτεΐνες χάνουν την βιολογική τους λειτουργία όταν μετουσιώνονται. Για παράδειγμα, τα ένζυμα χάνουν τη δραστηριότητα τους, διότι τα υποστρώματα δεν μπορούν πλέον να συνδεθούν με την ενεργό περιοχή, επειδή κατάλοιπα αμινοξέων που συμμετέχουν στη σταθεροποίηση των υποστρωμάτων δεν είναι πλέον σε θέση να το πράξουν. Η μετουσίωση

επίσης προκαλεί και αλλαγές που επηρεάζουν το βέλτιστο pH, την βέλτιστη θερμοκρασία και την εξειδίκευση της αντίδρασης, και γενικά ό,τι αφορά το ρυθμό και τη διαδικασία της αντίδρασης. Όμως σε πολλές πρωτεΐνες, η μετουσίωση είναι αναστρέψιμη (οι πρωτεΐνες μπορούν να ανακτήσουν τη φυσιολογική τους δομή, όταν απομακρύνεται η αιτία που προκαλεί τη μετουσίωση). Αυτό ήταν ιστορικά σημαντικό, καθώς οδήγησε στην ιδέα ότι όλες οι πληροφορίες που χρειάζονται οι πρωτεΐνες για να αναλάβουν την φυσιολογική τους δραστηριότητα ήταν κωδικοποιημένες στην πρωτοταγή δομή τους, και κατά συνέπεια στο DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη [25].

### 1.2.2 Παράγοντες αποδιάταξης.

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες οι οποίοι προκαλούν αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ας τους δούμε έναν προς έναν:

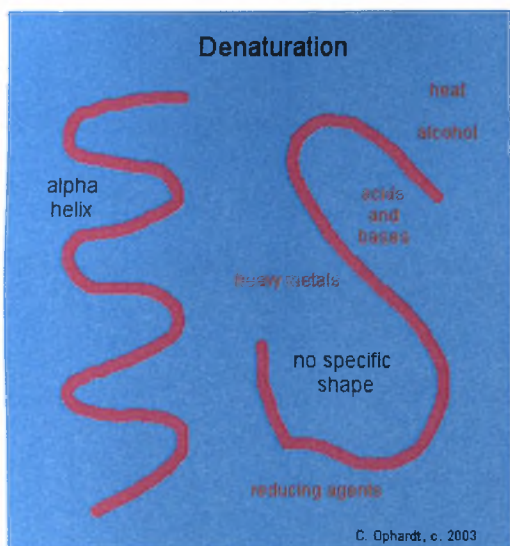
Πρώτος παράγοντας που προκαλεί αποδιάταξη είναι η θερμότητα. Η θερμότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαταράξει δεσμούς υδρογόνου και μη πολικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αυτό συμβαίνει επειδή η θερμότητα αυξάνει την κινητική ενέργεια και επιβάλλει στα μόρια να δονούνται τόσο γρήγορα και βίαια ώστε να διακόπτονται οι δεσμοί. Έτσι οι πρωτεΐνες του αυγού μετουσιώνονται και πήζουν κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. Κι άλλα τρόφιμα μαγειρεύονται για να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες και να διαμορφωθούν σε κατάλληλα υποστρώματα για τα ένζυμα. Τα ιατρικά εργαλεία και τα θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται με θέρμανση για να καταστραφούν οι πρωτεΐνες των βακτηρίων και επομένως να αδρανοποιηθούν τα βακτήρια (Εικ.1.6).

Ένας άλλος παράγοντας μετουσίωσης είναι η αλκοόλη (αιθυλική) η οποία διαταράσσει τους δεσμούς υδρογόνου υποκαθιστώντας άλλοτε τον δότη και άλλοτε τον δέκτη πρωτονίων. Δεσμοί υδρογόνου δημιουργούνται μεταξύ αμιδικών ομάδων στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών, ενώ εμφανίζονται επίσης στις πλευρικές αλυσίδες και στην τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Ένα διάλυμα αλκοόλης 70% χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό στο δέρμα. Στην συγκέντρωση αυτή η αλκοόλη είναι σε θέση να διαπεράσει το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και να μετουσιώσει τις πρωτεΐνες και τα ένζυμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Αντίθετα, ένα διάλυμα αλκοόλης 95% απλώς συσσωματώνει τις πρωτεΐνες στο εξωτερικό του τοιχώματος των κυττάρων και αποτρέπει οποιαδήποτε την είσοδο της αλκοόλης στο κύτταρο. Η αλκοόλη μετουσιώνει τις πρωτεΐνες

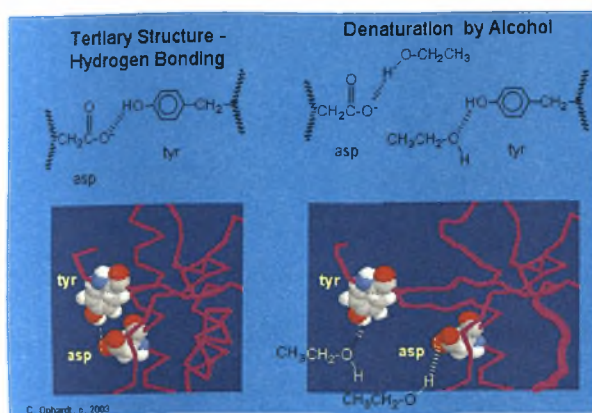


διαταράσσοντας τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου των πλευρικών αλυσίδων. Νέοι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ των μορίων αλκοόλης και των πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών (Εικ.1.7).

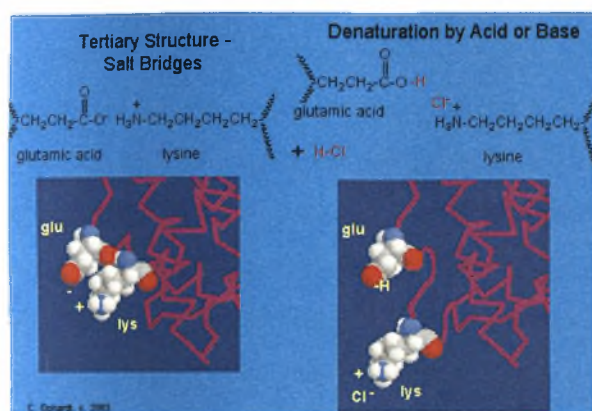
Επίσης τα οξέα και οι βάσεις είναι αποδιατακτικοί παράγοντες αφού αποκόπτουν τους ιοντικούς δεσμούς (salt bridge) ως αποτέλεσμα εξουδετέρωσης ενός οξέος και μίας αμίνης των πλευρικών αλυσίδων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ της θετικά φορτισμένης αμμινικής ομάδας και της αρνητικά φορτισμένης ομάδας του οξέος. Ένας τύπος αυτής της διπλής αντίδρασης-αντικατάστασης πραγματοποιείται όταν θετικά και αρνητικά ιόντα στο άλας ανταλλάσσονται με θετικά και αρνητικά ιόντα που προέρχονται από την προσθήκη οξέος ή βάσης (Εικ.1.8). Την ίδια ακριβώς διαδικασία έχουμε κατά την αποδιάταξη με άλατα βαρέων μετάλλων (άλατα που περιέχουν  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Ag^{+1}$ ,  $Tl^{+1}$ ,  $Cd^{+2}$  και άλλα μέταλλα με μεγάλο ατομικό αριθμό). Πέραν αυτού, τα βαρέα μεταλλικά άλατα μπορούν επίσης να αποδιοργανώσουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, λόγω της υψηλής συγγένειας και έλξης για το θείο και να οδηγήσουν και με αυτόν τον τρόπο στην μετουσίωση των πρωτεϊνών (Εικ.1.9) [26].



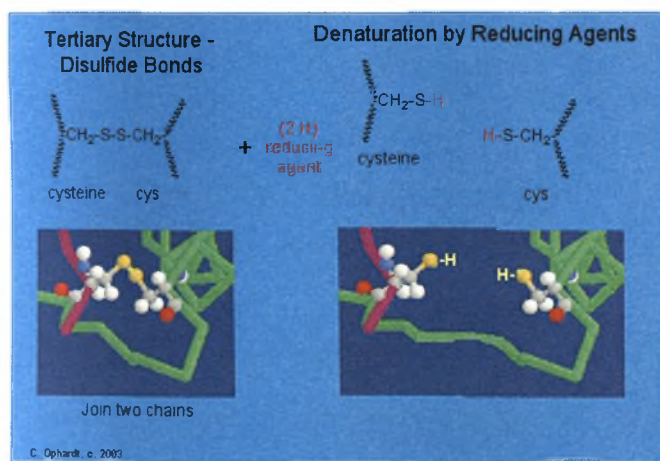
Εικ.1.6. Αποδιάταξη μέσω θερμότητας



Εικ.1.7. Αποδιάταξη μέσω αλκοόλης 70%



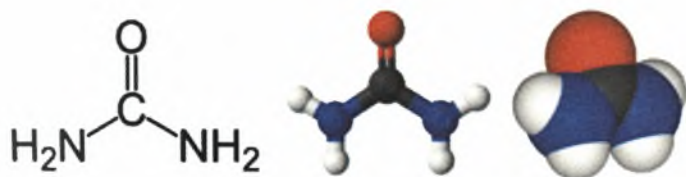
Εικ.1.8. Αποδιάταξη με οξύ ή βάση



Εικ.1.9. Αποδιάταξη των δισουλφιδικών δεσμών με βαρέα μεταλλικά άλατα

### 1.2.3 Παράγοντας αποδιάταξης της μελέτης, η ουρία.

Προκειμένου να μελετηθεί η σχετική σταθερότητα των επικρατειών A1 και A2 του vWF, χρησιμοποιήθηκε ουρία σε συγκέντρωση 8M. Η ουρία ή καρβαμίδη είναι μια οργανική ένωση με το χημικό τύπο  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  (Εικ.1.10). Το μόριο έχει δύο αμίνες ( $-\text{NH}_2$ ) που ενώνονται με μία καρβονυλική ( $-\text{CO}-$ ) λειτουργική ομάδα. Η ουρία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των αζωτούχων ενώσεων στα ζώα, και γι' αυτό περιέχεται σαν ουσία στα ούρα των θηλαστικών. Είναι υλικό στερεό, άχρωμο, άοσμο, δεν είναι όξινο ούτε αλκαλικό, είναι ιδιαίτερα διαλυτό στο νερό, καθώς και σχετικά μη τοξικό. Η ουρία χρησιμοποιείται ευρέως στα λιπάσματα ως μια βολική πηγή αζώτου. Είναι επίσης μια σημαντική πρώτη ύλη για τη χημική βιομηχανία. Η σύνθεση της εν λόγω οργανικής ένωσης από τον Friedrich Wöhler το 1828 ήταν σημαντικό ορόσημο στην ανάπτυξη της χημείας. Οι όροι ουρία και καρβαμίδη (carbamide) χρησιμοποιούνται επίσης για μια κατηγορία χημικών ενώσεων που μοιράζονται την ίδια λειτουργική  $\text{RR}'\text{N}-\text{CO}-\text{NRR}'$ , δηλαδή μια ομάδα καρβονυλίου που πλαισιώνεται από δύο οργανικά κατάλοιπα αμινών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το καρβαμύδιο του υπεροξειδίου, η αλλαντοΐνη, και η υδαντοΐνη. Η ουρία ανακαλύφθηκε στα ούρα το 1773 από τον γάλλο χημικό Hilaire Rouelle. Η ουρία σε συγκεντρώσεις έως και 10M είναι ένας ισχυρός μετουσιωτικός παράγοντας πρωτεϊνών που διαταράσσει τους μη-ομοιοπολικούς δεσμούς. Επίσης μπορεί να αξιοποιηθεί για την αύξηση της διαλυτότητας ορισμένων πρωτεϊνών [27].



Εικ.1.10. Μοριακός τύπος ουρίας

#### Μοριακός μηχανισμός δράσης της ουρίας

Πιστεύεται ότι η ουρία δρα με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς, έναν έμμεσο και έναν άμεσο. Ο έμμεσος μηχανισμός έχει να κάνει με την αλλαγή της δομής του διαλύτη βάσει της οποίας αποδυναμώνει το υδροφοβικό αποτέλεσμα. Ο άμεσος μηχανισμός έγκειται στην επιδιαλυτοποίηση της πρωτεΐνης τόσο από την ουρία, όσο και από το νερό. Στον έμμεσο μηχανισμό η ουρία θεωρείται "διασπαστής της δομής του νερού" (water-structure breaker) που

