

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

ΣΧΟΛΗ Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείριση Περιβάλλοντος



## Πτυχιακή εργασία

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ ΜΕ  
ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ : ΑΠΟ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ O<sub>2</sub>,  
NO, CO ΣΤΗΝ ΑΕΡΟΒΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ  
ΑΝΑΠΝΟΗ

Νεοφύτα Ιωάννου

Λεμεσός 2013



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείριση Περιβάλλοντος  
ΤΜΗΜΑ Επιστήμης και Τεχνολογία Περιβάλλοντος

## **Πτυχιακή εργασία**

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΑΙΜΗΣ  
ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ : ΑΠΟ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ  
O<sub>2</sub>, NO, CO ΣΤΗΝ ΑΕΡΟΒΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ  
ΑΝΑΠΝΟΗ

Νεοφύτα Ιωάννου

Σύμβουλοι καθηγητές  
Δρ.Εύαγγελος Δασκαλάκης  
καθ. Κωνσταντίνος Βαρώτσης

Λεμεσός 2013

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Νεοφύτα Ιωάννου, [2013]

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογία Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Υπολογιστικής Χημείας του τμήματος Επιστήμη Περιβάλλοντος και Τεχνολογίας, στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή Κωνσταντίνο Βαρώτση για την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την πτυχιακή διατριβή μου.

Επισης θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθρων τον Δρ.Εύαγγελο Δασκαλάκη ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριο του, μου μετάδωσε τις γνώσεις του και με βοήθησε να εναρμονιστώ στο χώρο, στο σύνολο και στη δουλειά του εργαστηρίου με το καλύτερο τρόπο. Οι σημαντικές υποδείξεις και συμβουλές του με κατεύθυναν σε ένα τρόπο σκέψης πάνω απο όλα και μου πρόσφεραν σημαντικά εφόδια για την μετέπειτα ζωή μου.

Τέλος, θέλω να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για την στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Πέραν όμως από την πολύτιμη αυτή στήριξη, μου έδωσαν όλα τα εφόδια ώστε να γίνω ένας σωστός Άνθρωπος και αυτό είναι κάτι που δεν μαθαίνεται, αλλά μεταδίδεται.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή αφορά στη θεωρητική μελέτη και το σχεδιασμό ενός μοντέλου – δομής με τη βοήθεια ενός γραφικού περιβάλλοντος σε υπολογιστή και στη συνέχεια με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή και εξειδικευμένου λογισμικού στη βελτιστοποίηση της δομής βάσει Μοριακής Μηχανικής και Δυναμικής. Μελετήθηκαν φασματοσκοπικά οι αλλαγές που συμβαίνουν στην αίμη όταν αυτή αλληλεπιδρά με τα αέρια CO, NO καθώς επίσης και στο ενδιάμεσο της αναγωγής του O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O στην βακτηριακή αναπνοή. Καθώς υπάρχει ένα κοινό στοιχείο σε όλα αυτά - η εγγύς ιστιδίνη - μεταβάλλουμε τη θέση της για να μελετήσουμε πως επηρεάζονται τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά στη θέση δέσμευσης των αερίων στην αίμη. Αν τα επηρεάζει η θέση της ιστιδίνης ή όχι και κατά πόσο η μέθοδος της μοριακής δυναμικής σε μικρό σύστημα (αίμη) μπορεί να δώσει σωστά αποτελέσματα.

Η διατριβή χωρίζεται σε τέσσερα μέρη. Στο πρώτο αναπτύσσεται το θεωρητικό υπόβαθρο σχετικά με την λειτουργία της αίμης. Ακολούθως θα αναφερθούμε στο θεωρητικό υπόβαθρο για τις προσομοιώσεις της μοριακής δυναμικής. Στο τρίτο μέρος αναλύεται και παρουσιάζεται η διαδικασία - μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την προσομοίωση μοριακής δυναμικής της αίμης. Στο τέλος, θα παρουσιαστούν και θα συζητηθούν εκτενώς τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων των συστημάτων όπου η αίμη είχε δεσμευμένο στον σίδηρο της τα εξής άτομα ή ζεύγη ατόμων: <sup>16</sup>O, <sup>18</sup>O, <sup>12</sup>C - <sup>16</sup>O, <sup>12</sup>C - <sup>18</sup>O, <sup>14</sup>C - <sup>16</sup>O, <sup>14</sup>C - <sup>18</sup>O, <sup>14</sup>N - <sup>16</sup>O, <sup>14</sup>N - <sup>18</sup>O, <sup>15</sup>N - <sup>16</sup>O, <sup>15</sup>N - <sup>18</sup>O.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ .....	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	vi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	viii
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ .....	ix
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	x-xi
<b>1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ .....</b>	<b>1-7</b>
1.1 Αίμη στη μεταφορά οξυγόνου.....	1-2
1.2 Λειτουργία της αίμης βασισμένη στον αισθητήρα πρωτεϊνών.....	3-4
1.3 Μηχανισμός CooA - Αισθητήρας CO.....	4-5
1.4 Μηχανισμός sGC- Αισθητήρας NO.....	5-6
1.5 Οξειδοαναγωγική Δράση της Αίμης.....	6-7
1.6 Σκοπός της παρούσας διατριβής.....	7
<b>2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ</b>	
<b>ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ.....</b>	<b>8-17</b>
2.1 Πεδία Δυνάμεων (Force fields).....	11-12
2.2 Αρμονικό δυναμικό.....	12-13
2.3 Μεταβολές επίπεδων γωνιών.....	13
2.4 Μεταβολές διεδρων γωνιών.....	14-15
2.5 Αλληλεπιδράσεις Van der Waals.....	15-16
2.6 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.....	16-17
<b>3. ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΑΡΧΕΙΑ ΓΙΑ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ</b>	
<b>ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ.....</b>	<b>18-19</b>
3.1 Τα στάδια για την προετοιμασία του συστήματος.....	19-20
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>21-28</b>
4.1 Η αίμη στην κατάσταση Ferryl με δεσμευμένο O <sub>2</sub> .....	21-23
4.2 Αποτελέσματα αίμης για δεσμευμένο CO.....	23-25

4.3 Αποτελέσματα αίμης για δεσμευμένο NO.....	26-27
4.4 Στατιστικό βάρος του παραγόμενου φάσματος.....	28-29
4.5 Φάσματα απορρόφησης για Gly, His.....	29-30
ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	31-32
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	32-41



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1: Αίμη A- Αίμη B - Αίμη C.....	1
Εικόνα 2 : Ιστιδίνη.....	2
Εικόνα 3: Αίμη.....	3
Εικόνα 4: Δομές συντονισμού της αίμης από το CooA.....	5
Εικόνα 5: Μοντέλο για την ενεργοποίηση του sGC.....	6
Εικόνα 6: Αίμη (Ferryl).....	7
Εικόνα 7: Σύνδεση μεταξύ πειράματος, θεωρίας και προσομοίωσης.....	8
Εικόνα 8: Πεδία Δυνάμεων.....	11
Εικόνα 9:Αρμονικό δυναμικό μεταξύ δύο ατόμων.....	13
Εικόνα 10:Μεταβολές επίπεδων γωνίων.....	13
Εικόνα 11:Μεταβολές διεδρων γωνίων.....	14
Εικόνα 12:Αλληλεπιδράσεις Van der Waals.....	15
Εικόνα 13:Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.....	16
Εικόνα 14: Φάσμα απορρόφησης του Ferryl .....	21
Εικόνα 15: Φάσμα απορρόφησης για αποστάσεις γλυκίνης – ιστιδίνης 3 Å και 4 Å.....	22
Εικόνα 16: Φάσμα απορρόφησης για αποστάσεις γλυκίνης – ιστιδίνης 1 Å και 1.6 Å.....	23
Εικόνα 17: Φάσμα απορρόφησης για $^{12}\text{C}$ - O .....	23
Εικόνα 18: Φάσμα απορρόφησης για $^{14}\text{C}$ - O .....	24
Εικόνα 19:Φάσμα απορρόφησης για Fe- $^{14}\text{C}$ .....	25
Εικόνα 20:Φάσμα απορρόφησης για Fe- $^{12}\text{C}$ .....	25
Εικόνα 21: Φάσμα απορρόφησης για $^{14}\text{N}$ - O .....	26
Εικόνα 22: Φάσμα απορρόφησης για $^{15}\text{N}$ - O .....	26
Εικόνα 23: Φάσμα απορρόφησης για Fe-N.....	27
Εικόνα 24: Στατιστική Μελέτη για απόσταση γλυκίνης/ιστιδίνης 1Å.....	28
Εικόνα 25: Στατιστική Μελέτη για απόσταση γλυκίνης/ιστιδίνης 4Å.....	28
Εικόνα 26: Φάσμα απορρόφησης για την Ιστιδίνη.....	29
Εικόνα 27: Φάσμα απορρόφησης για την Γλυκίνη.....	30

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CcO	Cytochrome c Oxidase
FF	Force Field
sGC	Soluble guanylate cyclase
CooA	Ο οξειδωτικός παράγοντας A
pdb	Protein data bank
CHARMM	Chemistry Harvard Molecular Mechanics
QM	Κβαντικής μηχανικής
OPLS	Optimized Potential for Liquid Simulations
AMBER	Assisted Model Building and Energy Refinement
MD	Μοριακή δυναμική
NEMD	Non Equilibrium Molecular Dynamics
NVE	Micro canonical ensemble
mVT	Grand canonical ensemble
NVT	Canonical ensemble

## ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

DNA	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
Ferryl	Οξειδωτική κατάσταση $Fe^{+4}$ της αίμης
Heme	Αίμη
Coordinated	Συντονισμένο
Trajectory	Τροχιά
Bond stretching	Μήκος δεσμού
Force field parameter	Παράμετρος πεδίου δυνάμεων
Sampling rate of frames	Καταγραφή δομών

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ερευνητικό πεδίο των μοριακών προσομοιώσεων τα τελευταία χρόνια αντιμετωπίζει μια νέα πρόκληση που αφορά στη μελέτη μοριακών συστημάτων βιολογικής σημασίας. Τα προσομοιούμενα συστήματα βιομορίων επιστημονικού ενδιαφέροντος, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, μεμβράνες και αλυσίδες DNA, παρουσία κάποιου διαλύτη, συνήθως νερού, αποτελούνται από δεκάδες άτομα. Προσομοιώσεις τέτοιου είδους συστημάτων απαιτούν σημαντικά μεγάλο υπολογιστικό χρόνο και ισχύ. Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής αποτελούν την πλέον ισχυρή και αξιόπιστη μέθοδο μελέτης των αυτών των συστημάτων. Σύμφωνα με αυτή, ολοκληρώνοντας τις κλασικές εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα υπολογίζονται οι τροχιές των ατόμων του υπο μελέτη συστήματος. Ακολουθώντας, χρησιμοποιώντας τις αρχές της στατιστικής μηχανικής, εκτιμώνται οι ιδιότητες του συστήματος, όπως οι δυναμικές, διαμόρφωσης και θερμοδυναμικές ιδιότητες.

Παρόλο που οι σημερινοί υπολογιστές επιτρέπουν υψηλή απόδοση στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πολύπλοκων συστημάτων, ακόμη και με χρήση μοντέρνων υπερ-υπολογιστών, τα συστήματα αυτά εξακολουθούν να απαιτούν μεγάλο υπολογιστικό χρόνο. Επιστρατεύοντας ένα συνδυασμό γνώσεων από τους ερευνητικούς κλάδους της μαθηματικής φυσικής και της υπολογιστικής επιστήμης, πραγματοποιείται ερευνητική μελέτη στην ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών και αλγορίθμων οι οποίοι συντελούν σημαντικά στην μείωση του απαιτούμενου υπολογιστικού χρόνου. Για παράδειγμα, κεντρική σημασία στο χειρισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αποτελεί η εφαρμογή των περιοδικών συνθηκών, οι οποίες εκτείνονται σε άπειρη απόσταση από το κεντρικό κελί (μοναδιαίο σύστημα) αναφοράς σε τρεις διαστάσεις.