διαταράσσει την ικανότητα του νερού να διατηρεί τετραεδρικούς δεσμούς υδρογόνου με άλλα μόρια νερού. Αυτή η ιδέα παραμένει αμφιλεγόμενη, και αρκετοί επιστήμονες έχουν απορρίψει αυτή την θεωρία. Ωστόσο, υπάρχει επίσης το επιχείρημα, ότι οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται από το νερό στο κέλυφος ενυδάτωσης γύρω από την ουρία είναι πιο εύκαμπτοι απ' ό,τι στον κύριο όγκο νερού. Με τη σειρά του, ο άμεσος μηχανισμός περιλαμβάνει δύο πτυχές: Την αλληλεπίδραση της ουρίας με μη πολικές διαλυμένες ουσίες και την αλληλεπίδραση με πολικές διαλυμένες ουσίες κυρίως μέσω των υδρογονικών δεσμών. Η αλληλεπίδραση ουρίας-μη πολικών ομάδων έχει κυρίως εντροπικό χαρακτήρα. Το υδροφοβικό αποτέλεσμα αποδυναμώνεται λόγω της αντικατάστασης από το μη πολικό κέλυφος ενυδάτωσης, των περίπου τεσσάρων μορίων του νερού από το μεγαλύτερο μόριο της ουρίας. Σε αυτή την κατάσταση τα απελευθερωμένα μόρια του νερού ανακτούν την εντροπία τους. Επιπλέον, το μέγεθος της ουσίας του διαλύτη φαίνεται να είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την ελεύθερη ενέργεια μεταφοράς και την ελεύθερη ενέργεια σχηματισμού κοιλότητας. Ο παράγοντας αυτός μπορεί να εξηγήσει το ανώμαλο υδροφοβικό αποτέλεσμα στο οποίο υπόκειται ένα ζεύγος μορίων μεθανίου, όταν βυθίζεται σε υδατικό διάλυμα ουρίας. Το μέγεθος του συν-διαλύτη είναι επίσης σημαντικό, επειδή η δημιουργία κοιλότητας είναι πιο ευνοϊκή στην παρουσία μεγάλων συν-διαλυτών και ακόμη περισσότερο αν έχουν επίσης μειωμένη πυκνότητα υδρογονικών δεσμών συγκριτικά με το νερό. Ο λόγος σχετίζεται στενά με την ισορροπία μεταξύ της απώλειας του ελεύθερου προσανατολισμού των μορίων του διαλύτη (εντροπική συνεισφορά) και της προσπάθειας να διατηρηθούν οι δεσμοί υδρογόνου, όταν μια διαλυτή ουσία ή ένα μόριο συν-διαλύτη εισάγεται στο σύστημα. Όσον αφορά την αλληλεπίδραση της ουρίας με πολικές ομάδες πρωτεϊνών, η αύξηση της επιδιαλυτοποίησης αποδόθηκε στη διαμόρφωση ευνοϊκότερων δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πεπτιδικών αμιδικών ομάδων και της ουρίας απ' ό,τι με το νερό, διότι η ίδια η ουρία είναι ένα διάλυμα αμιδίου. Επίσης έχει διατυπωθεί η άποψη, ότι η ουρία προκαλεί μία διαδικασία μετουσίωσης τύπου «έξω-μέσα» προσκολληόμενη στην επιφάνεια των φορτισμένων καταλοίπων με αποτέλεσμα την μεταξύ τους απομάκρυνση. Το αποτέλεσμα της απομάκρυνσης είναι να δοθεί η δυνατότητα στα μόρια του νερού να εισχωρήσουν στο εσωτερικό της πρωτεΐνης και να προκαλέσουν την αποδιάταξή της. Αυτό εξηγεί την ανάγκη της υψηλής συγκέντρωσης ουρίας για την επίτευξη της μετουσίωσης [28].

## 2.ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 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 [29]. Επίσης, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος [29].

Η Μοριακή Δυναμική σχετίζεται με διαδικασίες που εξαρτώνται από τον χρόνο και που λαμβάνουν χώρα σε μοριακά συστήματα [30]. Κάθε δυναμική διεργασία (π.χ. κίνηση) έχει μία χρονική κλίμακα, ένα πλάτος, καθώς και ένα ενεργειακό εύρος [30]. 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) [30]. Αρκετές από αυτές τις κινήσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημική λειτουργία της πρωτεΐνης [30].

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 [31]. Προς το παρόν, μόνο η «κλασική» Μοριακή Δυναμική, αυτή δηλαδή που χρησιμοποιεί τους νόμους της κλασικής μηχανικής, είναι πρακτικά εφαρμόσιμη σε προσομοιώσεις βιομοριακών συστημάτων [31].

Μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής αποτελείται από την αριθμητική, βήμα προς βήμα, επίλυση των κλασικών εξισώσεων της κίνησης [29]:



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

Η πρώτη εξίσωση είναι η γνωστή εξίσωση του 2ου Νόμου του Νεύτωνα, που μας λέει ότι η δύναμη  $\mathbf{f}$  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:

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

Η εξίσωση:

αφορά στην δυναμική ενέργεια λόγω αλληλεπιδράσεων Van der Waals [29]. Το δυναμικό αυτό καλείται δυναμικό Lennard-Jones. Το  $\sigma$  είναι η απόσταση κατά την οποία η δυναμική ενέργεια μεταξύ δύο ατόμων είναι μηδέν. Το  $\epsilon$  έχει διαστάσεις ενέργειας. Το  $r$  είναι η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων.

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

Η εξίσωση:

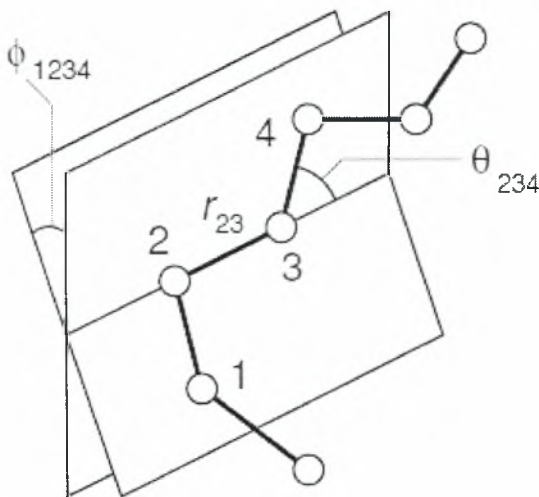
αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, και οι οποίες διέπονται από τον νόμο του Coulomb. Τα  $Q_1$  και  $Q_2$  είναι τα φορτία δύο ατόμων, το  $r$  είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων, ενώ το  $\epsilon_0$  είναι η διηλεκτρική σταθερά του κενού και το  $\pi$  είναι η γνωστή σταθερά που ισούται με 3,1416.

Τέλος, η εξίσωση:

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

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 [29].

Τα παραπάνω γίνονται κατανοητά με την βοήθεια της εικόνας 2.1:



**Εικόνα 2.1.** Αναπαράσταση των γωνιών που σχηματίζονται σε ένα απλουστευμένο σύστημα επτά ατόμων που συνδέονται το ένα με το άλλο [29].

Το  $r_{23}$  συμβολίζει την απόσταση μεταξύ των ατόμων 2 και 3, τα οποία είναι συνδεδεμένα με χημικό δεσμό [29]. Η  $\theta_{234}$  συμβολίζει την γωνία μεταξύ των φορέων 2 διαδοχικών χημικών δεσμών. Τέλος, η γωνία  $\phi_{1234}$  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  $\Delta t$  (συνήθως 2 fs). Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για χιλιάδες ή εκατομμύρια βήματα.

## 2.2 Πρόγραμμα μοριακής απεικόνισης (VMD)

Το VMD είναι ένα πρόγραμμα γραφικών σχεδιασμένο για τη διαδραστική οπτικοποίηση και ανάλυση των βιοπολυμερών, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, και μεμβράνες. Το VMD τρέχει σε όλα τα είδη Unix (όπως είναι τα linux), Apple MacOS X, and Microsoft Windows. Το πρόγραμμα αυτό μπορεί να φορτώσει τροχιές συντεταγμένων ατόμων, από προγράμματα μοριακών προσομοιώσεων όπως AMBER, Charmm, DLPOLY, Gromacs, MMTK, NAMD, X-PLOR, και πολλά άλλα. Το VMD ενσωματώνει interpreters για τις γλώσσες scripting Python και Tcl, με την βοήθεια των οποίων μπορούμε να επεξεργασθούμε τα δεδομένα (θέσεις ατόμων και ταχύτητες) που προκύπτουν από τις προσομοιώσεις ως συνάρτηση του χρόνου.[32]

## 2.3 Το πρόγραμμα μοριακής δυναμικής (NAMD)

Οι Προσομοιώσεις Μοριακής δυναμικής (MD) υπολογίζουν τις ατομικές τροχιές με την επίλυση των εξισώσεων της κινηματικής χρησιμοποιώντας εμπειρικές συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας (Force Fields, FF), όπως το πεδίο δυνάμεων CHARMM, που προσεγγίζει τα πραγματικά ατομικά δυναμικά στα συστήματα βιοπολυμερών. Για τη διεξαγωγή προσομοιώσεων MD, διάφορα προγράμματα υπολογιστών έχουν αναπτυχθεί. Αυτά τα προγράμματα αναπτύχθηκαν αρχικά για σειριακές μηχανές. Η προσομοίωση μεγάλων μορίων, όμως, απαιτεί τεράστια υπολογιστική ισχύ. Ένας τρόπος να επιτευχθεί η προσομοίωση είναι η αξιοποίηση παράλληλων υπολογιστών. Για τις ανάγκες της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα NAMD που είναι σχεδιασμένο να λειτουργεί αποτελεσματικά σε παράλληλους επεξεργαστές για την προσομοίωση μεγάλων μορίων. Το FF που χρησιμοποιείται από το NAMD είναι το ίδιο με εκείνο που χρησιμοποιείται από τα προγράμματα CHARMM και X-PLOR. Το NAMD ενσωματώνει τον αλγόριθμο Particle Mesh Ewald (PME), ο οποίος λαμβάνει υπόψη όλες τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.



Αυτός ο αλγόριθμος μειώνει την υπολογιστική πολυπλοκότητα από  $O(N^2)$  σε  $O(N \log n)$  [33]. Ένα ακόμη πλεονέκτημα του NAMD είναι ότι λειτουργεί σε συνεργασία με το VMD. Δηλαδή, ένα σύστημα που υποβάλλεται σε προσομοίωση με το NAMD μπορεί να προβληθεί και να τροποποιηθεί με το VMD.

## 2.4 Υπολογισμός του RMSD

Μια από τις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της μεταβολής της δομής σε σχέση με την αρχική δομή συναρτήσει του χρόνου, είναι το RMSD (root mean square deviation) [Εξίσ. 1].  $R$  είναι το διάνυσμα θέσης του κάθε ατόμου στην πρωτεΐνη,  $t$  είναι ο χρόνος και  $N$  είναι το πλήθος των ατόμων της πρωτεΐνης. Μπορούμε σε ένα διάγραμμα, να αναπαραστήσουμε την μεταβολή του RMSD για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης. Για να θεωρήσουμε ότι η αποδιάταξη έχει φτάσει σε ένα ικανοποιητικό σημείο, η μεταβολή του RMSD θα πρέπει να είναι μεγάλη και να διαφοροποιείται αρκετά από την αρχική. Ο υπολογισμός του RMSD γίνεται με την βοήθεια του script `rmsd_dcd.tcl` (Παράρτημα), το οποίο «έτρεξε» με το πρόγραμμα VMD δίνοντας την εντολή `play rmsd_dcd.tcl` στην Tk Console του προγράμματος. Προηγουμένως είχαμε φορτώσει το αρχείο `.coor` της αρχικής `minimize` και πάνω σε αυτό φορτώναμε το `.dcd` αρχείο που επιθυμούσαμε.

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

όπου το  $r_i^\alpha$  είναι η θέση του ατόμου  $i$  στην δομή  $\alpha$ , ενώ το  $r_i^\beta$  είναι η θέση του ίδιου ατόμου στην δομή  $\beta$ .

## 2.5 Υπολογισμός της Γυροσκοπικής Ακτίνας (Radius of gyration).

Μια άλλη παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της αποδιάταξης είναι η γυροσκοπική ακτίνα  $R_g$  [Εξίσ. 2] [35]. Το μέγεθος αυτό είναι ευαίσθητο σε μεταβολές του όγκου καθώς και της συμμετρίας του μορίου.  $\mathbf{r}_k$  είναι το διάνυσμα θέσης του ατόμου  $k$  και  $\mathbf{r}_{\text{mean}}$  είναι η θέση του γεωμετρικού κέντρου.

$$R_g^2 \stackrel{\text{def}}{=} \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \left( \mathbf{r}_k - \mathbf{r}_{\text{mean}} \right)^2, \quad (2)$$

Για τον υπολογισμό του Radius of gyration χρησιμοποιήσαμε ένα άλλο script, συγκεκριμένα το `rad_of_gyr.tcl`, που παρατίθεται στο Παράρτημα και το οποίο δημιουργεί για κάθε `dcd` μία λίστα με όλες τις τιμές της γυροσκοπικής ακτίνας για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης. Αυτό το script «έτρεξε» με το πρόγραμμα VMD όμοια με προηγουμένως.

## 2.6 Υπολογισμός των Δεσμών Υδρογόνου.

Ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας άλλος δείκτης της δομικής σταθερότητας των πρωτεϊνών. Για τη μελέτη μας, υπολογίσαμε τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου που υπάρχουν σε κάθε ένα στιγμιότυπο της προσομοίωσης τόσο στην A1 όσο και στην A2 επικράτεια του vWF. Αυτό μας δίνει την διαφοροποίηση τους με την πάροδο του χρόνου (ps). Προκειμένου να υπολογίσουμε τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου με την βοήθεια του VMD, φορτώνουμε το αρχείο `.coor` της αρχικής ελαχιστοποιημένης δομής και πάνω σε αυτό φορτώνουμε το αρχείο τροχειάς (`.dcd`) που θέλαμε να αναλύσουμε. Έπειτα στο παράθυρο που ανοίγει με VMD `main: Extensions` → `Analysis` → `Hydrogen Bonds` ορίζουμε το μονοπάτι αποθήκευσης του αρχείου με τα αποτελέσματα.

## 2.7 Υπολογισμός της δευτεροταγούς δομής

Στο πείραμα αποδιάταξης των A1 και A2 στο οποίο αναφερόμαστε στην εργασία αυτή [23], μετρήθηκε το ποσοστό της δευτεροταγούς δομής για διαφορετικές συνθήκες pH και συγκέντρωσης ουρίας. Προκειμένου να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων με αυτά του πειράματος, υπολογίσαμε το ποσοστό της δευτεροταγούς δομής, δηλαδή το ποσοστό των ατόμων των αμινοξέων που μετέχουν σε α-έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης. Η επίδραση της ουρίας αναμένεται να αποσταθεροποιήσει τις πρωτεΐνες και να παρατηρηθεί σταδιακή μείωση του ποσοστού της δευτεροταγούς δομής. Ο υπολογισμός των ποσοστών αυτών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ενός άλλου script, συγκεκριμένα του `sec_str_A1_500.tcl`, που παρατίθεται στο Παράρτημα. Αυτό το script «έτρεξε» με το πρόγραμμα VMD δίνοντας την εντολή `play sec_str_A1_500.tcl` στην Tk Console του προγράμματος, αφού προηγουμένως είχαμε φορτώσει το αρχείο `.coor` της αρχικής ελαχιστοποιημένης δομής και πάνω σε αυτό φορτώσαμε το προς ανάλυση αρχείο `.dcd`.

## 2.8 Υπολογισμός Native Contacts (τοπικών επαφών)

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό της δομικής κατάστασης των A1 και A2 κατά την διάρκεια των προσομοιώσεων χρησιμοποιήσαμε και την παράμετρο native contacts [36]. Η παράμετρος αυτή αποδίδει μια μέση τιμή (επί του συνόλου των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης) του αριθμού των τοπικών γειτόνων ατόμων του πρωτεϊνικού σκελετού, τα οποία δεν γειτνιάζουν στην αμινοξική αλυσίδα (απέχουν περισσότερο από τρία κατάλοιπα). Οι native contacts έχουν μέγιστη τιμή στην φυσιολογική (native) κατάσταση και αναμένεται να μειώνονται κατά την αποδιάταξη. Η δομική επικράτεια που είναι πιο ασταθής θα έχει και την μεγαλύτερη μείωση. Ο υπολογισμός των ποσοστών αυτών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ενός script, συγκεκριμένα του nat\_cont\_A1.tcl, που παρατίθεται στο Παράρτημα. Αυτό το script «έτρεξε» με το πρόγραμμα VMD δίνοντας την εντολή play nat\_cont\_A1.tcl στην Tk Console του προγράμματος, αφού προηγουμένως είχαμε φορτώσει το αρχείο .coord της αρχικής ελαχιστοποιημένης δομής και πάνω σε αυτό φορτώσαμε το προς ανάλυση αρχείο .dcd.

## 3. Πρακτικό Μέρος

### 3.1 Προετοιμασία για την προσομοίωση της αποδιάταξης.

#### 3.1.1 Δημιουργία του αρχείου psf και του αρχείου pdb μαζί με τα υδρογόνα

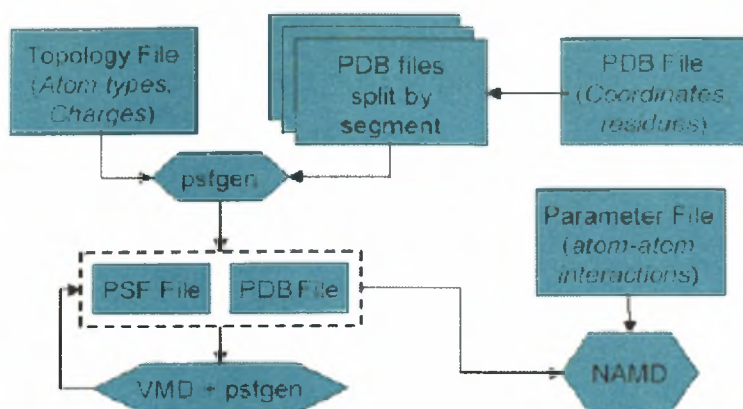
Ένα αρχείο pdb, δεν περιέχει καμία πληροφορία για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων, των οποίων τις συντεταγμένες περιέχει. Για να πραγματοποιηθεί όμως μία προσομοίωση, είναι απαραίτητη αυτή η πληροφορία [34]. Έτσι πρέπει να δημιουργηθεί ένα αρχείο psf, που περιέχει αυτήν την πληροφορία. Το αρχείο αυτό μπορεί 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 Tcl script, δηλαδή ένα σύνολο εντολών, βάσει των οποίων το psfgen δημιουργεί το αρχείο psf καθώς και ένα νέο αρχείο pdb (η απεικόνιση της πρωτεΐνης σε αυτήν την μορφή μέσω του VMD παρουσιάζεται στην εικόνα 3.1), το οποίο περιέχει και τις συντεταγμένες των ατόμων υδρογόνου. Το script παρατίθεται στο παράρτημα

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

```
source A1SS.pgn
```

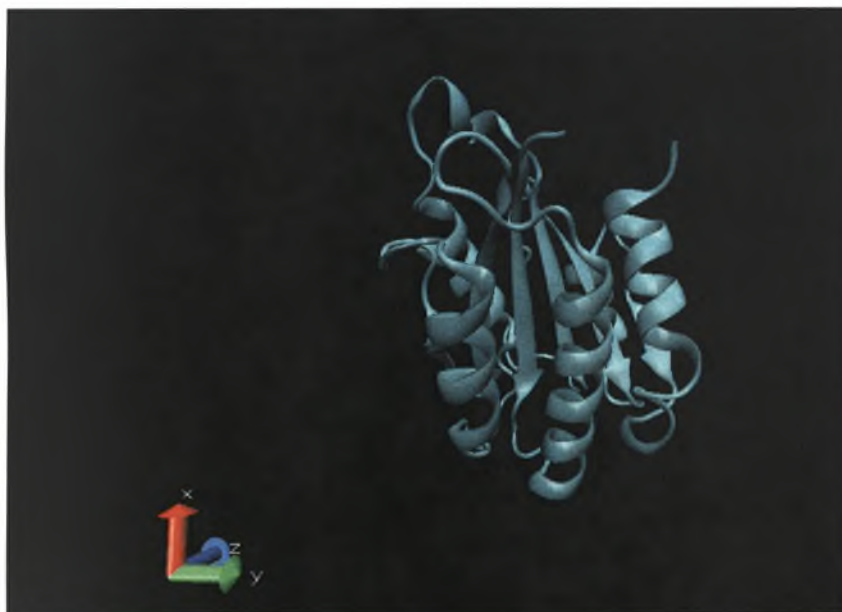
Έτσι λοιπόν δημιουργήσαμε τα αρχεία A1SS.pdb και A1SS.psf με βάση τα οποία πραγματοποιήθηκε η προσομοίωση. Ομοίως πράξαμε και για την A2 επικράτεια με την διαφορά ότι είχαμε διαφορετικό script το οποίο παρατίθεται στο παράρτημα.

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 [34]

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.



**εικόνα 3.1** η απεικόνιση της A2 επικράτειας μετά την δημιουργία των αρχείων `pdb` και `psf` μέσω του `psfgen`

### 3.1.2. Ενυδάτωση (solvate)

Πριν από την ενεργειακή ελαχιστοποίηση (energy minimization) και κατόπιν την εξισορρόπηση (equilibration), πρέπει να διαμορφωθούν οι κατάλληλες συνθήκες γύρω από το μόριο της πρωτεΐνης ώστε να προσεγγίζουν αυτές της πραγματικότητας. Επειδή το άμεσο περιβάλλον της πρωτεΐνης που μελετάμε είναι υδατικό, αυτό που πρέπει να κάνουμε είναι να τροποποιήσουμε το μοντέλο του συστήματος προσθέτοντας νερό. Συνήθως δημιουργούμε μία σφαίρα που στο εσωτερικό της βρίσκεται η πρωτεΐνη ή έναν κύβο. Το μέγεθός τους εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος της πρωτεΐνης αλλά και από το είδος της μελέτης που θέλουμε να διεξαγάγουμε. Η ενυδάτωση γίνεται με τη βοήθεια του προγράμματος VMD και του tcl script solvate.txt (Παράρτημα).

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Φορτώνουμε το μόριο: *VMD Main > File > New Molecule.*

α) Στο παράθυρο Molecular File Browser φορτώνουμε το αρχείο psf της πρωτεΐνης.

β) Στο VMD Main κάνουμε δεξί κλικ στο μόριο που ανοίξαμε και επιλέγουμε *Load Data IntoMolecule.* Διαλέγουμε το αντίστοιχο αρχείο pdb της πρωτεΐνης αυτή τη φορά.

2. Ανοίγουμε το script του solvate με τον επεξεργαστή κειμένου και ορίζουμε τα ονόματα των αρχείων psf και pdb που θα «διαβάσει» καθώς επίσης και το όνομα των νέων αρχείων psf και pdb που θα δημιουργήσει μετά την προσθήκη μορίων νερού.

ΠΡΟΣΟΧΗ! Ο tcl interpreter είναι ευαίσθητος στην αναγνώριση κεφαλαίων-πεζών.

3. Ανοίγουμε το τερματικό εντολών του VMD: *Extensions > Tk Console.*

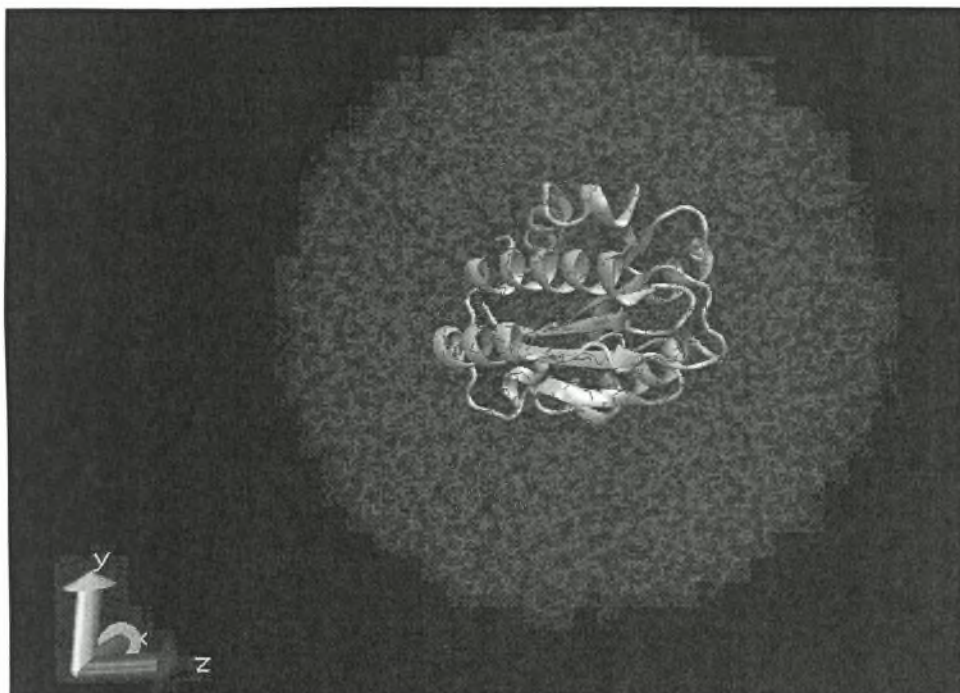
α) Για να μπούμε στο φάκελο, στον οποίο έχουμε αποθηκευμένα τα αρχεία psf και pdb και το script του solvate, πληκτρολογούμε: *cd «στην διαδρομή (path) του φακέλου εργασίας»*

Π.χ.: *cd C:/von\_willebrand (WINDOWS) OXI cd C:\von\_willebrand*

β) Για να τρέξουμε το script δίνουμε την εντολή: *play solvate\_script.txt.* Αν δεν τρέξει δίνουμε: *play {solvate\_script.txt}.*

4. Θα δημιουργηθούν τρία νέα αρχεία στον φάκελο εργασίας μας. Τα psf και pdb η (απεικόνιση της πρωτεΐνης σε αυτήν την μορφή μέσω του VMD παρουσιάζεται στην εικόνα 3.2) και ένα αρχείο txt που θα αναφέρει ότι έγινε επιτυχώς το solvate ή ότι υπήρξαν σφάλματα.





εικόνα 3.2 η απεικόνιση της A2 μέσω VMD μετά το solvate. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα άτομα του νερού.

### 3.1.3. Τοποθέτηση μορίων ουρίας

Για να τοποθετήσουμε την ουρία στην σφαίρα που θα λάβει μέρος η προσομοίωση θα πρέπει να αφαιρέσουμε μόρια νερού και να εισαγάγουμε μόρια ουρίας. Αυτό το επιτυγχάνουμε με τη βοήθεια ενός script. Για να επιτύχουμε την αναλογία μορίων νερού και ουρίας, έτσι ώστε η σφαίρα να είναι συγκέντρωσης 8 M λαμβάνουμε υπόψη τα παρακάτω δεδομένα και προχωρούμε στους ανάλογους υπολογισμούς:

Ο λόγος του αριθμού των μορίων νερού  $N_w$  προς τον αριθμό των μορίων ουρίας  $N_u$  σε διάλυμα ουρίας 8M ( $n_u=8$  για συνολικό όγκο διαλύματος 1000 ml) θα ισούται με τον λόγο του αριθμού των αντίστοιχων γραμμομορίων. Δηλαδή:

$$\frac{N_w}{N_u} = \frac{n_w}{n_u} \quad (3)$$

Πρέπει λοιπόν να γνωρίζουμε το πλήθος των γραμμομορίων του νερού σε διάλυμα ουρίας 8M και συνολικού όγκου έστω 1000 ml.

Για διάλυμα 8M και 1000 ml θα ισχύει:

$$8 \times \widehat{V}^u + n_w \times \widehat{V}^w = 1000 \Rightarrow n_w = \frac{1000 - 8 \times \widehat{V}^u}{\widehat{V}^w} \quad (4)$$

$\widehat{V}$  : είναι ο γραμμομοριακός όγκος

Για να υπολογίσουμε το  $n_w$  χρειαζόμαστε τους γραμμομοριακούς όγκους της ουρίας  $\widehat{V}^u$  και του νερού  $\widehat{V}^w$ . Για το νερό γνωρίζουμε ότι  $\widehat{V}^w = 18 \text{ ml}$ . Άρα μένει να βρούμε το  $\widehat{V}^u$ .

### 1<sup>ος</sup> τρόπος:

Από την δημοσίευση [27] λαμβάνουμε τις τιμές του γραμμομοριακού όγκου της ουρίας για 298.15 K ( $\widehat{V}_{298.15}^u = 45.26 \text{ ml}$ ) και 323.15 K ( $\widehat{V}_{323.15}^u = 45.47 \text{ ml}$ ) και κάνω αναγωγή στους 300 K.