Η μοριακή μοντελοποίηση είναι μια τεχνική που μπορεί να βοηθήσει στην τρισδιάστατη αναπαράσταση μοριακών συστημάτων, καθώς και στον υπολογισμό ή πρόβλεψη των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή. Αποτελεί την γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος. Η υπολογιστική χημεία-βιολογία στοχεύει να αναπτύξει και να χρησιμοποιήσει αποδοτικούς αλγόριθμους, βάσεις δεδομένων και εργαλεία μοριακής απεικόνισης, ώστε να ενορχηστρώσει την ολοκλήρωση της μεγάλης ποσότητας βιολογικών στοιχείων, με στόχο την υπολογιστική μοντελοποίηση. Περιλαμβάνει τη χρήση των υπολογιστικών προσομοιώσεων βιολογικών συστημάτων, για

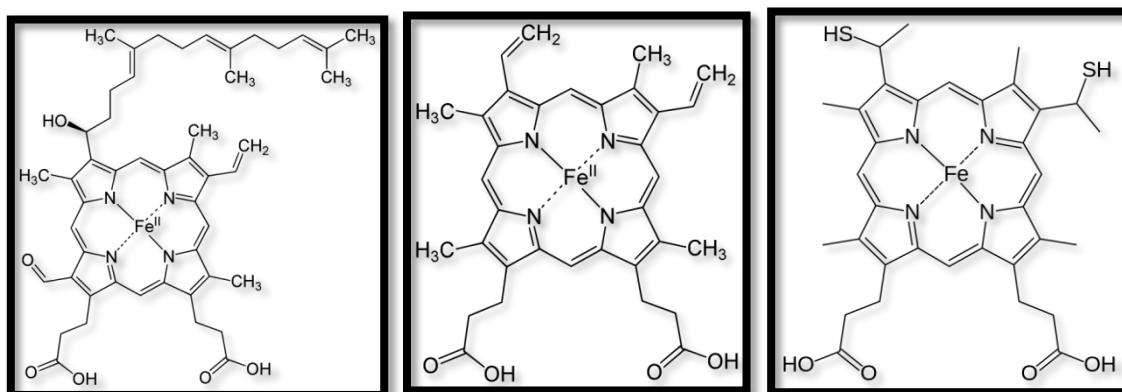
κυτταρικά οικοσυστήματα, ώστε να αναλύσουν και να απεικονίσουν τις σύνθετες συνδέσεις αυτών των κυτταρικών διαδικασιών και να κατανοήσουν εξελικτικές διαδικασίες.

Η θεωρητική μελέτη συνίσταται στο σχεδιασμό ενός μοντέλου – δομής με τη βοήθεια ενός γραφικού περιβάλλοντος σε υπολογιστή και στη συνέχεια με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή και εξειδικευμένου λογισμικού στη βελτιστοποίηση της δομής βάσει Μοριακής Μηχανικής και Δυναμικής. Τελικός σκοπός της παρούσας μελέτης, υπολογιστικά, είναι ο προσδιορισμός του δονητικού φάσματος σε διαφορετικές διαμορφώσεις της αίμης.

# 1 Θεωρητικό υπόβαθρο

## 1.1 Αίμη: Εισαγωγή και Μεταφορά οξυγόνου (Μυοσφαιρίνη, Αιμοσφαιρίνη)

Οι αίμες έχουν μια ευρεία ποικιλία βιολογικών λειτουργιών όπως: Τη μεταφορά των διατομικών αερίων, την αποθήκευση οξυγόνου, οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις των διαφόρων υποστρωμάτων, τη χημική κατάλυση, την ανίχνευση διατομικών αερίων και την μεταφορά ηλεκτρονίων. Ο σίδηρος της αίμης χρησιμεύει ως πηγή ή δεξαμενή των ηλεκτρονίων κατά την διάρκεια μεταφοράς ηλεκτρονίων ή οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Στις αντιδράσεις υπεροξειδάσης το μόριο αίμης (πορφυρίνης) χρησιμεύει ως πηγή ηλεκτρονίων. Συγκεκριμένα κατά την ανίχνευση των διατομικών αερίων η σύνδεση του αερίου με το σίδηρο της αίμης επάγει διαμορφωτικές αλλαγές στην περιβάλλουσα πρωτεΐνη.<sup>[1]</sup>

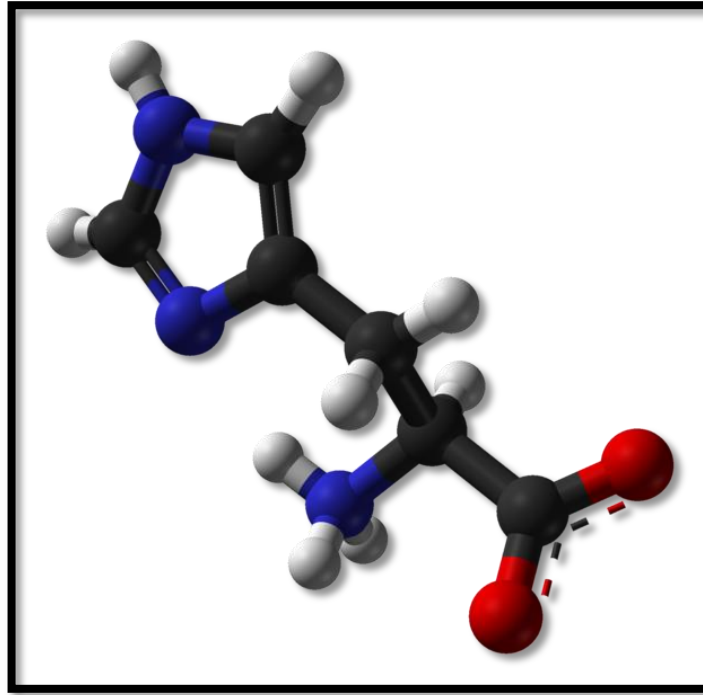


Εικόνα 1: Αίμη A

Αίμη B

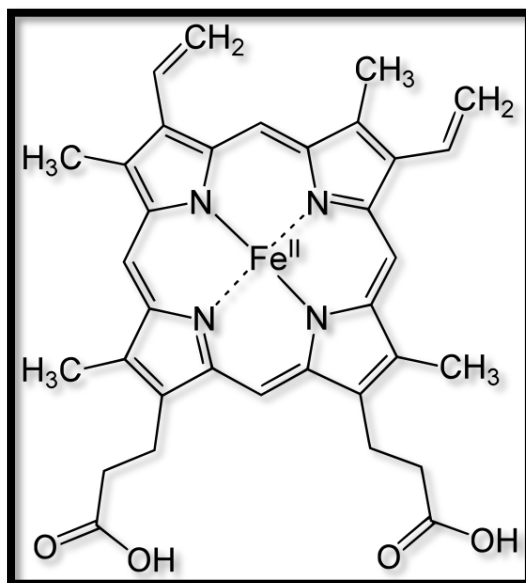
Αίμη C

Οι αίμες έχουν επιτύχει αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στη λειτουργία τους, τροποποιώντας το περιβάλλον του μακρόκυκλου της αίμης εντός του πλέγματος της πρωτεΐνης. Όπως η αιμοσφαιρίνη που έχει την ικανότητα να παραδίδει αποτελεσματικά το οξυγόνο στους ιστούς, το οποίο οφείλεται σε συγκεκριμένα υπολείμματα αμινοξέων που βρίσκονται κοντά στην αίμη. Η αιμοσφαιρίνη δεσμεύει οξυγόνο στο πνευμονικό αγγειακό σύστημα, όπου το pH είναι υψηλό και το CO<sub>2</sub> μειωμένο, και το απελευθερώνει στους ιστούς, αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο Bohr. Το άτομο του Fe<sup>2+</sup> είναι πολύ μεγάλο σε μέγεθος για να ταιριάζει στο εσωτερικό του δακτυλίου της πορφυρίνης γι'αυτό παραμένει έξω από τον δακτύλιο.



**Εικόνα 2 : Ιστιδίνη**

Ωστόσο, κατά την σύνδεση του οξυγόνου, συρρικνώνεται η ακτίνα του Fe (οξειδωση  $+2 \rightarrow +3$ ), δημιουργώντας μια επίπεδη ευθυγράμμιση με το δακτύλιο της πορφυρίνης. Αυτή η αλλαγή προκαλεί την εγγύς ιστοδίνη που συναρμολογείται στο σίδηρο της αίμης, να έλκεται από αυτόν (Fe) με συνέπεια μια διαθρωτική αλλαγή στην  $\alpha$  έλικα όπου ανήκει το κατάλοιπο ιστοδίνης. Το καρβοξυλίο της  $\alpha$  έλικας αλληλεπιδρά με το  $\alpha\beta$  διμερές, δημιουργώντας μια τελική διαμόρφωση στην πρωτεΐνη. Αυτή η αλλαγή διευκολύνει την αυξημένη συγγένεια με το οξυγόνο. Ένα κατάλοιπο ιστοδίνης που βρίσκεται εγγύς στην ομάδα αίμης, στερεοχημικά απελευθερώνει οξυγόνο από την ομάδα της αίμης. Η ομάδα της αίμης δίνει την ικανότητα στη μυοσφαιρίνη και την αιμοσφαιρίνη να δεσμεύουν το οξυγόνο εξαιτίας της παρουσίας του Fe. Κάθε αιμοσφαιρική πρωτεΐνη μπορεί να δεσμεύει 4 μόρια οξυγόνου. Το άτομο του Fe βρίσκεται (πριν τη δέσμευση) στη μορφή  $Fe^{2+}$  και είναι συναρμοσμένο μεταξύ τεσσάρων δακτυλίων πυρολίου αλλά κάμπτεται ελαφρώς μακριά από το επίπεδο (δομή της αίμης). Η εγγύς ιστοδίνη δεν επιτρέπει την απελευθέρωση του οξυγόνου όταν ο Fe είναι στην κατάσταση  $Fe^{3+}$ .



Εικόνα 3: Αίμη

## 1.2 Λειτουργία της αίμης ως αισθητήρας αερίων

Οι αιμο-πρωτεΐνες είναι οι πιο δημοφιλείς μεταλλοπρωτεΐνες με ευρεία ποικιλία λειτουργιών όπως αναφέρθηκε πιο πάνω. Εκτός από την παραδοσιακή λειτουργία της αίμης ως μεταφορέα οξυγόνου, μια κατηγορία αιμο-πρωτεϊνών βασίζει τη λειτουργία της στην “ανίχνευση” αερίων, όπου η αίμη δρα σαν αισθητήρας ενός μορίου. Σε πρόσφατες μελέτες έχουν επεκταθεί στην εύρεση του ρόλου της αίμης ως αισθητήρας αερίων, όπως το οξυγόνο  $O_2$ , το μονοξείδιο του αζώτου  $NO$  και του άνθρακα  $CO$ , καθώς και ως ενδιάμεσα των κυτταρικών αποκρίσεων σε μεταβολές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των αερίων αυτών (μετάδοση σήματος). Η λειτουργία της αίμης βασίζεται στη διαφοροποίηση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν αντιστρεπτά κάποιο αέριο, και το χρησιμοποιούν ως σήμα για παράδειγμα στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, όπως και για έλεγχο της σύνθεσης της ίδιας της αίμης.<sup>[1]</sup>

Πολλές αιμοπρωτεΐνες που δεσμεύουν αέρια είναι γνωστές. Μεταφορείς (όπως η αιμοσφαιρίνη) και αναγωγάσες οξυγόνου (όπως η κυτοχρωμική *c* οξειδάση) «δηλητηριάζονται» από το  $CO$  και το  $NO$  με πρόσδεση στην αίμη που περιέχει σίδηρο. Και τα δύο αέρια έχουν ρυθμιστικό ρόλο, καθώς πολλά μεσολαβούν στην δεσμευτική ικανότητα των αιμοπρωτεϊνών. Η μεταφορά σήματος επιτυγχάνεται συχνά με τις

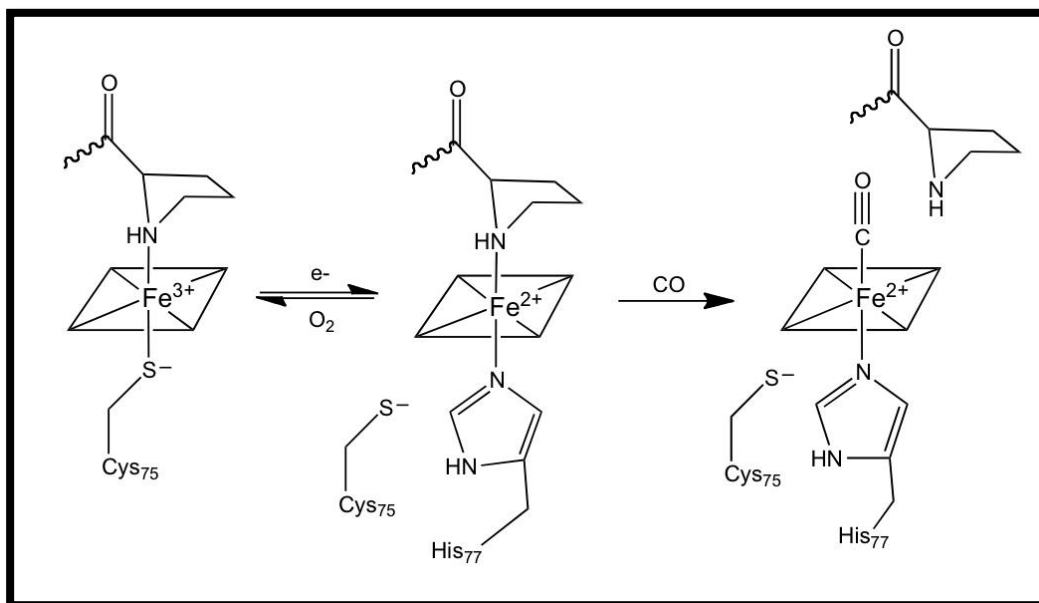


διαθρωτικές διαταραχές μετά την απολίπωση του αιμικού σιδήρου και μετάδοση των διαταραχών με τροποποιημένη δράση σε γειτονικό τμήμα (αλλοστερικό φαινόμενο). Έτσι, αλλάζει η ελεύθερη ενέργεια δέσμησης / αποδέσμησης των αερίων μετατρέπεται σε δομικές διαταραχές και αλλοιώσεις στη δράση και επαγωγής σήματος. Υπάρχουν πέντε πρωτεΐνες με αυτή την ιδιότητα, η *soluble guanylate cyclase* (sGC), η FixL, η DOS, η HemAT και η CooA. Αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν μια αίμη που δρα ως θέση ανίχνευσης του NO (sGC), O<sub>2</sub> (FixL, DOS, HemAT) και CO (CooA). <sup>[1][2][11]</sup>

### 1.3 Μηχανισμός CooA - Αισθητήρας CO

Ο οξειδωτικός παράγοντας A (CooA) είναι ένας μεταγραφικός προαγωγός που βασίζεται στην ανίχνευση του CO. Είναι αιμο-πρωτεΐνη οποία περιέχεται στο βακτήριο *Rhodospirillum rubrum*, το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί σε αναερόβιες συνθήκες χρησιμοποιώντας ως μια μοναδική πηγή ενέργειας το CO. Το CooA ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από συγκεκριμένα γονίδια και συνδέονται με την αναπνοή του βακτηρίου. Είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δύο ταυτόσημες, 222-αμινοξικές υπομονάδες, όπου η κάθε μια περιέχει μια B-τύπου αίμη (εικόνα 1) όπου δεσμεύεται αναστρέψιμα το CO.