Δηλαδή  $\widehat{V}_{300}^u = 45.28 \text{ ml}$ . Μετά από αντικατάσταση στην (4) προκύπτει  $n_w = 35.444$  και η (3) θα δώσει:  $N_w / N_u = 4.428$

### 2<sup>ος</sup> τρόπος:

Με τη βοήθεια της πυκνότητας της ουρίας  $d_u = 1.32 \text{ g/ml}$ . [27]

$$d_u = \frac{m}{V} = \frac{MB_u}{\widehat{V}^u} = 1.32 \Rightarrow \widehat{V}^u = \frac{60.07}{1.32} = 45.51 \text{ ml} \Rightarrow N_w / N_u = 4.416$$

Από τους υπολογισμούς (με βάση και με τους δύο τρόπους) διαπιστώνουμε, ότι η αναλογία μορίων πρέπει να είναι περίπου 4,42 μόρια νερού για κάθε μόριο ουρίας. Ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

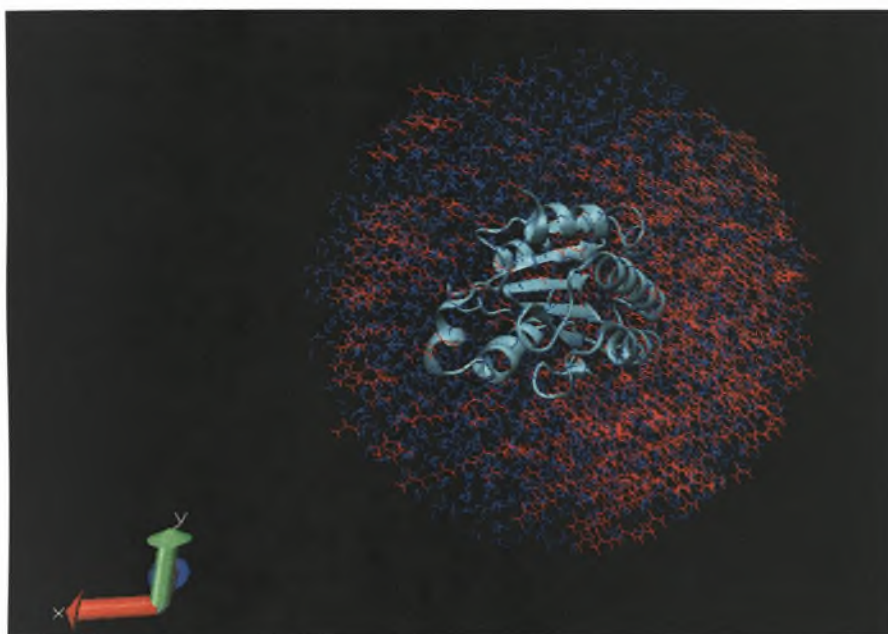
1. Φορτώνουμε το pdb και το psf που προέκυψαν από το solvate: *VMD Main > File > New Molecule*.
2. Ανοίγουμε το script του add\_urea με τον επεξεργαστή κειμένου και στην τελευταία σειρά ορίζουμε τα ονόματα των νέων αρχείων psf και pdb καθώς και την αναλογία μορίων νερού προς ουρίας.



3. Στο φάκελο που έχουμε όλα τα απαραίτητα αρχεία, πρέπει να έχουμε και το αρχείο τύπου *inp*, που ορίζει την τοπολογία και αναφέρεται στο script *play add\_urea.txt*. Έστω, «*top\_all127\_prot\_na.inp*» καθώς και το «*toppar\_solvent.str*». Τα ονόματά τους βρίσκονται στην θέση «*topology*».

4. Στο τερματικό εντολών του VMD πληκτρολογούμε: *play add\_urea.txt*

5. Θα δημιουργηθούν τα νέα αρχεία *psf* και *pdb* (απεικόνιση της πρωτεΐνης σε αυτήν την μορφή μέσω του VMD παρουσιάζεται στην εικόνα 3.3) τα οποία θα αποθηκευθούν στο φάκελο εργασίας μας.



Εικ. 3.3 απεικόνιση της A2 μέσω του VMD μετά την προσθήκη ουρίας. Με μπλε παρουσιάζονται τα άτομα του νερού και με κόκκινο η ουρία.

### 3.1.4 Προσθήκη Ιόντων (Neutralization / Add Ions)

Τα αρχεία *psf* και *pdb* που λάβαμε από το solvation περιέχουν το σύστημα πρωτεΐνης-νερού-ουρίας. Όμως αυτά δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξισορρόπηση (equilibration) και την εφαρμογή, καθώς το σύστημα πρέπει να είναι ηλεκτρικά ουδέτερο. Για αυτό το λόγο προσθέτουμε ιόντα θετικά ή/και αρνητικά. Συνήθως προσθέτουμε Na για την εξουδετέρωση αρνητικού φορτίου και Cl για την εξουδετέρωση θετικού φορτίου, αφού έχουν φορτίο +1 και -1

αντίστοιχα. Θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε και άλλα ιόντα. Αυτή η διαδικασία γίνεται μέσω του VMD και του κατάλληλου script.

Η διαδικασία είναι η εξής:

1. Φορτώνουμε στο VMD το psf και το αντίστοιχο pdb για το σύστημα πρωτεΐνης-νερού-ουρίας, όπως και προηγουμένως.
2. Ανοίγουμε το script του ionization με τον επεξεργαστή κειμένου και ορίζουμε τα ονόματα των νέων αρχείων psf και pdb που θα προκύψουν μετά την προσθήκη των ιόντων εξουδετέρωσης.
3. Στο τερματικό εντολών του VMD πληκτρολογούμε: *play additions.txt*
4. Θα δημιουργηθούν τα νέα αρχεία psf και pdb τα οποία θα αποθηκευθούν στο φάκελο εργασίας μας. Όμως υπάρχει περίπτωση τα ιόντα να μην έχουν τοποθετηθεί ομοιόμορφα γύρω από την πρωτεΐνη. Αυτό μπορεί να εμποδίσει τη σωστή εξισορρόπηση του μορίου που μελετάμε. Μπορούμε να μετακινήσουμε τα ιόντα, μετά την προσθήκη τους στο σύστημα πρωτεΐνης-νερού-ουρίας, με τη βοήθεια του VMD.

Η διαδικασία είναι η εξής:

1. Φορτώνουμε στο VMD το psf και το αντίστοιχο pdb για το σύστημα πρωτεΐνης-νερού-ουρίας που προέκυψε από το *add\_urea*, όπως και προηγουμένως.
2. Στο μενού, ακολουθούμε τη διαδρομή: *Graphics > Representations...*
3. Στο παράθυρο Graphical Representations που ανοίγει, πηγαίνουμε στην καρτέλα “Selections” και εκεί δημιουργούμε ένα layer στο οποίο θα φαίνονται μόνο το μόριο που μελετάμε και τα ιόντα. Τέλος *Apply*.
4. Πλέον, στο VMD OpenGL Display βλέπουμε την πρωτεΐνη καθώς και πως είναι κατανεμημένα γύρω της τα ιόντα.
5. Στο μενού του VMD Main, ακολουθούμε τη διαδρομή: *Mouse > Move > Residue*. Η συγκεκριμένη επιλογή, δηλαδή του καταλοΐπου, συμπίπτει με αυτή του ιόντος αφού πρόκειται για απλά στοιχεία.
6. Τώρα μπορούμε στο VMD OpenGL Display να μετακινήσουμε οποιοδήποτε ιόν με το δείκτη του ποντικιού, έτσι ώστε να επιτύχουμε μια περίπου ομοιόμορφη κατανομή.
7. Μόλις ολοκληρώσουμε, για να το αποθηκεύσουμε, στο του VMD Main, ακολουθούμε τη διαδρομή: *File > Save Coordinates...*

Πρέπει προηγουμένως να έχουμε επιλέξει να συμπεριληφθούν και τα μόρια του νερού, που δεν συμπεριλάβαμε στην επιλογή για παρουσίαση στην οθόνη.

### 3.1.5 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (Minimization)

Πριν από την εξισορρόπηση της πρωτεΐνης πρέπει να ελαχιστοποιήσουμε την ενέργεια του συστήματος πρωτεΐνης-νερού-ουρίας-iónτων.

1. Για να τρέξουμε την minimization χρειάζεται να συντάξουμε ένα configuration script (Βλέπε Παράρτημα) το οποίο θα είναι τύπου txt. Σε αυτό θα καθορίζονται οι συνθήκες στις οποίες θα γίνει η διαδικασία αλλά και τα αρχεία που θα διαβάσει το namd καθώς επίσης και ένα αρχείο με τις παραμέτρους (par\_all27\_prot\_na.inp). Πρέπει να προσέξουμε όλα αυτά να περιέχονται μέσα στον φάκελο εργασίας που βρίσκεται και το script. Στο πεδίο *coordinates* βάζουμε το αρχείο pdb που προέκυψε από την προσθήκη íόντων, ενώ στο πεδίο *structure* το αντίστοιχο αρχείο psf. Ορίζουμε το όνομα που επιθυμούμε για το αρχείο που θα προκύψει στο πεδίο *output name*.

2. Το πρόγραμμα που θα επεξεργαστεί όλες αυτές τις πληροφορίες είναι το NAMD.

Συγκεκριμένα, θα χρειαστούμε το εκτελέσιμο namd2 και την βιβλιοθήκη tc183.dll.

Μπορούμε να τα συμπεριλάβουμε με copy-paste στο φάκελο εργασίας. Αν δεν το κάνουμε αυτό, και θέλουμε να τα έχουμε αποθηκευμένα σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία, πρέπει να δηλώνουμε την διαδρομή, όταν δώσουμε την εντολή για να τρέξει το πρόγραμμα.

3. Για να τρέξουμε την minimization, ανοίγουμε το τερματικό εντολών των windows (command line) και δίνουμε τις παρακάτω εντολές:

```
>>> cd "διαδρομή του φακέλου" π.χ. : cd C:\von_willebrand
```

Είναι προτιμότερο και πρακτικότερο ο φάκελος να βρίσκεται στην διαδρομή C: και όχι σε φακέλους του λειτουργικού συστήματος των Windows (π.χ. «τα έγγραφά μου»), γιατί είναι πιθανό να μην εισαχθεί σωστά η διαδρομή.

```
>>> namd2.exe + p1 script_minimization.txt > log_minimization.txt
```

Η τελευταία εντολή ορίζει: ποιο πρόγραμμα θα χρησιμοποιηθεί, πόση επεξεργαστική ισχύ θα χρησιμοποιήσει (στο παράδειγμα ορίζεται να χρησιμοποιήσει 1 επεξεργαστή, αν θέλουμε να διαθέσουμε 2 πυρήνες θα ορίσουμε: p2 κ.ο.κ.), το όνομα του script που θα διαβάσει το πρόγραμμα (ΠΡΟΣΟΧΗ ώστε να είναι γραμμένο ακριβώς με τον ίδιο τρόπο, καθώς είναι

ευαίσθητο στην αναγνώριση κεφαλαίων-πεζών, συμβόλων), τέλος το αρχείο log που θα μας δείξει την πορεία της minimization.

4. Μόλις δώσουμε αυτή την εντολή θα δημιουργηθεί στο φάκελο το αρχείο «log\_minimization.txt», που ζητήσαμε. Είναι ένα αρχείο το οποίο μπορούμε να το ανοίξουμε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της minimization και κυρίως μπορούμε να παρακολουθούμε σε κάθε βήμα το «gradient tolerance». Θα έχουμε μία ικανοποιητική ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος όταν αυτός ο δείκτης είναι μονοψήφιος (<9) και όσο το δυνατόν μικρότερος, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί αυξάνοντας τα βήματα.

5. Όταν τελειώσει η διαδικασία θα δημιουργηθούν στο φάκελο τρία νέα αρχεία τύπου: .coor, .vel, .xsc, με όνομα αυτό που ορίσαμε σαν output name στο script της minimization. Το αρχείο .coor θα το χρησιμοποιήσουμε αργότερα για την εξισορρόπηση.

### 3.1.6 Εξισορρόπηση (Equilibration)

Είναι η τελική διαδικασία και στην οποία αποσκοπούσε η παραπάνω προετοιμασία. Εκτελείται από το NAMD και έχει την ίδια φιλοσοφία με τη minimization.

Οπότε κάνουμε τα εξής:

1. Για να τρέξουμε την equilibration χρειάζεται να συντάξουμε configuration ένα script το οποίο θα είναι τύπου txt. Σε αυτό θα καθορίζονται οι συνθήκες υπό τις οποίες θα γίνει η διαδικασία αλλά και τα αρχεία που θα διαβάσει το namd καθώς επίσης και ένα αρχείο με τις παραμέτρους, τύπου .inp. Έστω, par\_all27\_prot\_na.inp. Στο πεδίο coordinates βάζουμε το αρχείο coor που προέκυψε από την minimization, ενώ στο πεδίο structure το αρχείο psf που προέκυψε από την προσθήκη ιόντων.

Πρέπει να προσέξουμε όλα τα παραπάνω να περιέχονται μέσα στο φάκελο εργασίας που βρίσκεται και το script. Ορίζουμε το όνομα που επιθυμούμε για το αρχείο που θα προκύψει στο πεδίο *output name*. Πρέπει να προσέξουμε το είδος των boundary conditions, δηλαδή αν εξισορροπούμε την πρωτεΐνη σε σφαίρα, κύλινδρο, κύβο, διότι αλλάζουν οι ρυθμίσεις καθώς και οι συντεταγμένες που πρέπει να οριστούν σε κάθε περίπτωση.

Συνήθως στα περισσότερα script συναντούμε το πεδίο *fixed atoms*, που μας επιτρέπει να ζητήσουμε κάποια άτομα να κρατηθούν ακίνητα κατά την διάρκεια της προσομοίωσης. Το ποιά θα είναι αυτά, μπορούμε να το ορίσουμε σε ένα αρχείο pdb, αλλάζοντας τον αριθμό 0 της προτελευταίας στήλης των εν λόγω ατόμων σε 1. Εάν δεν θέλουμε να ακινητοποιήσουμε

κάποια άτομα, μπορούμε να απενεργοποιήσουμε την επιλογή *fixed atoms* στο script τοποθετώντας μπροστά ένα “#”.

Συνήθως, στο τέλος του script, πριν δώσουμε τον αριθμό των βημάτων, υπάρχει η επιλογή “minimize”. Αυτή η minimization δεν είναι απαραίτητη σε αυτή τη φάση, γι’ αυτό την απενεργοποιούμε τοποθετώντας μπροστά ένα “#”.