Αν και η λειτουργία της αίμης στον παράγοντα A (CooA) ως αισθητήρας ενός αερίου μορίου είναι όμοια όπως και στις άλλες πρωτεΐνες-αισθητήρες, οι δομές συντονισμού της αίμης στο CooA είναι αρκετά διαφορετικοί από ότι στην FixL και sGC. Στην περίπτωση της FixL και sGC, η αίμη είναι *five-coordinated* (ο σίδηρος της αίμης έχει αριθμό συναρμογής 5) με την ιστιδίνη σε μια εγγύτερη σύνδεση στην κατάσταση ηρεμίας, και δεσμεύει το O<sub>2</sub> ή το NO. Αντίθετα, η αίμη στο CooA είναι *six-coordinated* (ο σίδηρος της αίμης έχει αριθμό συναρμογής 6) με τρισθενή σίδηρο, για τη δέσμηση του CO. Ως εκ τούτου το CO πρέπει να αντικαταστήσει έναν από τους αξονικούς υποκατάστατες στην αίμη, στο CooA. <sup>[6][7]</sup>



**Εικόνα 4:** Δομές συντονισμού της αίμης από το CooA. Στην κατάσταση Fe(III), η αίμη συνδέεται με Cys75 και Pro2. Όταν η αίμη είναι ανηγμένη, η Cys75 αντικαθίσταται με His77. Το CooA ενεργοποιείται όταν το CO συνδέεται με την ανηγμένη αίμη, μετατοπίζοντας την Pro2 (κατάλοιπο προλίνης)

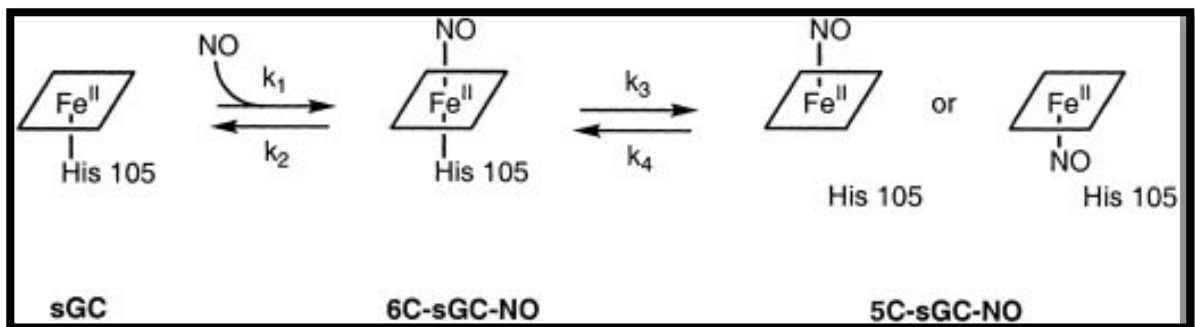
#### 1.4 Μηχανισμός sGC- Αισθητήρας NO

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένα ελεύθερο μόριο που διαχέεται ενδοκυτταρικά και λαμβάνει μέρος σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών στο αγγειακό σύστημα, κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης, το NO αποτελεί ένα κυτταροτοξικό παράγοντα, και προκαλεί αρκετές διαταραχές που χρήζουν κλινικής παρακολούθησης και κυμαίνονται από οξείες, όπως σηπτικό σοκ και εγκεφαλικό επεισόδιο μέχρι μακροχρόνια εκφυλιστικές ασθένειες, όπως σκλήρυνση κατά πλάκας και καρκίνο. Λόγω της σημασίας του στην υγεία, η ρύθμιση της σύνθεσης NO έχει μελετηθεί εκτενώς. Δεν είναι αρκετά κατανοητό σχετικά με το πώς τα σήματα NO αποκωδικοποιούνται και μεταφράζονται κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ο πιο ευρέως γνωστός υποδοχέας NO είναι το ένζυμο διαλυτής γουανυλοκυκλάσης (sGC), η δραστηριότητα του οποίου οδηγεί σε συσσώρευση κυττάρων υποδοχέων cGMP, αλλά πολλές από τις βασικές ιδιότητες της ενεργοποίησης του sGC στα κύτταρα παραμένουν ασαφείς. <sup>[2][3]</sup>

Η διαλυτή γουανυλοκυκλάση (sGC) είναι ο μόνος γνωστός υποδοχέας για το μονοξείδιο του αζώτου, NO. Το sGC είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από μια Α και μια δεσμευμένη Β αίμη. Στην κατάσταση Fe (II) η ομάδα της αίμης είναι υποδοχέας/

δέκτης του μονοξειδίου του αζώτου. Το NO οδηγεί σε τουλάχιστον 200 φορές αύξηση της δραστηριότητας της sGC. Το NO έχει μια ισχυρή *trans* επίδραση, στην οποία ο δεσμός ιστιδίνης-σιδήρου εξασθενεί όταν το NO δεσμεύεται και απεντοπίζει ηλεκτρόνια στο τροχιακό  $dz^2$  του αξονικού υποκαταστάτη. Συνεπώς, το μονοξείδιο του αζώτου όταν δεσμεύεται στην αίμη δίνει ένα σύμπλοκο His-Fe-NO που μετατρέπεται σε 5-coordinated σύμπλοκο Fe-NO.

Ωστόσο, ο προσδιορισμός των δύο διαδικασιών, που εξαρτώνται από την ενεργοποίηση του sGC έχει οδηγήσει στην πεποίθηση πως το NO είναι υπεύθυνο για την μετατόπιση της ιστιδίνης, δίνοντας ένα ενδιάμεσο 6-coordinate σύμπλοκο NO-Fe-NO. Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, το Fe (II) στο sGC μπορεί να οξειδωθεί και να χάσει την αίμη. Χωρίς την αίμη δεν ανταποκρίνεται πλέον στο NO. Επιπλέον, το sGC περιέχει μια αλλοστερική θέση, στην οποία δεσμεύονται sGC διεγέρτες. Αυτοί ενισχύουν τη μεταφορά σήματος από το σύμπλοκο NO-sGC, έτσι με χαμηλότερες από τις δραστικές συγκεντρώσεις του NO να επιτευχθεί μια μέγιστη ενεργοποίηση της sGC. [3]



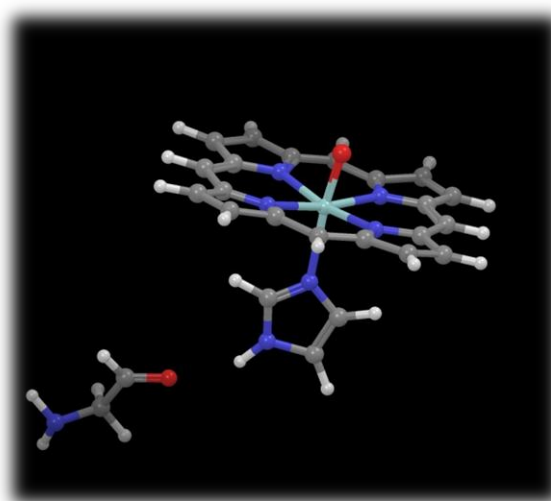
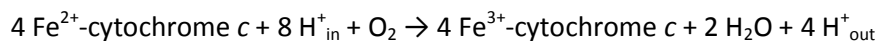
Εικόνα 5: Μοντέλο για την ενεργοποίηση του sGC

### 1.5 Οξειδοαναγωγική Δράση της Αίμης

Το ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης είναι ένα σημαντικό μεταλλοένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας σε πολλούς αερόβιους οργανισμούς. Καταλύει την αναγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων του οξυγόνου προς νερό χωρίς την απελευθέρωση βλαβερών ενδιάμεσων όπως το  $H_2O_2$ . Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από μια αίμη και ένα κατιόν χαλκού το οποίο είναι συναρμοσμένο με τρεις ιστιδίνες. Μια από τις ιστιδίνες

με τις οποίες είναι συναρμοσμένος ο χαλκός είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με ένα κατάλοιπο τυροσίνης.<sup>[10]</sup>

Ηλεκτρόνια διέρχονται από το κυτόχρωμα c, διαμέσου ενός κέντρου Cu<sub>A</sub> και της αίμης α στο ενεργό κέντρο α<sub>3</sub>- Cu<sub>B</sub>. Το προσδεμένο οξυγόνο μετατρέπεται σε νερό μέσω ενδιάμεσων προϊόντων. Το οξυγόνο ανάγεται, κατά 3 ηλεκτρόνια που καταλήγουν στο κέντρο Fe<sup>2+</sup> α<sub>3</sub>, με το *ferryl oxo* (Fe<sup>4+</sup>=O) ενδιάμεσο να προκύπτει.



Εικόνα 6: Αίμη (Ferryl-oxo δομή)

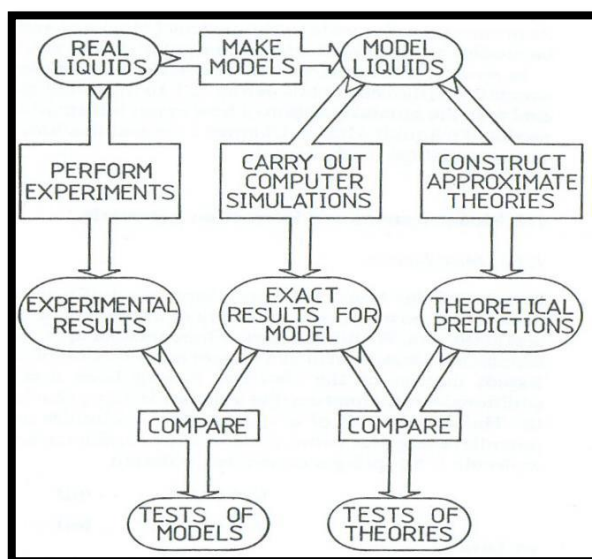
## 1.6 Σκοπός της παρούσας διατριβής

Σκοπός της διατριβής είναι να μελετήσουμε φασματοσκοπικά τις αλλαγές που συμβαίνουν στην αίμη όταν αυτή αλληλεπιδρά με τα αέρια CO, NO καθώς επίσης και στο ενδιάμεσο ferryl-oxo της αναγωγής του O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O στην βακτηριακή αναπνοή, ένα ενδιάμεσο μετά τη σχάση του δεσμού O-O κατά την αγωγή του μοριακού οξυγόνου. Έτσι, καθώς υπάρχει ένα κοινό στοιχείο σε όλα αυτά – η *εγγύς ιστιδίνη* – είναι να μεταβάλουμε τη θέση της και να μελετάμε πως επηρεάζονται τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά στη θέση δέσμευσης των αερίων στην αίμη. Αν τα επηρεάζει η θέση της ιστιδίνης ή όχι και κατά πόσο η μέθοδος της μοριακής δυναμικής σε μικρό σύστημα (αίμη) μπορεί να δώσει σωστά αποτελέσματα, συγκρίνοντας τα με άλλη μέθοδο όπως κβαντική ή πειραματικά αποτελέσματα στη βιβλιογραφία.

## 2 Θεωρητικό υπόβαθρο προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής

*The purpose of models is not to fit the data but to sharpen the questions.  
Samuel Karlin.*

Ένας συνδετικός κρίκος μεταξύ θεωρητικού και πειραματικού υπόβαθρου είναι οι μοριακές προσομοιώσεις. Στην Εικόνα 7 αναπαριστάται η σύνδεση μεταξύ πειράματος, θεωρίας και προσομοίωσης. Τα αποτελέσματα των μακροσκοπικών ιδιοτήτων της προσομοίωσης και του πειράματος πρέπει να συμπίπτουν για να είναι σωστό το μαθηματικό μοντέλο. Εάν δεν συμπίπτουν τότε θα πρέπει να γίνει κάποια βελτίωση ή κάποια αλλαγή στο συγκεκριμένο μαθηματικό μοντέλο ή τη θεωρία. Παρόλα αυτά γίνονται συγκρίσεις μεταξύ των θεωρητικών προβλέψεων με τα αποτελέσματα και αν δεν συμπίπτουν, τότε τα λάθη θα πρέπει να εντοπιστούν στις παραδοχές της θεωρίας.



Εικόνα 7: Σύνδεση μεταξύ πειράματος, θεωρίας και προσομοίωσης

Οι τεχνικές μοριακών προσομοιώσεων είναι ικανές να προβλέψουν τις χημικές, φυσικές, θερμοδυναμικές και λοιπές ιδιότητες των υλικών. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την μοριακή προσομοίωση είναι η μοριακή δυναμική (Molecular Dynamics, MD). Η μεθοδολογία περιλαμβάνει ένα τυπικό «χτίσιμο» (setup) του

συστήματος, συμπεριλαμβανόμενης της αναπαράστασης των μορίων από συλλογές ατόμων με επίκεντρο τις περιοχές ιδιαίτερης σημασίας ή σημεία αλληλεπίδρασης, αξιοποίηση των κλασικών πεδίων δυνάμεων για τους πιθανούς όρους ενέργειας που συμβάλουν στην ενέργεια του συστήματος και εφαρμογή των περιοδικών οριακών συνθηκών. Για τη μοριακή δυναμική μια νέα διαμόρφωση γίνεται με την επιλογή «τυχαίων» θέσεων των ατόμων ενός μορίου, μετατοπίζοντάς τα στο σύστημα συντεταγμένων, περιστρέφοντας τα, καθώς και με την εκτέλεση διαφόρων άλλων διαθρωτικών μεταβολών-διαταραχών. Οι νέες διαμορφώσεις για την νέα ατομική θέση και τις ταχύτητες προκύπτουν από την εφαρμογή των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα για όλα τα άτομα ταυτόχρονα με μικρό χρονικό βήμα. Στη μοριακή δυναμική το πεδίο δυνάμεων ελέγχει τη συνολική ενέργεια (MM) και τις δυνάμεις (MD) που δρουν στα άτομα, το οποίο καθορίζει την εξέλιξη των συστημάτων.<sup>[4][5]</sup>

Η τεχνική μοριακής προσομοίωσης διακρίνεται σε μοριακή δυναμική ισορροπίας (MD) και σε μη μοριακή δυναμική ισορροπία (Non Equilibrium Molecular Dynamics, NEMD). Στην πρώτη τεχνική παρακολουθείται η χρονική εξέλιξη ενός μικροσκοπικού συστήματος έως ότου φτάσει σε ισορροπία, έτσι προκύπτουν εξισορροπημένες απεικονίσεις και στην συνέχεια υπολογίζονται οι ιδιότητες. Στη δεύτερη περίπτωση μία δύναμη υποκινεί το σύστημα μακριά από την κατάσταση ισορροπίας.

Η μοριακή μηχανική βασίζεται στην αρχή κατά την οποία το άθροισμα των φυσικών δυνάμεων, οι οποίες ενεργούν πάνω σε ένα μόριο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν τη τελική γεωμετρία και ενέργεια του μορίου. Η τελική διαμόρφωση του μορίου αυτού στο χώρο είναι αυτή της ελάχιστης ολικής εσωτερικής ενέργειας. Η μοριακή μηχανική απαιτεί την κατασκευή μιας συνάρτησης, η οποία θα περιγράφει την δυναμική ενέργεια του συστήματος σε συνάρτηση των θέσεων των ατόμων που το απαρτίζουν, ταφορτία, και τις μάζες. Οι τελευταίοι παράμετροι λαμβάνονται συνήθως από πειραματικά δεδομένα. Οι αρχές στις οποίες βασίζεται η μοριακή δυναμική είναι τρεις. Η πρώτη είναι η βασική θερμοδυναμική υπόθεση, κατά την οποία ένα σύστημα οδηγείται αυθόρμητα σε κατάσταση χαμηλότερης ελεύθερης ενέργειας. Η προσθετικότητα των δυναμικών είναι η δεύτερη αρχή. Οι δυνάμεις, οι οποίες επενεργούν στα άτομα εκφράζονται ως άθροισμα των δεσμικών και μη δεσμικών δυνάμεων. Η τρίτη αρχή είναι αυτή της δυνατότητας μεταφοράς και εφαρμογής των υπολογισθέντων από απλές αντιπροσωπευτικές δομές δυναμικών σε άλλα πολυπλοκότερα μόρια, τα οποία αποτελούνται από τις ίδιες χημικές υπομονάδες, εισάγοντας με αυτό τον τρόπο την έννοια

του τύπου ατόμου. Ο τύπος ατόμου απεικονίζει το περιβάλλον κάθε ατόμου (δεσμούς και λοιπές αλληλεπιδράσεις)

Η θερμοδυναμική κατάσταση ενός συστήματος καθορίζεται από μικρό αριθμό παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, η πίεση και ο αριθμός των σωματιδίων του συστήματος. Άλλες θερμοδυναμικές ιδιότητες μπορούν να παραχθούν από τις καταστατικές και από άλλες βασικές θερμοδυναμικές εξισώσεις. Με βάση τη θερμοδυναμική υπόθεση, ένα φυσικό σύστημα μεταβάλλεται με τον χρόνο κατευθυνόμενο σε κατάσταση μικρότερης ελεύθερης ενέργειας. Η μικροσκοπική ή μηχανική κατάσταση ενός συστήματος καθορίζεται από την θέση  $q$  και την ορμή  $p$  του κάθε ατόμου που απαρτίζει το σύστημα. Τα  $q$  και  $p$  μπορούν να θεωρηθούν ως συντεταγμένες ενός πολυδιάστατου χώρου, του *phase space*. Όλες οι πιθανές καταστάσεις των  $q$  και  $p$  σε συνάρτηση με τον χρόνο, δίνουν τα διαγράμματα φάσεων. Το σύνολο των σημείων του *phase space* που ικανοποιεί τις συνθήκες μιας συγκεκριμένης θερμοδυναμικής κατάστασης ονομάζεται *ensemble*. Ένα *ensemble* είναι το σύνολο όλων των μικροκαταστάσεων, οι οποίες μπορούν να έχουν διαφορετικές μικροσκοπικές καταστάσεις, έχουν όμως ίδια μακροσκοπική ή θερμοδυναμική κατάσταση. Υπάρχουν διάφορα *ensemble* με διαφορετικά χαρακτηριστικά: Το ισοβαρές- ισόθερμο *ensemble* (NPT), χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο αριθμό ατόμων  $N$ , σταθερή πίεση  $P$  και σταθερή θερμοκρασία  $T$ , το *micro canonical ensemble* (NVE), χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο αριθμό ατόμων  $N$ , σταθερό όγκο  $V$  και σταθερή ενέργεια  $E$ . Το *canonical ensemble* (NVT), χαρακτηρίζεται επίσης από συγκεκριμένο αριθμό ατόμων  $N$ , σταθερό όγκο  $V$ , αλλά και από σταθερή θερμοκρασία  $T$ . Τέλος υπάρχει και το *Grand canonical ensemble* ( $mVT$ ) του οποίου η θερμοδυναμική κατάσταση έχει ως χαρακτηριστικό συγκεκριμένο χημικό δυναμικό  $m$ , σταθερό όγκο  $V$  και σταθερή θερμοκρασία  $T$ . Στην παρούσα πτυχιακή κατά την μοριακή προσομοίωση χρησιμοποιήθηκε το *canonical ensemble* (NVT), με συγκεκριμένο αριθμό ατόμων  $N$ , σταθερό όγκο  $V$ , αλλά και με σταθερή θερμοκρασία  $T$ .

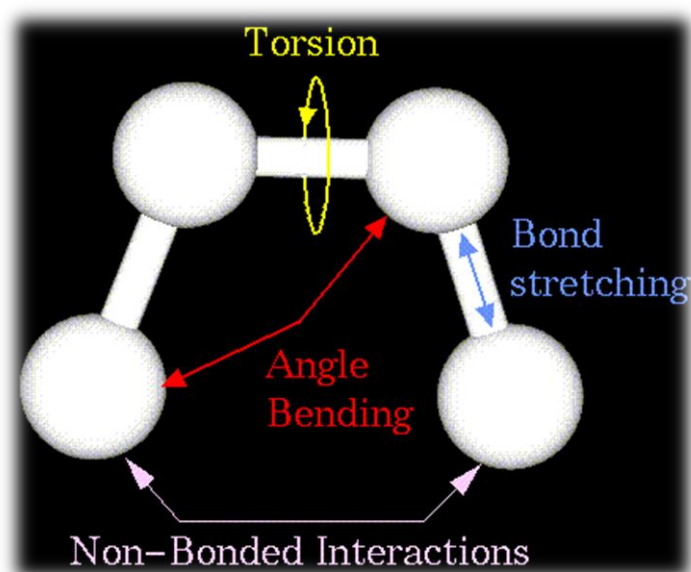
Η Μοριακή Δυναμική επιτρέπει την αλληλεπίδραση των ατόμων ενός μορίου για μια χρονική περίοδο και προβλέπει την μοριακή κίνηση σε ατομικό επίπεδο κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου. Με την υπολογιστική μέθοδο των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής υπολογίζεται η συμπεριφορά ενός μοριακού συστήματος συναρτήσει του χρόνου παρέχοντας λεπτομερή πληροφορία για τις διακυμάνσεις και τις αλλαγές διαμόρφωσης του υπό προσομοίωση μορίου.

Η μέθοδος των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής βασίζεται στον δεύτερο νόμο της κίνησης του Νεύτωνα. Σύμφωνα με τον οποίο προβλέπεται η επιτάχυνση ενός αντικειμένου, δεδομένης της μάζας του και της συνολικής δύναμης η οποία εφαρμόζεται σε αυτό. Ο νόμος αυτός εκφράζεται με την εξίσωση  $F=m*a$ , όπου  $F$  είναι η συνολική δύναμη,  $m$  είναι η μάζα του σώματος και  $a$  η επιτάχυνση του. Το ολοκλήρωμα της παραπάνω συνάρτησης παράγει μια τροχιά (*trajectory*), η οποία περιγράφει τις θέσεις, τις ταχύτητες και τις επιταχύνσεις των σωματιδίων (ατόμων) του συστήματος σε όλη την διάρκεια του χρόνου προσομοίωσης.

## 2.1 Πεδία Δυνάμεων (Force fields)

Στα πλαίσια μιας μοριακής μοντελοποίησης τα πεδία δυνάμεων αναφέρονται στη μορφή και τις παραμέτρους των μαθηματικών συναρτήσεων που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη δυναμική ενέργεια των σωματιδίων του συστήματος. Τόσο τα πεδία δυνάμεων όσο και οι παράμετροι προέρχονται από πειραματικές εργασίες αλλά και από υπολογισμούς κβαντικής μηχανικής. Η βασική λειτουργία ενός πεδίου δυνάμεων είναι να περιλάβει τόσο τους όρους που σχετίζονται με άτομα που συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς, αλλά και με μη ομοιοπολικούς δεσμούς που περιγράφουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και τις δυνάμεις *Van der Waals*. Η ειδική διάσπαση των όρων εξαρτάται από το πεδίο δυνάμεων ωστόσο, μια γενική μορφή του της συνολικής ενέργειας είναι:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{bonds}} + E_{\text{angles}} + E_{\text{improper - dihedrals}} + E_{\text{torsion - dihedrals}} + E_{\text{non - bonded}}$$



Εικόνα 8: Πεδία Δυνάμεων



Οι τέσσερις πρώτοι όροι τις εξίσωσης περιγράφουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ δεσμικών ατόμων, ενώ ο τελευταίος όρος μπορεί να αναλυθεί ως:

$$E_{\text{non-bonded}} = E_{\text{VDW}} + E_{\text{electrostatic}}$$

όπου περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μη δεσμικών ατόμων (non-bonded interactions).