2. Τρέχουμε την εξισορρόπηση από το τερματικό της γραμμής εντολών των Windows με:

```
>>> namd2.exe + p1 script_equilibration.txt > log_equilibration.txt
```

3. Μετά το πέρας της εξισορρόπησης δημιουργούνται στο φάκελο τέσσερα νέα αρχεία τύπου: .dcd, .coor, .vel, .xsc, και έξι νέα αρχεία τύπου .restart.xsc.old, .restart.xsc, .restart.vel.old, .restart.vel, .restart.coor.old, .restart.coor, με όνομα αυτό που ορίσαμε σαν output name στο script.

Στο παράρτημα παρατίθενται όλα τα script που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία και εκτέλεση των προσομοιώσεων στο παράδειγμα της A1.

### 3.2 Πορεία των προσομοιώσεων

Συνήθως η αρχική κατανομή των μορίων της ουρίας γύρω από την πρωτεΐνη δεν είναι ομοιόμορφη. Προκειμένου να επιτύχουμε μια ομοιόμορφη κατανομή της ουρίας, τρέχουμε μια προκαταρκτική προσομοίωση που επιτρέπει στα μόρια της ουρίας να ανακατανεμηθούν κρατώντας τα άτομα της πρωτεΐνης ακίνητα. Χρειάστηκαν 3 ns προσομοίωσης με σταθερή την A2 στους 350K, για να επιτύχουμε μια ομοιόμορφη κατανομή της ουρίας στην σφαίρα προσομοίωσης. Εν συνεχεία με ελεύθερη την πρωτεΐνη και σε θερμοκρασία 300K εκτελέσαμε 7 ns προσομοιώσεων, χωρίς όμως να διαπιστώσουμε έστω μια έναρξη της αποδιάταξης. Ως μέτρο της εξέλιξης της αποδιάταξης χρησιμοποιήθηκε το RMSD. Η αρχική σκέψη ήταν ότι η σφαίρα του διαλύτη ακτίνας 36 Å, στην οποία περιέχονταν η πρωτεΐνη, ήταν πολύ μικρή για να επιτρέψει την αποδιάταξη και ότι έπρεπε να αυξήσουμε το μέγεθός της. Έτσι για τις επόμενες προσομοιώσεις αυξήσαμε την ακτίνα της σφαίρας του διαλύτη στα 41Å. Επαναλάβαμε 3 ns προσομοιώσεων με ακίνητα τα άτομα της πρωτεΐνης, για να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή της ουρίας στην νέα σφαίρα προσομοιώσεων. Ακολούθησαν 12 ns άκαρπων προσομοιώσεων στους 300K, όπου η πρωτεΐνη εξακολουθούσε να διατηρεί την δομή της. (Κατά την διάρκεια αυτών των προσομοιώσεων παρατηρήθηκε μετακίνηση της πρωτεΐνης προς την περιφέρεια. Για

το λόγο αυτό επαναφέραμε τεχνητά την πρωτεΐνη στο κέντρο της σφαίρας.) Έτσι αποφασίσαμε να αυξήσουμε σταδιακά την θερμοκρασία για να επιτύχουμε ταχύτερα την αποδιάταξη (2 ns στους 350K και 6 ns στους 370K). Επειδή η πρωτεΐνη εξακολουθούσε να αντιστέκεται, αυξήσαμε και άλλο την θερμοκρασία στους 420K για 6 ns. Ωστόσο σημάδια αποδιάταξης πήραμε μόνο όταν αυξήσαμε την θερμοκρασία στους 500K και μετά από 4 ns προσομοιώσεων. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν άλλα 2 ns προσομοιώσεων για να δούμε τον ρυθμό ξετυλίγματος της A2, όπου είχαμε μικρές αλλαγές.

Μετά την ολοκλήρωση των προσομοιώσεων για την A2, ξεκινήσαμε την διαδικασία για την επικράτεια A1 με ακριβώς τις ίδιες συνθήκες για τα πρώτα 10 ns των προσομοιώσεων. Αξιοποιώντας την εμπειρία από την A2 αποφασίσαμε να ανέβουμε σταδιακά στους 500K. Στην θερμοκρασία αυτή τρέξαμε 4 ns προσομοιώσεων, όπου δεν είδαμε καμία αλλαγή στην δομή της επικράτειας A1, εν αντιθέσει με την A2 στην οποία φαίνονταν αλλαγές. Έπειτα προχωρήσαμε και στην προσομοίωση άλλων 2 ns, όπως και την περίπτωση της A2.

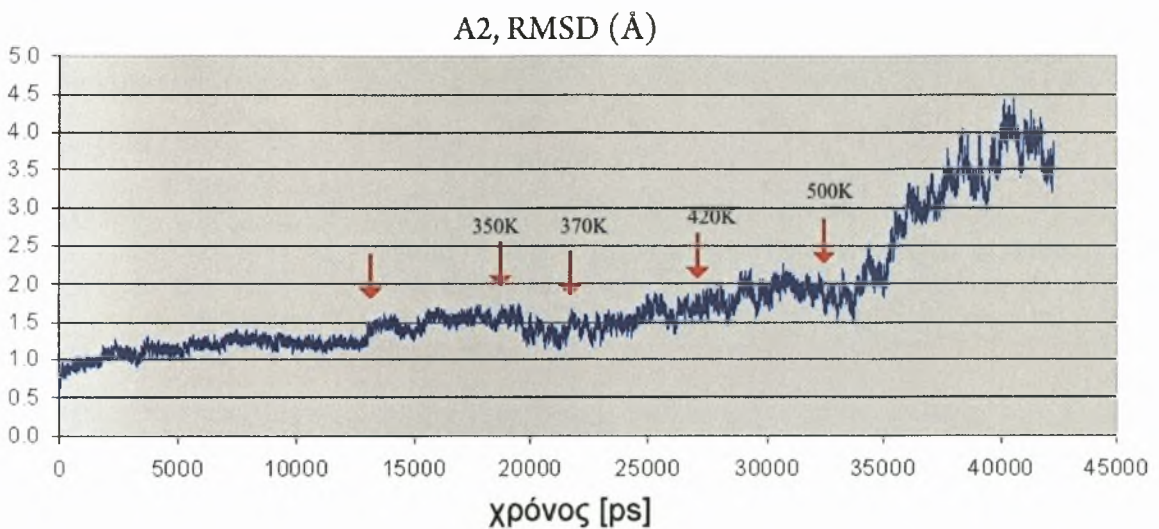


## 4. Αποτελέσματα

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.2, λόγω της εξαιρετικής σταθερότητας που επέδειξαν τόσο η A1 όσο και η A2 επικράτειες του vWF, δεν κατορθώθηκε αποδιάταξη σε σημαντικό βαθμό παρά τον σχετικά μεγάλο χρόνο των προσομοιώσεων στους 300K (19 ns για την A2). Δεδομένου ότι με την υπολογιστική ισχύ που διαθέτουμε η συνέχιση των προσομοιώσεων θα ήταν απαγορευτική στο πλαίσιο μιας διπλωματικής εργασίας, κρίθηκε σκόπιμο να αυξήσουμε την θερμοκρασία στους 500K για 9 ns, ώστε να επιταχυνθεί η αποδιάταξη. Επίσης αποφασίσθηκε να σταματήσουμε τις προσομοιώσεις σε ένα σημείο, όπου οι μετρούμενοι δείκτες θα επέτρεπαν την ασφαλή σύγκριση της σταθερότητας των δύο επικρατειών.

Η ανάλυση των δεδομένων από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής παρουσιάζεται εποπτικά στα σχήματα 1 έως 10. Επίσης ο πίνακας 1 συγκεντρώνει τις τιμές των ποσοτικών δεικτών πριν από την έναρξη της αποδιάταξης και μετά. Πιο συγκεκριμένα, στο σχήμα 1 παρουσιάζεται η πλήρης πορεία της μεταβολής της δομής του A2 (RMSD) με τον χρόνο για τις διαφορετικές συνθήκες προσομοίωσης. Μια πρώτη αύξηση του RMSD (πέραν της μικρής λόγω εξισορρόπησης στους 300K με 8M ουρία) παρατηρείται κατά την τεχνητή επαναφορά της πρωτεΐνης στο κέντρο της σφαίρας προσομοίωσης (πρώτο βέλος). Η αύξηση της θερμοκρασίας στους 350K δεν επέφερε καμία περαιτέρω μεταβολή. Αντίθετα από τους 370K και 420K παρατηρείται μια αύξηση, όχι όμως ικανοποιητική. Δραματική αύξηση του RMSD παρατηρείται μόλις στους 500K. Το σχήμα 2 παρουσιάζει την εξέλιξη του αριθμού των δεσμών υδρογόνου για την A2. Πέραν των στιγμιαίων διακυμάνσεων μπορούμε να διακρίνουμε μια μείωση του αριθμού των δεσμών υδρογόνου κατά την επαναφορά της πρωτεΐνης στο κέντρο της σφαίρας και μια δεύτερη μετά την αύξηση της θερμοκρασίας στους 500K. Οι ενδιάμεσες θερμοκρασίες φαίνεται πως δεν επηρέασαν τους δεσμούς υδρογόνου. Αντίστοιχες μεταβολές, όπως είναι αναμενόμενο, ακολουθούν οι δευτεροταγείς δομές (Σχήμα 3). Παρά την σταδιακή αύξηση των διακυμάνσεων τόσο στις  $\alpha$ -έλικες όσο και στα  $\beta$ -ελάσματα λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της δευτεροταγούς δομής παρά μόνο μετά τους 500K. Όμοια εικόνα παρουσιάζει η εξέλιξη της γυροσκοπικής ακτίνας (Σχήμα 4). Και εδώ η συμμετρία της A2 ή (και) ο όγκος της δεν μεταβάλλεται για 13 ns στους 300K και 8M ουρίας. Η μετακίνηση της πρωτεΐνης στο κέντρο φαίνεται να προκάλεσε μια στατιστικά σημαντική διαταραχή. Όμως η πραγματική έναρξη της αποσταθεροποίησης συμβαίνει σε θερμοκρασία

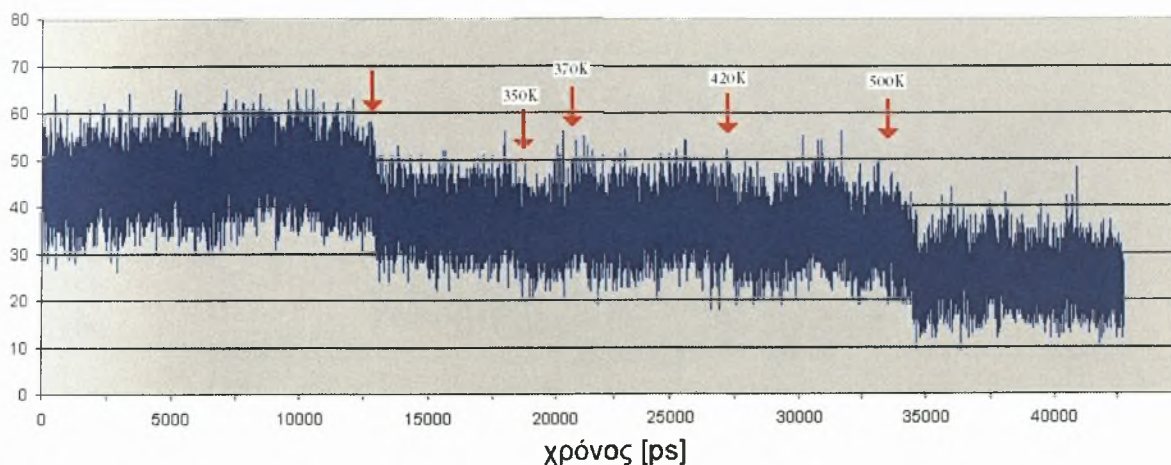
500K. Η εικόνα της εξέλιξης της δομής της A2 με βάση τα native contacts (Σχήμα 5) είναι συνεπής με αυτές των άλλων δεικτών. Έτσι, και εδώ η δομή εμφανίζει μια πρώτη αποσταθεροποίηση με την επαναφορά της πρωτεΐνης στο κέντρο. Ωστόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 500K είναι αυτή που προκαλεί σημαντική και συνεχόμενη αποσταθεροποίηση. Συνοψίζοντας, μπορούμε να συμπεράνουμε, ότι στους 500K η A2 υφίσταται σημαντικές μεταβολές οι οποίες θα αυξάνονταν εάν συνεχίζαμε τις προσομοιώσεις.



Σχήμα 1: Η διακύμανση του RMSD κατά την πάροδο του χρόνου. Η θερμοκρασία εκκίνησης της προσομοίωσης ήταν τα 300K. Το πρώτο κόκκινο βελάκι σημειώνει την χρονική στιγμή επαναφοράς της πρωτεΐνης στο κέντρο της σφαίρας προσομοίωσης, όπου παρατηρούμε αλλαγή στο RMSD. Τα επόμενα βελάκια δείχνουν τις διαδοχικές αυξήσεις της θερμοκρασίας στους 350K, 370K 420K και 500K.