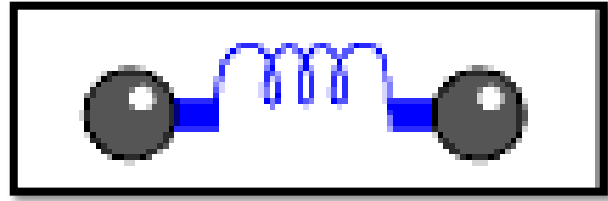
Εκτός από τη συνολική ενέργεια του συστήματος σε μια εξίσωση, ένα δυναμικό πεδίο ορίζει ένα σύνολο παραμέτρων για κάθε τύπο ατόμου. Το τυπικό σύνολο των παραμέτρων περιλαμβάνει τιμές για την ατομική μάζα, την ακτίνα *van der Waals*, φορτία για μεμονωμένα άτομα, και φορτία ισορροπίας των ομολόγων, μήκη (που καθορίζονται από την αναπαράσταση των δεσμών ως ένα αρμονικό ταλαντωτή τύπου ελατηρίου), επίπεδες γωνίες τριών ατόμων και διέδρες γωνίες τεσσάρων ατόμων και οι τιμές της σταθεράς ελατηρίου για κάθε δεσμική αλληλεπίδραση. <sup>[8][9]</sup>

Όλα τα πεδία δυνάμεων βασίζονται σε πολυάριθμες προσεγγίσεις που προέρχονται συνήθως, όπως αναφέρθηκε, από πειραματικά δεδομένα. Για τον λόγο αυτό ονομάζονται 'εμπειρικά'. Μελέτες σε πρωτεΐνες πρωτεϊνών και άλλα βιολογικά μακρομόρια κυριαρχούνται από προσεγγίσεις βασιζόμενες σε εμπειρικά πεδία δυνάμεων. Ονομαστικά, κάποια από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα πεδία δυνάμεων είναι το AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*), το οποίο χρησιμοποιείται για πρωτεΐνες και DNA, το OPLS (*Optimized Potential for Liquid Simulations*), το GROMOS, το ECEPP και το TINKER και το CHARMM (*Chemistry Harvard Molecular Mechanics*) το οποίο χρησιμοποιείται τόσο για μικρά μόρια, όσο και για μακρομόρια. Παρακάτω αναφέρονται οι συνηθέστερες μορφές των σχέσεων που περιγράφουν τις προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις.

## 2.2 Αρμονικό δυναμικό

Η μεταβολή του μήκους δεσμού (*bond stretching*) μεταξύ δύο ατόμων μεταβάλλει την ενέργεια του μορίου. Το δυναμικό το οποίο περιγράφει αυτή την μεταβολή της ενέργειας στην αρμονική του μορφή έχει ως εξής:

$$V_{\text{bond}} = \sum_{\text{bonds}} k_{\text{r}}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_e)^2$$



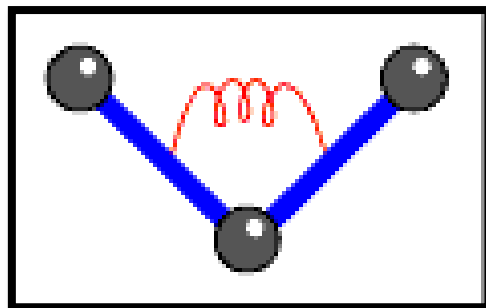
Εικόνα 9: Αρμονικό δυναμικό μεταξύ δύο ατόμων

Ο συντελεστής  $k_{\text{r}}$  καθορίζεται από το εκάστοτε δυναμικό πεδίο όπου χρησιμοποιείται για αυτό και ονομάζεται παράμετρος πεδίου δυνάμεων (*force field parameter*). Περιγράφει την ακαμψία του δεσμού μεταξύ δύο ατόμων και είναι διαφορετική για κάθε ζεύγος δέσμιων ατόμων. Ενώ, με  $r_e$  περιγράφεται το μήκος του δεσμού όταν αυτός βρίσκεται σε θέση ισορροπίας.

### 2.3 Μεταβολές επίπεδων γωνιών

Το άνοιγμα ή κλείσιμο των γωνιών από την θέση ισορροπίας μεταβάλλουν την ενέργεια ενός μορίου. Το δυναμικό το οποίο χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια τέτοια μεταβολή είναι αρμονικής μορφής και έχει ως ακολούθως :

$$V_{\text{bend}} = k_{\theta}(\theta - \theta_0)^2$$

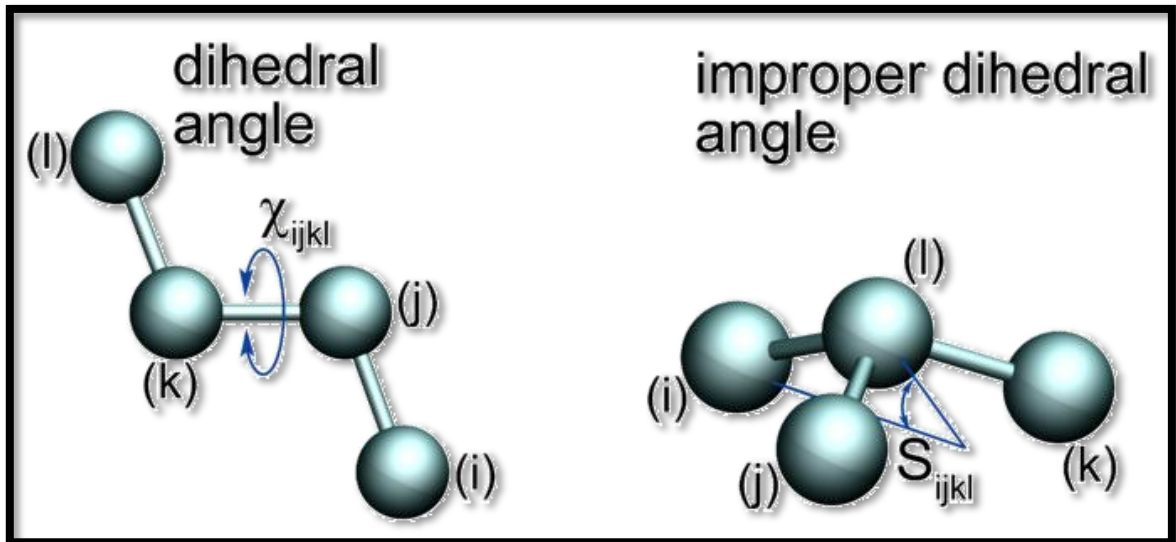


Εικόνα 10: Μεταβολές επίπεδων γωνιών

Η παράμετρος του δυναμικού πεδίου είναι η  $k_{\theta}$  και περιγράφει τη δυσκολία με την οποία μεταβάλλονται αυτές οι γωνίες, ενώ έχει διαφορετική τιμή για κάθε τριάδα ατόμων. Παράλληλα με  $\theta_0$  περιγράφεται η γωνία ισορροπίας.

## 2.4 Μεταβολές δίδερων γωνιών

Διεδρη γωνία ονομάζεται η γωνία που σχηματίζεται από δύο τεμνόμενα επίπεδα. Μεταβολή σε μια διεδρη γωνία ενός μορίου όπου μετέχουν τέσσερα άτομα, προκαλεί μεταβολή και στην ενέργεια του. Υπάρχουν δύο ειδών μεταβολές δίδερων γωνιών:



Εικόνα 11: Μεταβολές δίδερων γωνιών

A) Αν στο σχηματισμό της διεδρης γωνίας που μεταβάλλεται υπάρχει άτομο το οποίο ενώνεται με τρία άλλα άτομα, τότε το δυναμικό που αντιστοιχεί στη μεταβολή αυτή χαρακτηρίζεται ως *improper* και περιγράφεται με την πιο κάτω εξίσωση:

$$V_{\text{improper - dihedrals}} = \sum_{\text{impropers}} k\omega(\omega - \omega_0)^2$$

Παράμετρος δυναμικού πεδίου εδώ είναι η  $k\omega$ . Περιγράφει τη δυσκολία με την οποία μεταβάλλονται αυτές οι γωνίες ενώ έχει διαφορετική τιμή για κάθε τετράδα ατόμων. Με  $\omega_0$  η γωνία ισορροπίας.

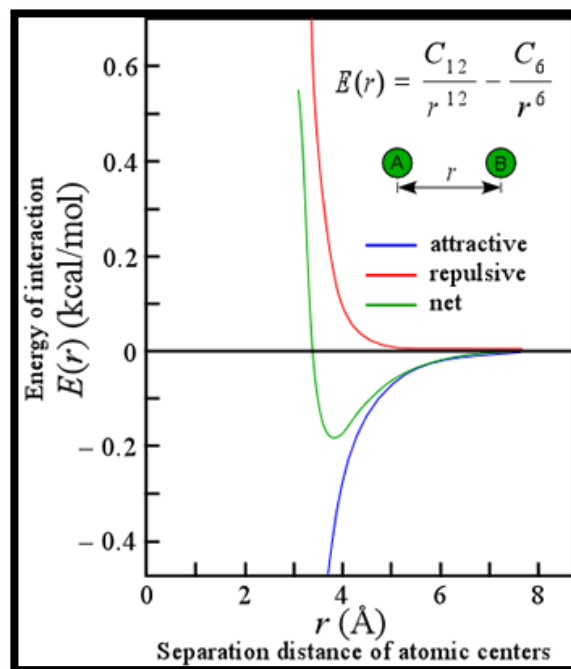
B) ) Αν στο σχηματισμό της διεδρης γωνίας που μεταβάλλεται κάθε άτομο ενώνεται το μέγιστο με άλλα δύο, τότε το δυναμικό που αντιστοιχεί στη μεταβολή αυτή χαρακτηρίζεται ως *torsional* και το περιγράφεται με την πιο κάτω εξίσωση:

$$V_{\text{torsion - dihedrals}} = \sum_{\text{impropers}} \frac{V_n}{2[1 + \cos(n\phi - \phi_0)]}$$

Η παράμετρος δυναμικού πεδίου  $V_n$  καθορίζει την ευκολία με την οποία μεταβάλλεται η διεδρη γωνία. Το  $n$  καθορίζει την περιοδικότητα της καμπύλης του δυναμικού που προκύπτει.

## 2.5 Αλληλεπιδράσεις Van der Waals

Ο δεσμός *Van der Waals* οφείλεται σε "στιγμαϊές" μετατοπίσεις των ηλεκτρονίων και των πυρήνων στα αντίθετα άκρα των ατόμων/ μορίων, που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δίπολων. Αυτό προκύπτει όταν ουδέτερα άτομα και μόρια τα οποία δεν έχουν διαθέσιμα ηλεκτρόνια σθένους προς δημιουργία ιοντικού, ομοιοπολικού ή μεταλλικού δεσμού δείχνουν μια ασθενή έλξη το ένα προς το άλλο όταν βρεθούν πολύ κοντά.



Εικόνα 12: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals

Παρά το γεγονός ότι είναι ασθενέστερες από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις και τους δεσμούς υδρογόνου, είναι σημαντικές για τα βιολογικά συστήματα. Οι δυνάμεις van der Waals είναι τριών ειδών:

- **Δύναμη δίπολου-δίπολου:** Αλληλεπίδραση μορίων με μόνιμη διπολική ροπή (λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής φορτίου στο κάθε μόριο). Το μόριο αλληλεπιδρά με το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από το άλλο μόριο.

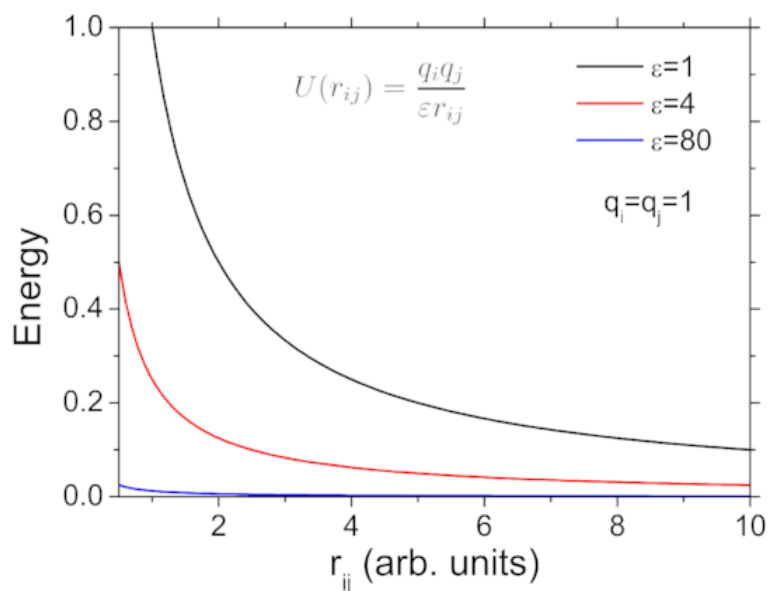
- **Δύναμη δίπολου-δίπολου εξ επαγωγής:** Το ηλεκτρικό πεδίο του ενός μορίου-δίπολου πολώνει το δεύτερο μόριο.
- **Δυνάμεις διασποράς:** Δύναμη μεταξύ μη πολικών μορίων. Λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής φορτίου στο κάθε μόριο τα φορτία του ενός, όταν τα μόρια έλθουν κοντά, "αισθάνονται" τα φορτία του άλλου.

## 2.6 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Για τον υπολογισμό της ενέργειας ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων θεωρούμε κάθε άτομο φορτισμένο. Σ' αυτήν την περίπτωση, η ενέργεια για μια αλληλεπίδραση ατόμων  $i, j$  υπολογίζεται από τη σχέση:

$$V = 332 \times \frac{q_i \times q_j}{D \times r_{ij}}$$

όπου  $q_i, q_j$  τα φορτία των ατόμων  $i, j$  σε μονάδες ηλεκτρονικού φορτίου,  $r_{ij}$  η απόσταση των ατόμων  $i, j$  σε Å και  $D$  η διηλεκτρική σταθερά του μέσου. Η σταθερά 332.0 έχει επιλεγεί έτσι ώστε η ενέργεια να υπολογίζεται σε kcal/mole. Η χρήση της σχέσης αυτής συνεπάγεται γνώση της διηλεκτρικής σταθεράς  $D$ . Για το νερό είναι 80.