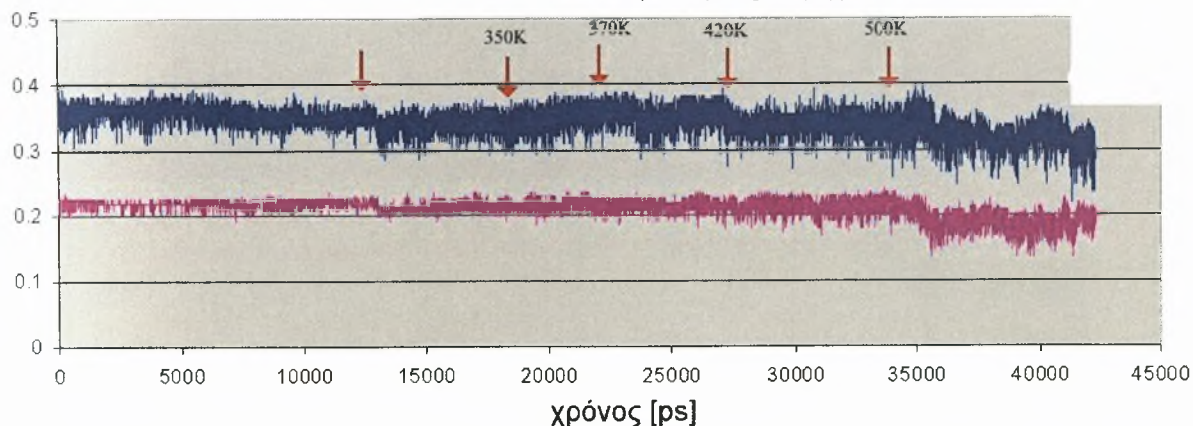


### Αριθμός δεσμών υδρογόνου



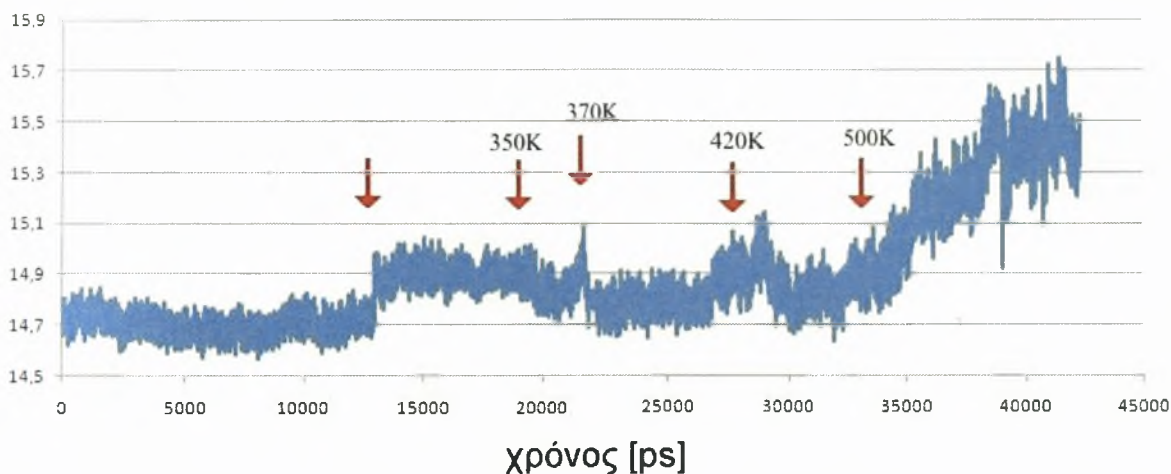
Σχήμα 2: Ο αριθμός δεσμών υδρογόνου για την A2 κατά την πάροδο του χρόνου. Η θερμοκρασία εκκίνησης της προσομοίωσης ήταν τα 300K. Το πρώτο κόκκινο βελάκι σημειώνει την χρονική στιγμή επαναφοράς της πρωτεΐνης στο κέντρο της σφαίρας προσομοίωσης, όπου παρατηρούμε αλλαγή στον αριθμό των δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται στην A2. Τα επόμενα βελάκια δείχνουν τις διαδοχικές αυξήσεις της θερμοκρασίας στους 350K, 370K 420K και 500K.

### A2, ποσοστό δευτεροταγούς δομής



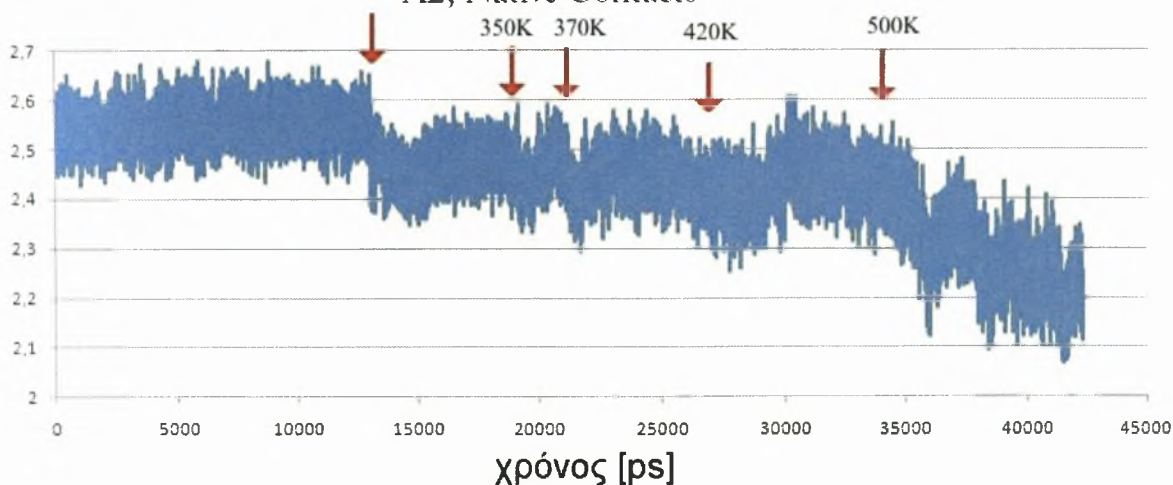
Σχήμα 3: Η διακύμανση των  $\alpha$ -ελίκων(μπλε) και των  $\beta$ -ελάσματα(ροζ) κατά την πάροδο του χρόνου. Η θερμοκρασία εκκίνησης της προσομοίωσης ήταν τα 300K. Το πρώτο κόκκινο βελάκι σημειώνει την χρονική στιγμή επαναφοράς της πρωτεΐνης στο κέντρο της σφαίρας προσομοίωσης. Τα επόμενα βελάκια δείχνουν τις διαδοχικές αυξήσεις της θερμοκρασίας στους 350K, 370K 420K και 500K.

## A2, Γυροσκοπική ακτίνα



Σχήμα 4: Η διακύμανση της γυροσκοπικής ακτίνας κατά την πάροδο του χρόνου. Η θερμοκρασία εκκίνησης της προσομοίωσης ήταν τα 300K. Το πρώτο κόκκινο βελάκι σημειώνει την χρονική στιγμή επαναφοράς της πρωτεΐνης στο κέντρο της σφαίρας προσομοίωσης. Τα επόμενα βελάκια δείχνουν τις διαδοχικές αυξήσεις της θερμοκρασίας στους 350K, 370K 420K και 500K.

## A2, Native Contacts



Σχήμα 5: Η διακύμανση των Native contacts κατά την πάροδο του χρόνου. Η θερμοκρασία εκκίνησης της προσομοίωσης ήταν τα 300K. Το πρώτο κόκκινο βελάκι σημειώνει την χρονική στιγμή επαναφοράς της πρωτεΐνης στο κέντρο της σφαίρας προσομοίωσης. Τα επόμενα βελάκια δείχνουν τις διαδοχικές αυξήσεις της θερμοκρασίας στους 350K, 370K 420K και 500K.

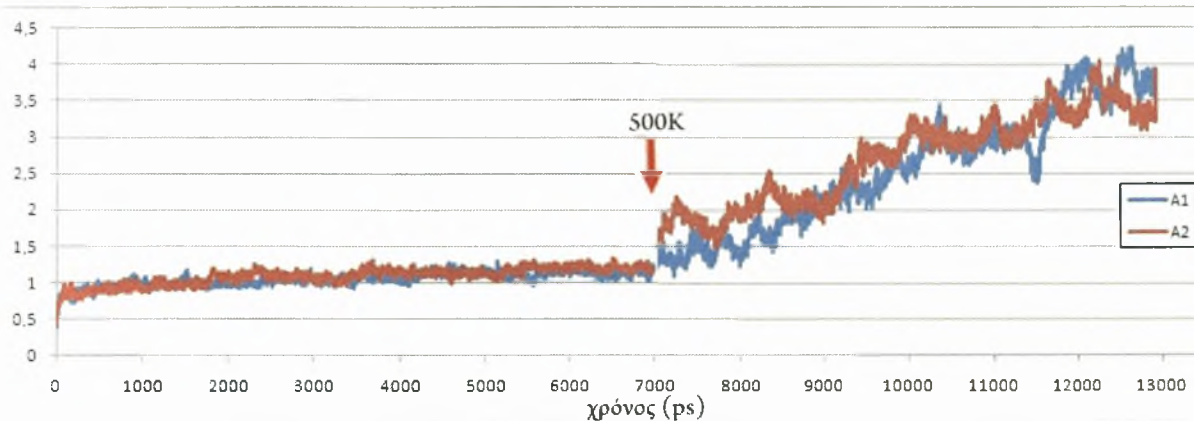
Η A1 επικράτεια προσομοιώθηκε για 7 ns στους 300K και ακολούθως άλλα 6 ns στους 500K.

Αυτό μας επιτρέπει να συγκρίνουμε τις σημαντικές φάσεις της προσομοίωσης μεταξύ των A1 και

A2. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται στο σχήμα 6, τόσο η A1 όσο και η A2 ακολουθούν την ίδια πορεία μεταβολής (μικρής) του RMSD κατά την προσαρμογή τους σε συγκέντρωση ουρίας 8M και θερμοκρασία 300K. Με την αλλαγή της θερμοκρασίας στους 500K παρατηρείται μεγαλύτερη μεταβολή στην δομή της A2 σε σχέση με την A1. Πιο ξεκάθαρη είναι η συμπεριφορά των υδρογονικών δεσμών (Σχήμα 7). Εδώ η A1 διατηρεί το ίδιο πλήθος υδρογονικών δεσμών (περίπου 38) και μετά την αύξηση στους 500K, ενώ οι δεσμοί υδρογόνου στην A2 μειώνονται από περίπου 44 (300K) σε 24(500K). Η δευτεροταγής δομή ακολουθεί το ίδιο σχήμα (Σχήμα 8). Φαίνεται ότι οι α-έλικες της A2 αποσταθεροποιούνται περισσότερο από αυτές της A1. Τα β-ελάσματα εμφανίζουν μια ισόποση μείωση και στις δύο επικράτειες, όχι όμως σημαντική. Η γυροσκοπική ακτίνα (Σχήμα 9) διατηρείται σταθερή για 7 ns στους 300K τόσο στην A1 όσο και στην A2, όπως άλλωστε και οι προαναφερθέντες δείκτες. Η αύξηση της θερμοκρασίας στους 500K ξεκινά μια συστηματική αύξηση της γυροσκοπικής ακτίνας για την A2, ενώ η A1 καθυστερεί ως προς αυτή την εξέλιξη. Τέλος, το σχήμα 10 παρουσιάζει συγκριτικά την χρονική μεταβολή των native contacts για τις A1 και A2. Και εδώ δεν παρατηρείται καμία διαφορά στους 300K. Αντίθετα η A2 αρχίζει να εμφανίζει σχετικά λιγότερα native contacts από την A1 με την αύξηση της θερμοκρασίας στους 500K.

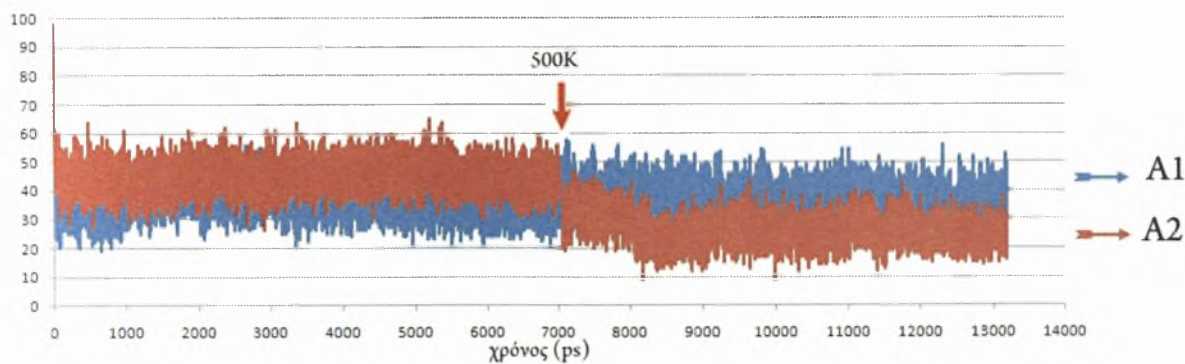
Λόγω του περιορισμένου βαθμού αποδιάταξης που πετύχαμε δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός του τύπου της κινητικής (δύο σταδίων ή τριών) όπως αναφέρεται στην [23] καθώς και των δομών των ενδιάμεσων καταστάσεων. Ωστόσο, με την βοήθεια των ποσοτικών δεικτών που μετρήσαμε (RMSD, ποσοστό δευτεροταγούς δομής, πλήθος υδρογονικών δεσμών, γυροσκοπική ακτίνα, native contacts) κατέστη δυνατό να δειχθεί, ότι η επικράτεια A1 είναι σταθερότερη από την A2 στις συνθήκες της μελέτης αυτής. Οι δομικές διαφορές μεταξύ της τελικής και της αρχικής δομής για τις A1 και A2 παρουσιάζονται στο σχήμα 11, όπου είναι σχετικά φανερό ότι η A2 (rmsd=3,95) μεταβλήθηκε περισσότερο από την A1 (rmsd=3,79). Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της εργασίας [23] και είναι αναμενόμενο, αν ληφθεί υπόψη, ότι η A1 διαθέτει δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ της cys 509 και της cys 695.

## A1&amp;A2, RMSD (Å)



Σχήμα 6: Χρονική εξέλιξη του RMSD για τις επικράτειες A1(κυανό) και A2(κόκκινο) του νWF παρουσία ουρίας 8M. Το βέλος δείχνει την μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 300K στους 500K.