Εικόνα 13: Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Χρειάζονται ακριβής πεδία δυνάμεων για την περιγραφή των βιολογικών συστημάτων για την προσομοίωση τους με την μοριακή δυναμική. Στην παρούσα μελέτη, για την κυτοχρωμική *c* οξειδάση (CcO) (κατάσταση σιδήρου  $Fe^{+4}$  στο ενδιάμεσο Ferryl που μελετήθηκε), απαιτούνται παράμετροι, για την οξειδωμένη της μορφή  $Fe^{+4}$ . Η προσθετική ομάδα της αίμης αλλάζει το ρόλο της σε μια ποικιλία βιολογικών συστημάτων, όπως αναφέρθηκε: μεταφορά οξυγόνου, μεσολαβεί στην μεταφορά ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να πρέπει να χρησιμοποιούνται διαφορετικά πεδία δυνάμεων για κάθε περίπτωση. Ωστόσο για την περίπτωση της συναρμογής των αερίων CO και NO χρησιμοποιήθηκαν παράμετροι για την ανηγμένη μορφή της αίμης. Η ανοιγμένη αίμη από την πρωτεΐνη Rb. Sphaeroides χρησιμοποιήθηκε για υπολογισμούς κβαντικής μηχανικής (QM) και εξετάστηκαν τα αποτελέσματα των παραμέτρων των κλασικών πεδίων δυνάμεων CHARMM27 και AMBER. Έχει βρεθεί ότι οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπεύουν τις γεωμετρίες που λαμβάνονται με υπολογισμούς κβαντικής μηχανικής. Μέσω αυτών των μελετών πάρθηκαν οι παράμετροι που χρειάζονταν για τα πεδία δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκαν για τους υπολογισμούς της μοριακής δυναμικής στην παρούσα μελέτη. <sup>[8][9]</sup>

### 3 Απαιτούμενα αρχεία για προσομοίωση μοριακής δυναμικής

Οι πληροφορίες οι οποίες αναφέρονται στο κεφάλαιο αυτό αφορούν τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, οι οποίες επιτεύχθηκαν με χρήση των προγραμμάτων Desmond, VMD, Matlab και την χρήση του CHARMM force field τροποποιημένου ανάλογα για να προσαρμόζεται στο κάθε υπό μελέτη σύστημα (βιβλιογραφική αναφορά στην εργασία που περιλαμβάνει αυτό το πεδίο δυνάμεων). Για τις προσομοιώσεις με χρήση άλλων προγραμμάτων και πεδίων δυνάμεων η διαδικασία είναι παρόμοια, ωστόσο επικεντρωνόμαστε αποκλειστικά στη διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Για τις αρχικές δομές χρειάζεται ένα αρχείο συντεταγμένων από τη βάση δεδομένων δομών βιολογικών μακρομορίων - *protein data bank* (αρχείο pdb) - . Στο αρχείο αυτό βρίσκονται αποθηκευμένες οι συντεταγμένες των ατόμων της αίμης, πληροφορία η οποία απαιτείται για την προετοιμασία του συστήματος. Χρειάζεται ακόμα ένα αρχείο με τον χάρτη τοπολογίας του πεδίου δυνάμεων, το οποίο καθορίζει τον τύπο, τη μάζα και το φορτίο του κάθε ατόμου και παρέχει πληροφορίες για την ομοιοπολική σύνδεση ανάμεσα στα άτομα. Το αρχείο αυτό μαζί με το αρχείο pdb χρειάζεται για τη δημιουργία του αρχείου cms όπου περιλαμβάνονται οι πληροφορίες για την «υπολογιστική» αναπαράσταση του υπό μελέτη μορίου και την περιγραφή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του στοιχείων. Χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση μόνο το τμήμα της αίμης.

Στο παραγόμενο αρχείο (cms) βρίσκονται αποθηκευμένες οι πληροφορίες, οι οποίες σχετίζονται με την δομή του συστήματος. Χωρίζεται σε επτά σημαντικές ενότητες. Στην πρώτη αναφέρονται τα άτομα του συστήματος, στη δεύτερη οι ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των ατόμων, στην τρίτη οι γωνίες τις οποίες σχηματίζουν τρία συνδεδεμένα άτομα. Η τέταρτη ενότητα αφορά τις διέδρες γωνίες που σχηματίζουν τέσσερα συνδεδεμένα άτομα. Η πέμπτη αφορά τις *improper* γωνίες ,για να εμποδίζεται η παραμόρφωση μεταξύ ενός ατόμου και άλλων τριών ομοιοπολικά συνδεδεμένων. Η έκτη αφορά τα φορτία των ατόμων και η έβδομη τις εξαιρέσεις ατόμων που είναι δεσμικά συνδεδεμένα από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις..

Τέλος χρειάζεται ακόμα ένα αρχείο, που δίνει στο Desmond τις παραμέτρους της προσομοίωσης. Το πρώτο αρχείο παραμέτρων της προσομοίωσης είναι το .cfg file (Παράρτημα). Το .cfg file καθορίζει τα αρχεία που περιέχουν την μοριακή δομή και τις

αρχικές συντεταγμένες, τη θερμοκρασία του συστήματος κατά την προσομοίωση, το χρόνο για την προσομοίωση (στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε συνολικός χρόνος 500ps με βήμα χρόνου 0,0015ps και καταγραφή δομών – *sampling rate of frames* – ανά 0,003ps),.

### 3.1 Τα στάδια για την προετοιμασία του συστήματος

Το πρώτο στάδιο, το οποίο πρέπει να ολοκληρωθεί πριν ουσιαστικά αρχίσει η προσομοίωση είναι αυτό το οποίο ονομάζουμε προετοιμασία του συστήματος. Κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου δημιουργούμε τα αρχεία *cms*, *cfg* τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στο αμέσως επόμενο στάδιο. Για να δημιουργηθεί το αρχείο *cms* πρέπει από ένα αρχείο που περιέχει όλες τις παραμέτρους του συστήματος να απομονώσουμε τα στοιχεία της αίμης. Αυτό γίνεται με το πρόγραμμα *Maestro* όπου αφαιρούμε όλα τα υπόλοιπα άτομα εκτός από την αίμη (που είναι ενωμένη με μια ιστιδίνη η οποία αλληλεπιδρά με μια γλυκίνη στην απομακρυσμένη περιοχή της αίμης). Ακολούθως αφού διορθώσουμε τις παραμέτρους που απαιτείται στο αρχείο όπως φορτία, δεσμοί, γωνίες και διέδρες, βάση των παραμέτρων που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, τότε προσωρούμε στο επόμενο στάδιο. Το αρχείο που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη αποτελείται από 56 άτομα στο ένα αρχείο που είναι για το οξυγόνο Fe=O ferryl ενδιάμεσο. Ενώ στα άλλα δύο προσθέτουμε το άτομο του άνθρακα C και του αζώτου N που είναι ενωμένα με την αίμη, με τελικό αριθμό ατόμων τα 57.

Μέσω του αλγόριθμου *SHAKE* κρατώνται σταθερές οι αποστάσεις δύο ατόμων, ενός από την ιστιδίνη της αίμης και ενός της γλυκίνης. Δημιουργώντας έτσι αρχεία για τις αποστάσεις από 1 Å μέχρι 4 Å. Αυτό έγινε για όλα τα αρχεία όπου η αίμη είχε δεσμευμένο πάνω στον σίδηρο της τα εξής άτομα ή ζεύγη ατόμων:  $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{12}\text{C}$  -  $^{16}\text{O}$ ,  $^{12}\text{C}$  -  $^{18}\text{O}$ ,  $^{14}\text{C}$  -  $^{16}\text{O}$ ,  $^{14}\text{C}$  -  $^{18}\text{O}$ ,  $^{14}\text{N}$  -  $^{16}\text{O}$ ,  $^{14}\text{N}$  -  $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$  -  $^{16}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$  -  $^{18}\text{O}$ .

Η προσομοίωση για κάθε σύστημα, με τις παραπάνω παραμέτρους, χρειαζόταν 2 ώρες περίπου. Μέσω του προγράμματος *VMD* αναλύουμε τα αποτελέσματα, καταγράφοντας ιδιότητες των συστημάτων σε *frames* για το επόμενο στάδιο. Προκύπτουν 133336 *frames*,



όπου καταγραφονται οι συντεταγμένες και οι ταχύτητες των ατόμων Fe, O, N, C στα συστήματα His-Fe-(N, C)-O, όπου είναι εφικτό

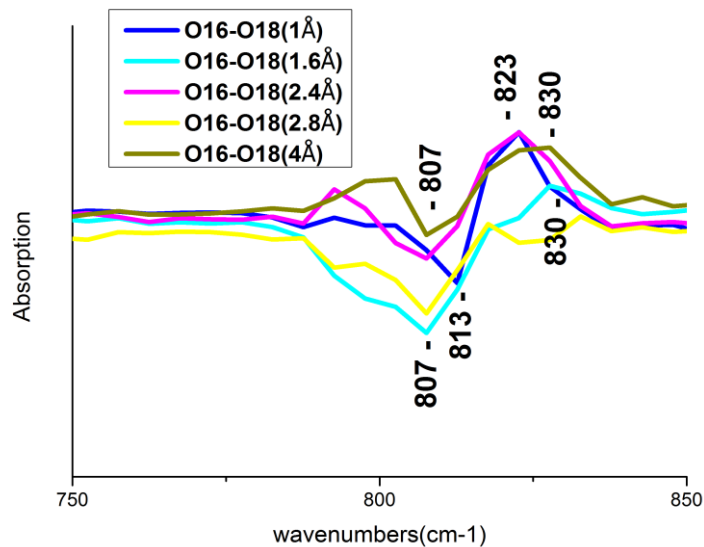
Μετά το τέλος του σταδίου αυτού χρησιμοποιείται το λογισμικό Matlab (Παράρτημα) και ένας κώδικας που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο για να προκύψουν τα δονητικά φάσματα απορρόφησης και να επεξεργαστούν περαιτέρω. Ο κώδικας MATLAB βασίζεται στο μετασχηματισμό Fourier της χρονοσειράς της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης των ταχυτήτων των ατόμων του συστήματος σε κάθε frame. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Origin γίνεται η τελική επεξεργασία των δονητικών φασμάτων-αποτελεσμάτων από τις προσομοιώσεις.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

*Every sentence I utter must be understood not as an affirmation but as a question.*  
*Niels Bohr*

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εστιάζονται αρχικά στις φασματοσκοπικές αλλαγές που προκύπτουν στην αίμη με τη δέσμευση σε αυτή αέριων ρύπων όπως NO και CO ή στο ενδιάμεσο Ferryl  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$  κατά την αναγωγή του  $\text{O}_2$  σε  $\text{H}_2\text{O}$  κατά την αναπνοή σε συνάρτηση με τις ιδιότητες της εγγύς ιστιδίνης που συναρμόζεται στο σίδηρο της αίμης και αλληλεπιδρά με ένα δεύτερο κατάλοιπο στην εγγυς περιοχή (στην περίπτωση μας τη γλυκίνη). Αλλάζοντας την απόσταση μεταξύ γλυκίνης και ιστιδίνης της αίμης, μέσω των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων θα διευκρινιστεί κατά πόσο η αλλαγή στην απόσταση μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της αίμης και πως κάτι τέτοιο μπορεί να επεκταθεί σε αλλαγές διαμόρφωσης σε μεταφορά σήματος ή μηχανισμούς δράσεις, όπου εμπλέκεται η αίμη.

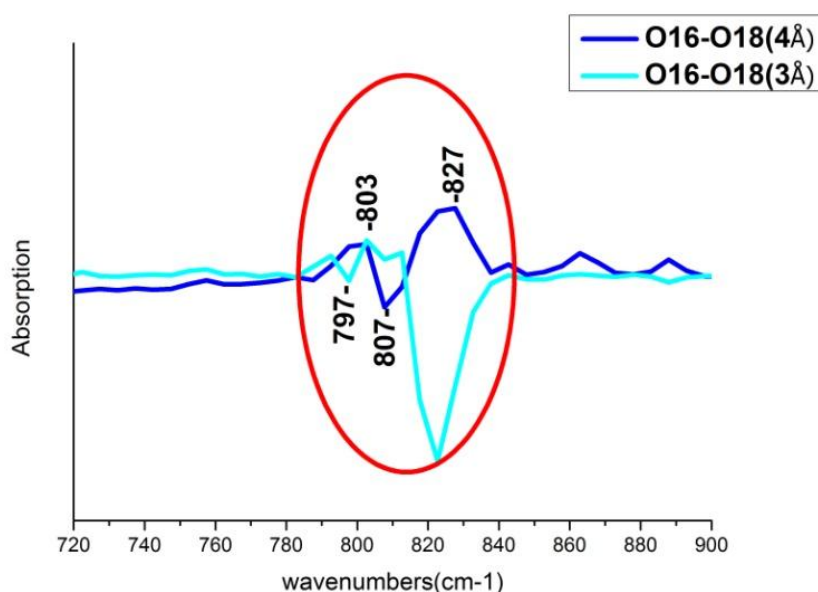
### 4.1 Η αίμη στην κατάσταση Ferryl με δεσμευμένο $\text{O}^2$ – Το ενδιάμεσο της αναγωγής του $\text{O}_2$ σε $\text{H}_2\text{O}$



Εικόνα 14: Φάσμα απορρόφησης του Ferryl σε διαφορετικές αποστάσεις μεταξύ γλυκίνης – ιστιδίνης

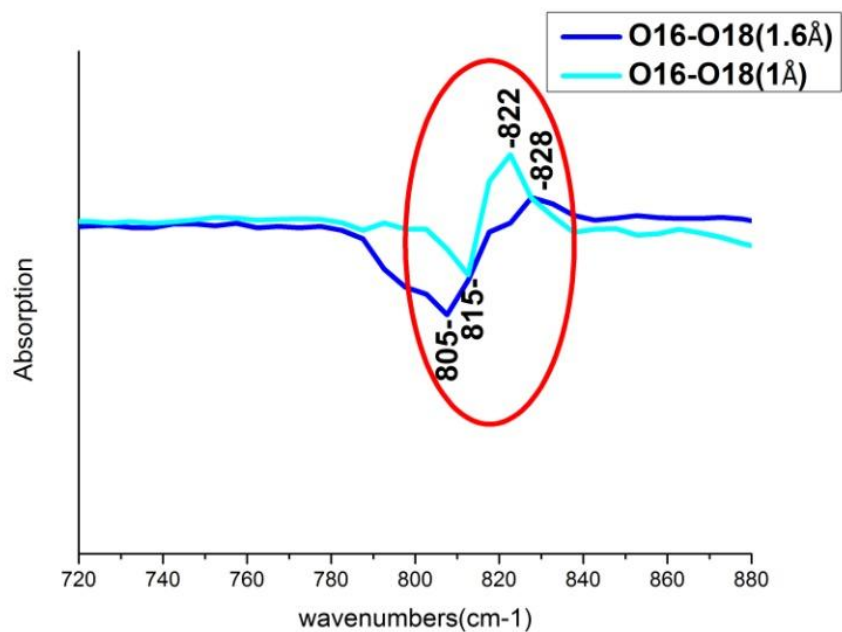
Αυτό που παρατηρείται είναι ότι υπάρχει μια «μεταφορά» αλληλεπίδρασης μεταξύ της ιστιδίνης/ γλυκίνης στο Fe=O δεσμό της αίμης. Προκαλώντας έτσι την εμφάνιση των κορυφών Fe=O σε διαφορετική συχνότητα σε κάθε αλλαγή της απόστασης μεταξύ της γλυκίνης και ιστιδίνης, από 1– 4Å (Εικόνα 14). Η αρχική τιμή της απόστασης πριν τις αλλαγές είναι 2.4 Å και σημείο εμφάνισης της κορυφής Fe=O είναι στα 820-830 cm<sup>-1</sup> για το <sup>16</sup>O. Ενώ οι κορυφές μετατοπίζονται σε χαμηλότερες ενέργειες για το <sup>18</sup>O ισότοπο στα 780-802 cm<sup>-1</sup> και αυτό εξηγείται λόγω του ‘ισοτοπικού φαινομένου’. Κατα το ισοτοπικό φαινόμενο παρατηρείται μια μετατόπιση περίπου 30 cm<sup>-1</sup> στην συχνότητα δόνησης Fe=O. Αυτό είναι σύμφωνα με τον τύπο του αρμονικού ταλαντωτή όπου όσο μεγαλύτερη είναι η μάζα m τόσο μικρότερη είναι και η συχνότητα δόνησης. <sup>[10]</sup>

$$r = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$$



**Εικόνα 15: Φάσμα απορρόφησης για αποστάσεις γλυκίνης – ιστιδίνης 3 Å και 4 Å**

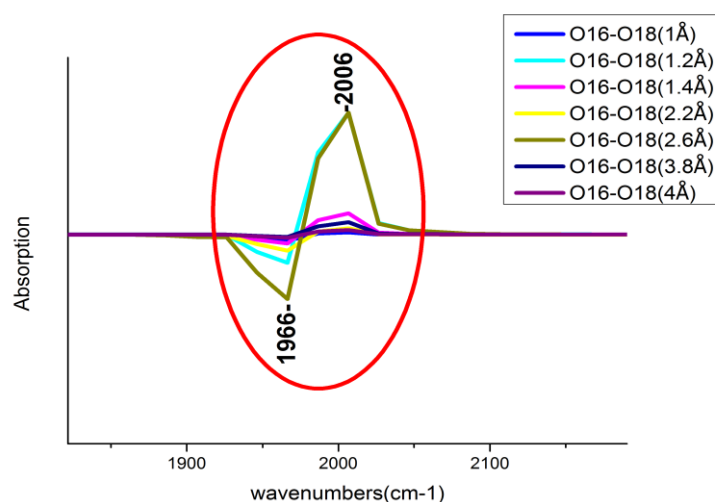
Η Εικόνα 15 δείχνει πιο εμφανή τα αποτελέσματα στις αποστάσεις 3 Å και στα 4 Å όπου παρατηρείται μια μετατόπιση των 20 cm<sup>-1</sup> μεταξύ τόσο της εμφάνισης των κορυφών των ισotόπων του οξυγόνου <sup>18</sup>O στα 797 cm<sup>-1</sup> για απόσταση 3 Å και στα 807 cm<sup>-1</sup> για απόσταση 4 Å. Όσο και για τις κορυφές του <sup>16</sup>O στα 827 cm<sup>-1</sup> για απόσταση 3 Å και στα 803 cm<sup>-1</sup> για απόσταση γλυκίνης/ιστιδίνης στα 4 Å.



Εικόνα 16: Φάσμα απορρόφησης για αποστάσεις γλυκίνης – ιστιδίνης 1 Å και 1.6 Å

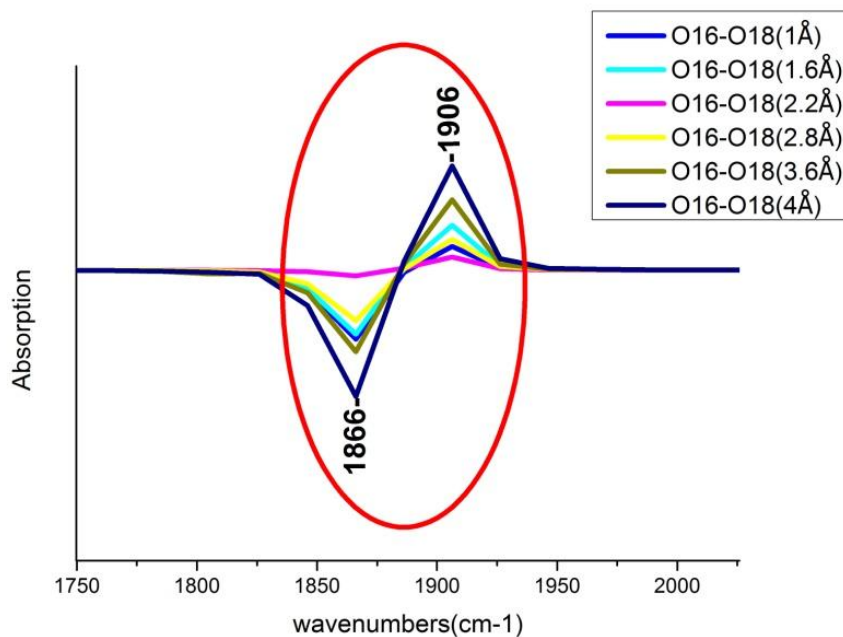
Αυτό που παρατηρείται στην Εικόνα 16 είναι ότι σε πολύ κοντινές αποστάσεις μεταξύ γλυκίνης και ιστιδίνης υπάρχει μια μετατόπιση στην εμφάνιση της κορυφής στις δύο αποστάσεις 1 Å και 1.6 Å μεταξύ ιστιδίνης/ γλυκίνης σε  $10 \text{ cm}^{-1}$  περίπου.

#### 4.2 Αποτελέσματα αίμης για δεσμευμένο CO



Εικόνα 17: Φάσμα απορρόφησης για  $^{12}\text{C} - \text{O}$  σε διαφορετικές αποστάσεις (1Å, 1.2Å, 1.4Å, 2.2Å, 2.6Å, 3.8Å, 4Å) γλυκίνης – ιστιδίνης

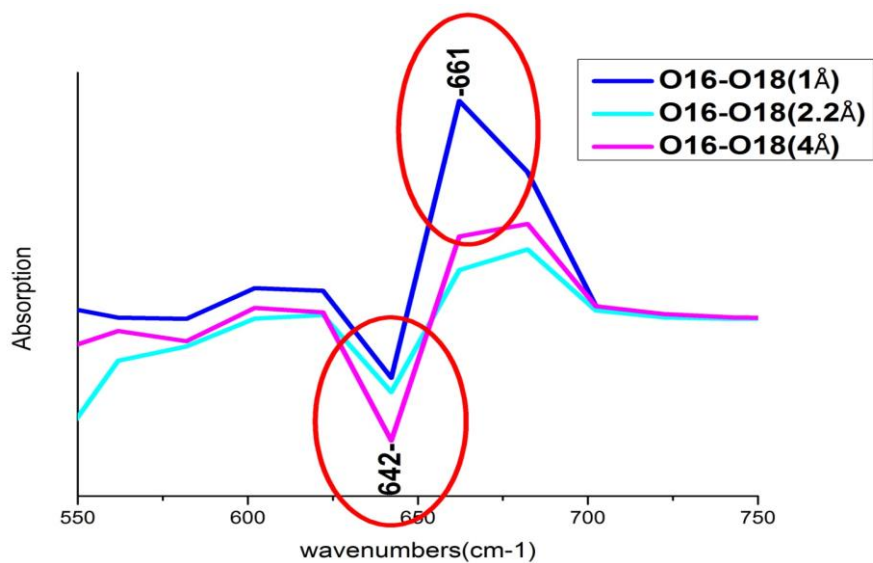
Στην Εικόνα 17 παρατηρείται ότι η αλλαγή απόστασης μεταξύ γλυκίνης και ιστιδίνης δεν επηρεάζει τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του συστήματος Fe-CO της αίμης. Το  $C^{12}O^{16}$  εμφανίζει κορυφή στα  $2006\text{ cm}^{-1}$  ενώ το ισότοπο  $C^{12}O^{18}$  λόγω του ισοτοπικού φαινομένου παρουσιάζει κορυφή στα  $1966\text{ cm}^{-1}$  για όλες τις αλλαγές στην απόσταση της γλυκίνης / ιστιδίνης.



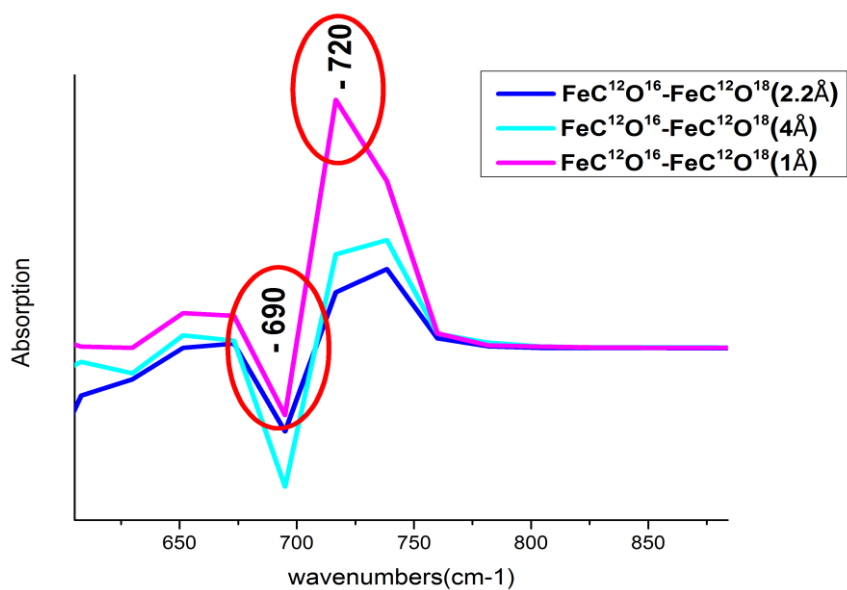
**Εικόνα 18: Φάσμα απορρόφησης για  $^{14}C - O$  σε διαφορετικές αποστάσεις (1Å, 1.6Å, 2.2Å, 2.8Å, 3.6Å, 4Å) γλυκίνης – ιστιδίνης**

Στην Εικόνα 18 διαπιστώνεται όπως και στην προηγούμενη εικόνα ότι η αλλαγή απόστασης μεταξύ γλυκίνης και ιστιδίνης δεν επηρεάζει τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του συστήματος Fe-CO της αίμης. Το  $^{14}C^{16}O$  εμφανίζει κορυφή στα  $1906\text{ cm}^{-1}$  ενώ το ισότοπο  $^{14}C^{18}O$  λόγω του ισοτοπικού φαινομένου παρουσιάζει κορυφή στα  $1866\text{ cm}^{-1}$  για όλες τις αλλαγές στην απόσταση της γλυκίνης – ιστιδίνης.