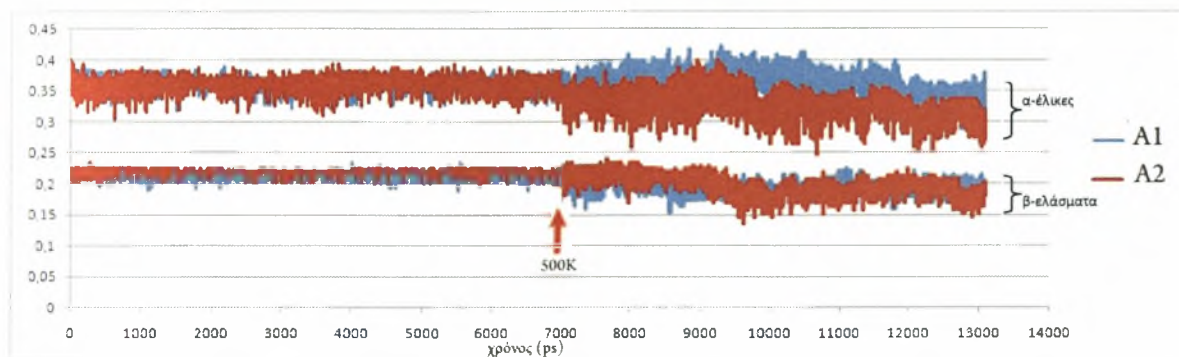
## A1 &amp; A2, αριθμός δεσμών υδρογόνου



Σχήμα 7: Χρονική εξέλιξη του αριθμού των δεσμών υδρογόνου για τις επικράτειες A1(κυανό) και A2(κόκκινο) του νWF παρουσία ουρίας 8M. Το βέλος δείχνει την μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 300K στους 500K.

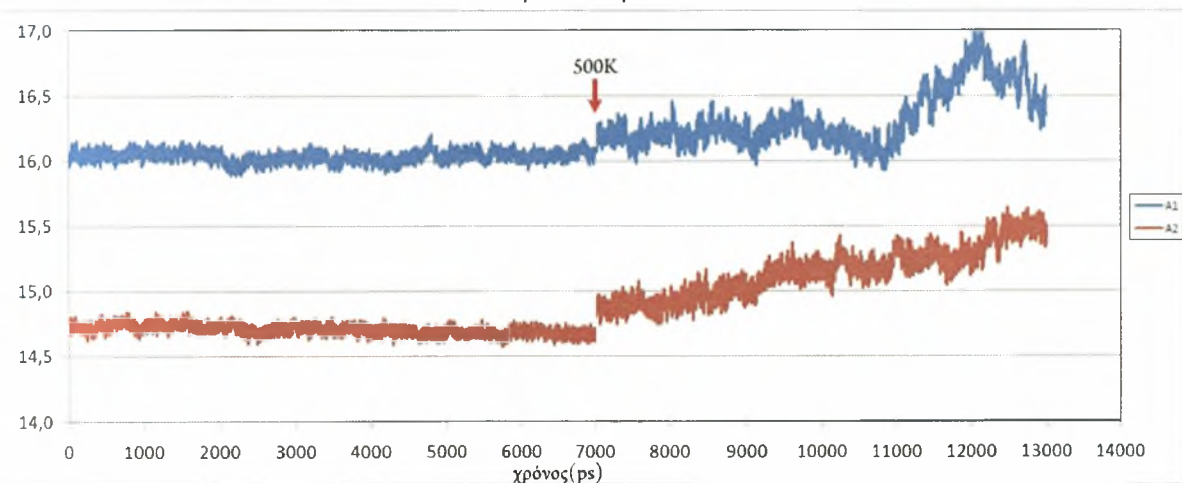


### A1&A2, α-έλικες και β-ελάσματα

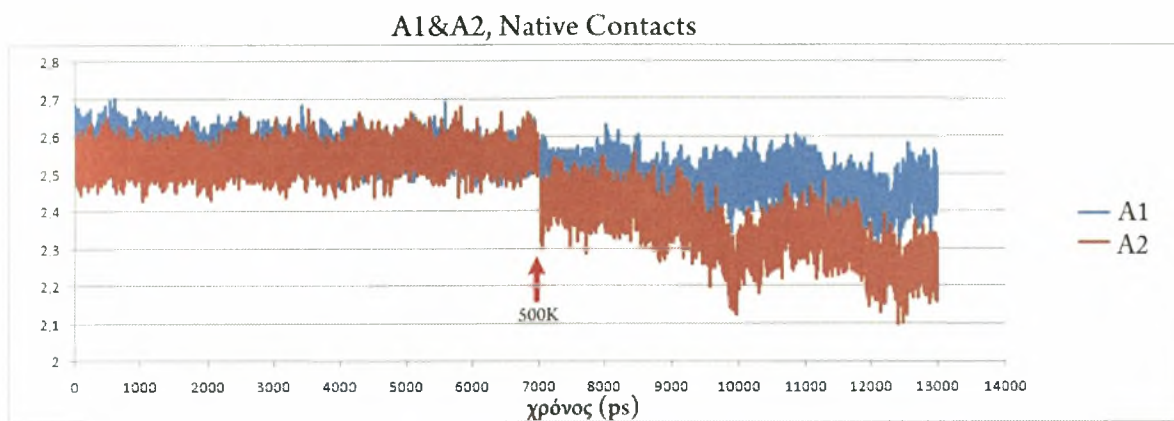


Σχήμα 8: Χρονική εξέλιξη του ποσοστού δευτεροταγούς δομής για τις επικράτειες A1 (κίτρινο) και A2 (κόκκινο) του νWF παρουσία ουρίας 8M. Το βέλος δείχνει την μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 300K στους 500K.

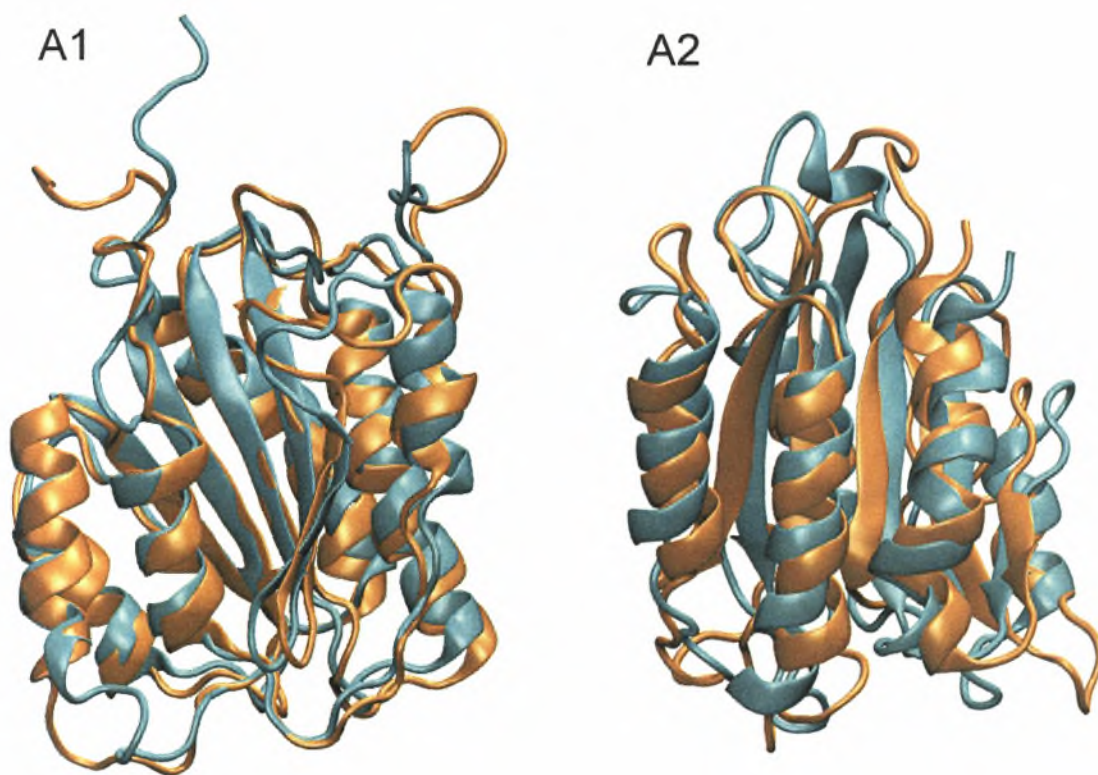
### A1&A2, Γυροσκοπική Ακτίνα



Σχήμα 9: Χρονική εξέλιξη της γυροσκοπικής ακτίνας για τις επικράτειες A1 (κίτρινο) και A2 (κόκκινο) του νWF παρουσία ουρίας 8M. Το βέλος δείχνει την μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 300K στους 500K.



Σχήμα 10: Χρονική εξέλιξη των native contacts για τις επικράτειες A1 (κυανό) και A2 (κόκκινο) του vWF παρουσία ουρίας 8M. Το βέλος δείχνει την μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 300K στους 500K.



Σχήμα 11: Αρχική (κυανό) και τελική (πορτοκαλί) δομή των A1 και A2 επικρατειών του vWF.



	T(Θερμοκρασία)	RMSD ( $\chi \pm SD$ )	Hbonds ( $\chi \pm SD$ )	$\alpha$ -έλικες ( $\chi \pm SD$ )
A1	300K	0,996 $\pm$ 0,045	38,856 $\pm$ 5,006	0,361 $\pm$ 0,007
	500K	2,891 $\pm$ 0,184	35,577 $\pm$ 5,350	0,339 $\pm$ 0,015
A2	300K	0,999 $\pm$ 0,063	44,023 $\pm$ 5,188	0,364 $\pm$ 0,008
	500K	3,027 $\pm$ 0,112	24,384 $\pm$ 4,318	0,310 $\pm$ 0,014

	T(Θερμοκρασία)	$\beta$ -ελάσματα ( $\chi \pm SD$ )	Rad of gyr ( $\chi \pm SD$ )	Native con. ( $\chi \pm SD$ )
A1	300K	0,213 $\pm$ 0,004	16,054 $\pm$ 0,037	2,578 $\pm$ 0,032
	500K	0,194 $\pm$ 0,009	16,135 $\pm$ 0,074	2,451 $\pm$ 0,042
A2	300K	0,219 $\pm$ 0,002	14,737 $\pm$ 0,034	2,537 $\pm$ 0,032
	500K	0,189 $\pm$ 0,013	15,182 $\pm$ 0,070	2,329 $\pm$ 0,051

Πίνακας 1: Συγκεντρώνει τις τιμές των ποσοτικών δεικτών στους 300K και στους 500K, με την μέση τιμή τους καθώς και την διακύμανση τους.

## Παράρτημα

To script της A1 για την δημιουργία :

```
package require psfgen
topology top_all27_prot_na.inp
```

```
alias residue HIS HSE
alias residue HOH TIP3
```

```
alias atom ILE CD1 CD
alias atom TIP3 O OH2
#alias atom ALA O OT1
#alias atom ALA OXT OT2
```

```
segment A {
pdb A1.pdb
first none
last none
}
patch DISU A:509 A:695
coordpdb A1.pdb A
```

```
guesscoord
```

```
writpdb A1SS.pdb
writepsf A1SS.psf
#resetpsf
```

To script για την δημιουργία των pdb και psf ώστε να τρέξει η προσομοίωση:

```
topology top_all27_prot_lipid.inp
```

```
alias residue HIS HSE
alias residue HOH TIP3
```

```
alias atom ILE CD1 CD
alias atom TIP3 O OH2
alias atom ALA O OT1
#alias atom ALA OXT OT2
```

```
segment A {
pdb 3GXB_A2.pdb
first none
```

```

last none
}
segment b {
pdb 3GXB_A2.pdb
first none
last none
}
coordpdb 3GXB_A2.pdb A
guesscoord

```

```

writepdb A2.pdb
writepsf A2.psf
#resetpsf

```

Όλα τα script που ακολουθούν αφορούν την A1.

To script της ενυδάτωσης (solvate)

```

# finds a center of mass of the molecule (neutralized.pdb), place a
sphere of water
# around it.
# To run execute: vmd -dispdev text -e solvate_neutralized.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      AlSS.psf
set pdb      AlSS.pdb
set box      AlSS_box
set psfDrop  AlSS_ws.psf
set pdbDrop  AlSS_ws.pdb

package require psfgen
f
resetpsf

mol load psf $psf pdb $pdb
set sel [atomselect top all]
# find mass center
set center [center_of_mass $sel]
puts "center of mas is at $center"

foreach {xmass ymass zmass} $center { break }

set num0 9999
set Rmin 0.0

while {$num0 != 0} {
    set Rmin [expr $Rmin + 1.0]
    set probSel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass) +
sqr(z-$zmass) <= sqr($Rmin))"]
    set num0 [$probSel num]
    puts "$num0 $Rmin"
}

package require solvate
set all 10.0
# => a radius of 42.0 A, while 8.0 => 40.0 A.
set Rmin [expr $Rmin + $all ]
set xmin [expr $xmass - $Rmin]
set xmax [expr $xmass + $Rmin]

set ymin [expr $ymass - $Rmin]
set ymax [expr $ymass + $Rmin]

set zmin [expr $zmass - $Rmin]
set zmax [expr $zmass + $Rmin]

```

```

puts " $xmin $ymin $zmin $xmax $ymax $zmax"
#solvate $psf $pdb -o $box -minmax {{15.4399995804 12.8879995346
-0.365999996662} {46.125 45.2680015564 36.2509994507} }

set min "$xmin $ymin $zmin"
set max "$xmax $ymax $zmax"
set minmax [list $min $max]

set pad 3.0
solvate $psf $pdb -o $box -minmax $minmax

mol delete top

resetpsf

mol load psf ${box}.psf pdb ${box}.pdb

readpsf ${box}.psf
coordpdb ${box}.pdb

set selDel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass) +
sqr(z-$zmass)
<= sqr($Rmin))" ]
puts " not within [$selDel num]"

set testSel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass) +
sqr(z-$zmass) <= sqr($Rmin)) and (not water)"]
puts " not within and not water [$testSel num]"

if { [$testSel num] != 0 } {
  puts "ERROR: there are [$testSel num] non water molecules outside
the shell"
  puts "EXIT"
  exit
}

set delList [$selDel get {segid resid}]

set delList [lsort -unique $delList]

foreach record $delList {
  foreach {segid resid} $record { break }
  delatom $segid $resid
}

writepsf $psfDrop
writepdb $pdbDrop

# remove temporary files generated by the script
file delete ${box}.psf ${box}.pdb combine.pdb combine.psf

```

```
puts "CENTER OF MASS IS AT: $center"
puts "SPHERE RADIUS:          $Rmin"

#exit
```

## Προσθήκη ουρίας

```
source math.tcl

package require psfgen
package require math

proc addions { newpsf newpdb urea_percentage } {
  topology top_all27_prot_lipid.inp
  topology toppar_solvent.str

  #set urea_percentage 0.1

  mol load pdb urea.pdb
  set urea [atomselect top all]
  set urea_name [$urea get name]
  set urea_res [$urea get resid]
  set urea_unique_res [lsort -unique -integer [$urea get resid]]

  foreach { psf pdb } [lindex [molinfo 0 get filename] 0] { break }
  readpsf $psf
  coordpdb $pdb
  puts "files have been read! "

  # figure out how many urea molecules we need
  set sel [atomselect 0 "name OH2"]
  set water [$sel num]
  set nurea [expr round($water*$urea_percentage/3.0)]
  set nwat [expr round($water*$urea_percentage)]
  puts "nurea: $nurea "

  # pick random waters
  set sel [atomselect 0 "name OH2"]
  set sellist [$sel list]
  set inds [list]
  set ntot [$sel num]
  for { set i 0 } { $i < $nwat } { incr i } {
    set thewat [expr int($ntot*[math::random])]
    puts "thewat: $thewat"
    lappend inds [lindex $sellist $thewat]
  }
  puts "inds: $inds"

  # select the waters to delete
  set wat [atomselect 0 "index $inds"]
  puts "size of wat is [$wat num]"
```



```

# deleted!
foreach segid [$wat get segid] resid [$wat get resid] {
  delatom $segid $resid
}

set resname UREA

# Build a new segment
segment UREA {
  first NONE
  last NONE
  for { set i 1 } { $i <= $nurea } { incr i } {
    residue $i $resname
  }
}

set ind 1
foreach pos [$wat get {x y z}] {
  if {$ind > $nurea} {break}
  set vec $pos
  $urea moveby $vec
  foreach resid $urea_res name $urea_name pos [$urea get {x y z}] {
    coord UREA $ind $name $pos
  }
  $urea moveby [vecinvert $vec]
  incr ind
}
guesscoord
# Write out the new version
writepsf $newpsf
writepdb $newpdb
}
eval addions add_urea_8M.psf add_urea_8M.pdb 0.437

```

### Προσθήκη ιόντων εξουδετέρωσης

```

source math.tcl

package require psfgen
package require math

proc addions { newpsf newpdb } {
  topology top_all27_prot_lipid.inp
  topology toppar_solvent.str

  foreach { psf pdb } [lindex [molinfo top get filename] 0] { break }
  readpsf $psf
  coordpdb $pdb

  # figure out how many ions we need

```

```

set all [atomselect top all]
set cg [eval vecadd [$all get charge]]
set nions [expr round($cg)]
set sign pos
puts "nions: $nions "
if { $nions < 0 } {
  set nions [expr abs($nions)]
  set sign neg
}
puts "sign: $sign"

# pick random waters
set sel [atomselect top "name OH2 and not within 5 of (not water)"]
set sellist [$sel list]
set inds [list]
set ntot [$sel num]
for { set i 0 } { $i < $nions } { incr i } {
  set thewat [expr int($ntot*[math::random])]
  puts "thewat: $thewat"
  lappend inds [lindex $sellist $thewat]
}
puts "inds: $inds"

# select the waters to delete
set wat [atomselect top "index $inds"]
puts "size of wat is [$wat num]"

# deleted!
foreach segid [$wat get segid] resid [$wat get resid] {
  delatom $segid $resid
}

if { $sign == "pos" } {
  puts "adding negative ions"
  #set resname CIM
  #set aname CL
  set resname CLA
  set aname CLA
} else {
  puts "adding positive ions"
  #set resname CIP
  #set aname NA
  set resname SOD
  set aname SOD
}

# Build a new segment
segment ION {
  first NONE
  last NONE
  for { set i 1 } { $i <= [$wat num] } { incr i } {

```

```

        residue $i $resname
    }
}

set ind 1
foreach pos [$wat get {x y z}] {
    coord ION $ind $aname $pos
    incr ind
}
guesscoord
# Write out the new version
writepsf $newpsf
writepdb $newpdb
}

#eval addions $argv

eval addions neutr_AlSS_ws-urea.psf neutr_AlSS_ws-urea.pdb

```

### Configuration script για Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (minimization)

```

# NAMD CONFIGURATION FILE FOR AlSS in water sphere after the second
equilibration

# protocol params

# initial config
coordinates      neutr_AlSS_ws-urea.pdb
temperature      350K
seed             12345
outputEnergies   1

# output params
outputname       min_AlSS_ws-urea
binaryoutput     no

# integrator params
timestep         1.0

# force field params
structure        neutr_AlSS_ws-urea.psf
paraTypeCharmm  on
parameters       par_all27_prot_na_urea.inp
exclude          scaled1-4
1-4scaling       1.0
switching        on
switchdist       8.0
cutoff           12.0
pairlistdist     13.5

```

```
margin          0.0
stepspercycle  20

minimize       3000
```

### Configuration script της Εξισορρόπησης:

```
#####
### JOB DESCRIPTION
#####
# Equilibration of AlSS in a Water Sphere
#####

## ADJUSTABLE PARAMETERS
#####

structure neutr_AlSS_ws-urea.psf
coordinates min_AlSS_ws-urea.coor
set temperature 350
set outputname eq_AlSS_ws-urea_prosl
firsttimestep 0

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

# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na_urea.inp
temperature $temperature
# Force-Field Parameters
exclude scaled1-4
1-4scaling 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 lps
dcdfreq 500
outputEnergies 100
outputPressure 100

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

# Spherical boundary conditions
sphericalBC on
sphericalBCcenter 7.06421660738 71.8254803435 -1.36302183922
sphericalBCr1 44.0 # distance at which the first boundary potential
begins to act
sphericalBCk1 10 # force constant for the harmonic bountary potential
sphericalBCexpl 2

# Constraints and restraints
fixedAtoms on
fixedAtomsForces off
fixedAtomsFile neutr_AlSS_ws-urea.pdb
fixedAtomsCol B
#####
## EXECUTION SCRIPT
#####

# Minimization
#minimize 100
reinitvels $temperature;

run 500000; # 1000 ps

```

Script για το rmsd, το οποίο είναι ίδιο και για της δύο επικράτειες:

```

# 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

```

Script για το secondary structure(A1), για την A2 αλλάζουμε μόνο τον αριθμό set perchelnum [expr \$helnum/624.0]:

```

# 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 secstrA1500.txt w];
set nf [molinfo top get numframes]
set mdc [molinfo top]

# helix calculation loop
for {set i 1 } {$i < $nf } { incr i } {

    set selpr [atomselect $mdc "backbone" frame $i]
    $selpr writepdb temp.pdb
mol load pdb temp.pdb
set selh [atomselect top "backbone and helix"]
set selb [atomselect top "backbone and sheet"]
    set helnum [$selh num]
    set perchelnum [expr $helnum/624.0]
    set betnum [$selb num]
    set percbetnum [expr $betnum/624.0]
    puts $outfile "$i $helnum $perchelnum $betnum $percbetnum"
puts $i
$selpr delete
$selh delete
$selb delete
set temp [molinfo top]
mol delete $temp
}
close $outfile

```

Script για το radius of gyration, το οποίο είναι ίδιο και για τις δύο επικράτιες:

```

set outfile [open rgyrres.txt w]
set nf [molinfo top get numframes]

for {set i 1 } {$i < $nf } { incr i } {
set sell [atomselect top "backbone" frame $i]

set vgyr [measure rgyr $sell]
$sell delete
puts $outfile "$i $vgyr"
}
close $outfile

```

Script για το native contacts(A1) για την A2 αλλάζουμε μόνο τον αριθμό set avnt [expr \$nvnt/208.0]:

```

set outfile [open ntres.txt w]
set nf [molinfo top get numframes]

```



```
for {set i 1 } { $i < $nf } { incr i } {  
set sell [atomselect top "backbone and name CA" frame $i]  
  
set vnt [measure contacts 6 $sell]  
set nvnt [llength [lindex $vnt 0]]  
set avnt [expr $nvnt/208.0]  
$sell delete  
puts $outfile "$i $nvnt $avnt"  
}  
close $outfile
```

## Βιβλιογραφία

1. Bajaj, M.S., Kuppuswamy, M.N., Manepalli, A. N., and Bajaj, S.P. (1999) *Thromb. Haemostasis* 82, 1047-1052
2. De Wit, T.R., and van Mourik, J.A. (2001) *Bset Pract. Res. Clin. Haematol.* 14, 241-255
3. [http://en.wikipedia.org/wiki/Von\\_Willebrand\\_factor](http://en.wikipedia.org/wiki/Von_Willebrand_factor)
4. Sandler JE: von willerbrand factor. *J. Biol Chem* 266:22777, 1991
5. Voorberg J, Fontijn R, Calafat J, Janssen H, van Mourik JA, Pannekoek H (1991) *J Cell Biol* 133:195-205
6. Marti T, Rosselet SJ, Titani K, Walsh KA (1987) *Biochemistry* 26:8099-8109
7. Sadler JE (1998). *Biochemistry and genetics of von Willebrand factor.* *Annu Rev. biochem.* 67:395-424. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.395. PMID 9759493.
8. Hoyer LW, Shainoff JR (1980) *Blodd*
9. federici AB, Bader R, Pagai S, Colibretti ML, De Marco L, Mannucci PM (1989) *by J Haematol*
10. S. Zanardelli, J.T.B. Crawley, Chan K.N. Chan Kwo Chion, J.K. Lam, R.J.S. Preston and D.A. LANE, 2006, ADAMTS13 Substrate Recognition of vonWillebrand Factor A2 Domian, *Jurnal of Biological Chemistry*
11. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, et al. (2001) *Nature*
12. furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, kYrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer i, Aumann V, Mittler u, et al. (1998) *N Engl JMed*
13. Tsia HM, Lian EC (1998) *N engl J Med*
14. Sandler JE (1998) *Annu Rev Biochem* 67:395-424
15. Sugimoto M, Mohri H, McClintock RA, Ruggeri Z: indification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin *J Biol Chem*
16. . P. Vincent Jenkins, K. John Pasi, and Stephen J. Perkins  
Molecular Modeling of Ligand and Mutation Sites of the Type A Domains of Human von Willebrand Factor and Their Relevance to von Willebrand's Disease, *blood*, vol 91(march), 1998

17. Weiqiang Gao, P.J. Anderson, E.M. Majerus, E.A. Tuley and J.E. Sandler, Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease, PNAS. December 12, 2006 vol 103, no. 50 19099-19140
18. Furlan M., Robles R. and Lammle B. (1996) *Blood* 87 4223-4234
19. Tsai, H.M. (1996) *Blood* 87 4235-4244
20. Majerus, E.M., Anderson, P.J. and Sandler, J.E. (2005) *J. Biochem* 280 21773-21778
21. Ai, Smith P., Wang, Zhang, Zheng (2005) *J Biol Chem* 280 29428-29434
22. Majerus EM, Zheng x, Tuley EA, Sandler JE (2003) *J Biol Chem* 278: 46643-46648
23. Matthew Auton, Miguel A. Cruz and Joel Moake *J. Mol. Biol.* (2007) 366, 986–1000  
Conformational Stability and Domain Unfolding of the Von Willebrand Factor A Domains
24. [http://en.wikipedia.org/wiki/Denaturation\\_%28biochemistry%29](http://en.wikipedia.org/wiki/Denaturation_%28biochemistry%29)
25. <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/568denaturation.html>
26. <http://class.fst.ohio-state.edu/FST822/lectures/Denat.htm>
27. <http://en.wikipedia.org/wiki/Urea>
28. Ana Caballero-Herrera, Kerstin Nordstrand, Kurt D. Berndt, and Lennart Nilsson, *Biophysical Journal*, Effect of Urea on Peptide Conformation in Water: Molecular Dynamics and Experimental Characterization Volume 89, August 2005 842–857
29. “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.
30. <http://staff.science.nus.edu.sg/~phvwjs/lecture-notes/cpnote3.pdf>
31. “Molecular Dynamics”, Jaroslaw Meller, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001*, Nature Publishing Group / [www.els.net](http://www.els.net)
32. VMD User's Guide, Version 1.8.6, April 3, 2007, Theoretical and Computational Biophysics Group I, University of Illinois and Beckman Institute, <http://www.ks.uiowa.edu/~kmoore/vmd/>
33. NAMD User's Guide, M. Bhandarkar, R. Brunner, C. Chipot, A. Dalke, S. Dixit, P. Grayson, J. Gullingsrud, A. Gursoy, D. Hardy, J. Henin, W. Humphrey, D. Hurwitz, N. Krawetz, S. Kumar, M. Nelson, J. Phillips, A. Shinzaki, G. Zheng, F. Zhu, 2006, Theoretical Biophysics Group, University of Illinois and Beckman Institute

34. "NAMD tutorial", University of Illinois at Urbana-Champaign, NIH Resource for Macromolecular Modelling and Bioinformatics, Beckman Institute, Computational Biophysics Workshop, October 2007
35. [http://en.wikipedia.org/wiki/Radius\\_of\\_gyration](http://en.wikipedia.org/wiki/Radius_of_gyration)
36. [http://en.wikipedia.org/wiki/Native\\_contact](http://en.wikipedia.org/wiki/Native_contact)
37. J.EMSLEY,M.CRUIZ,R.HANDIN,R.LIDDINGTON, CRYSTAL STRUCTURE OF THE VON WILLEBRAND FACTOR A1 , J.BIOL.CHEM. V. 273 10396 1998
38. Y.F.ZHOU,T.A.SPRINGER, STRUCTURAL SPECIALIZATIONS OF A FORCE-SENSING , DOMAIN IN THE ULTRA LARGE VASCULAR PROTEIN VON WILLEBRAND FACTOR, TO BE PUBLISHED