Αυτό που διαπιστώνεται και στις Εικόνες 17-18 είναι ότι δεν επηρεάζεται έντονα από την αλλαγή στις αποστάσεις γλυκίνης /ιστιδίνης. Μεταδίδονται ανεπαίσθητες επιδράσεις μέσω της πρωτεΐνης στο Fe-CO της αίμης. Σύγκρινοντας τα αποτελέσματα του Fe-CO με πειραματικά στοιχεία τα αποτελέσματα συμπίπτουν, καθώς και σε πειραματικό επίπεδο δεν παρουσιάζονται σημαντικές αλλαγές τις δονήσεις. <sup>[13]</sup>



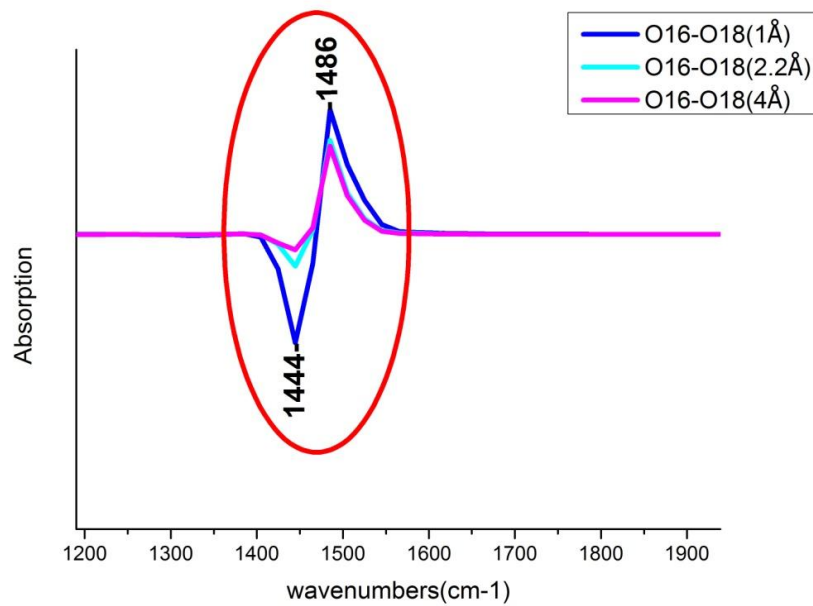
Εικόνα 19:Φάσμα απορρόφησης για Fe-<sup>14</sup>C



Εικόνα 20:Φάσμα απορρόφησης για Fe-<sup>12</sup>C

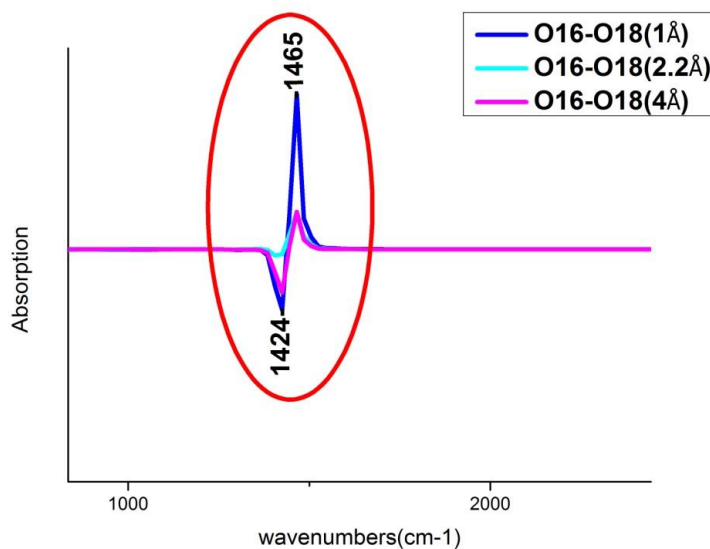
Υπάρχουν όμως και οι δονήσεις ν(Fe-C) στις οποίες παρατηρείται ότι δεν υπάρχει διαφορά στην περιοχή εμφάνισης των κορυφών, όπως φαίνεται στις Εικόνα 19-20. Η μία κορυφή προσπίπτει πάνω στην άλλη γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν επηρεάζονται οι δονήσεις ν(Fe-C) από την αλλαγή στην απόσταση γλυκίνης/ ιστιδίνης.

### 4.3 Αποτελέσματα αίμης για δεσμευμένο NO



Εικόνα 21: Φάσμα απορρόφησης για  $^{14}\text{N}-\text{O}$  σε διαφορετικές αποστάσεις (1Å, 2.2Å, 4Å) γλυκίνης – ιστιδίνης

Στην Εικόνα 21 διαπιστώνεται ότι η αλλαγή απόστασης μεταξύ γλυκίνης και ιστιδίνης δεν επηρεάζει τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του συστήματος Fe-NO της αίμης. Το  $^{14}\text{N}-^{16}\text{O}$  εμφανίζει κορυφή στα  $1486\text{ cm}^{-1}$  ενώ το ισότοπο  $^{14}\text{N}-^{18}\text{O}$  λόγω του ισοτοπικού φαινομένου παρουσιάζει κορυφή στα  $1444\text{ cm}^{-1}$  για όλες τις αλλαγές στην απόσταση της γλυκίνης – ιστιδίνης.

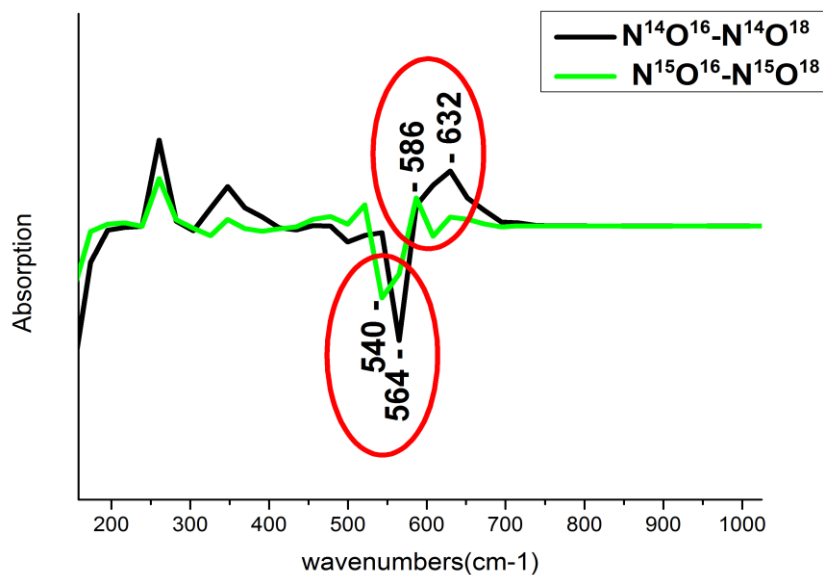


Εικόνα 22: Φάσμα απορρόφησης για  $^{15}\text{N}-\text{O}$  σε διαφορετικές αποστάσεις (1Å, 2.2Å, 4Å) γλυκίνης – ιστιδίνης

Στην Εικόνα 22 διαπιστώνεται όπως και στην προηγούμενη εικόνα ότι η αλλαγή απόστασης μεταξύ γλυκίνης και ιστιδίνης δεν επηρεάζει τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του συστήματος Fe-NO της αίμης. Το  $^{15}\text{N}-^{16}\text{O}$  εμφανίζει κορυφή στα  $1486\text{ cm}^{-1}$  ενώ το ισότοπο  $^{15}\text{N}-^{18}\text{O}$  λόγω του ισοτοπικού φαινομένου παρουσιάζει κορυφή στα  $1444\text{ cm}^{-1}$  για όλες τις αλλαγές στην απόσταση της γλυκίνης – ιστιδίνης.

Αυτό που διαπιστώνεται και στις Εικόνες 19-20 είναι ότι δεν επηρεάζεται έντονα η συχνότητα δόνησης από την αλλαγή στις αποστάσεις γλυκίνης /ιστιδίνης. Μεταδίδονται ανεπαίσθητες επιδράσεις μέσω της πρωτεΐνης στο Fe-NO της αίμης.

Καταληκτικά παρατηρείται ότι στα αποτελέσματα των προσομοιώσεων του NO και του CO η συχνότητα δόνησης δεν επηρεάζεται από τις αλλαγές στις αποστάσεις γλυκίνης/ιστιδίνης. Αυτό αποδύκνυει ότι είτε δεν επηρεάζονται οι λειτουργίες της αίμης αλλά είτε η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε να μην ήταν η απαιτούμενη για τα συγκεκριμένα ζεύγη ατόμων.

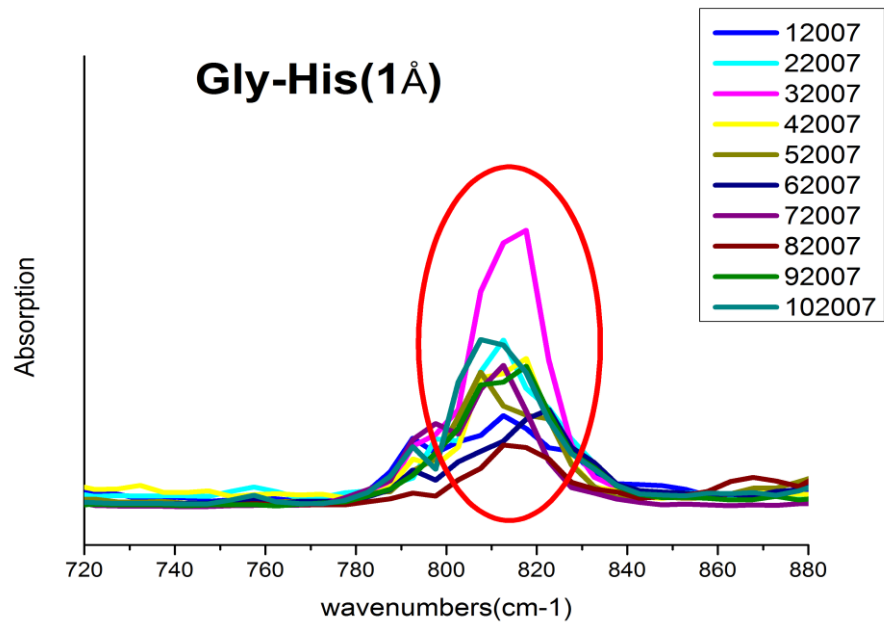


**Εικόνα 23: Φάσμα απορρόφησης για Fe-N**

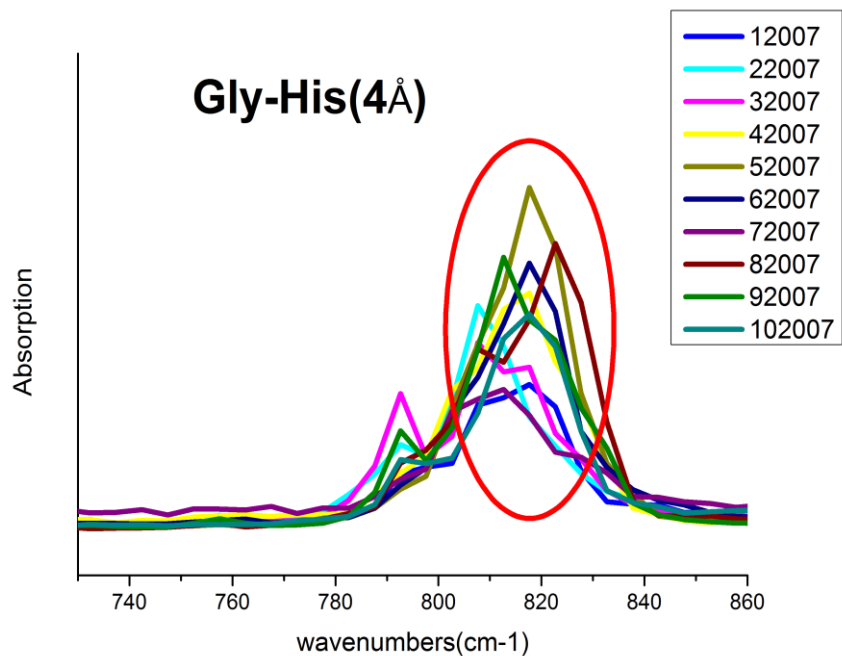
Υπάρχουν όμως και οι δονήσεις  $\nu(\text{Fe-N})$  στις οποίες παρατηρείται ότι δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στην περιοχή εμφάνισης των κορυφών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 23.



#### 4.4 Στατιστικό βάρος του παραγόμενου φάσματος - αλλαγή στην κατανομή αρχικών ταχυτήτων



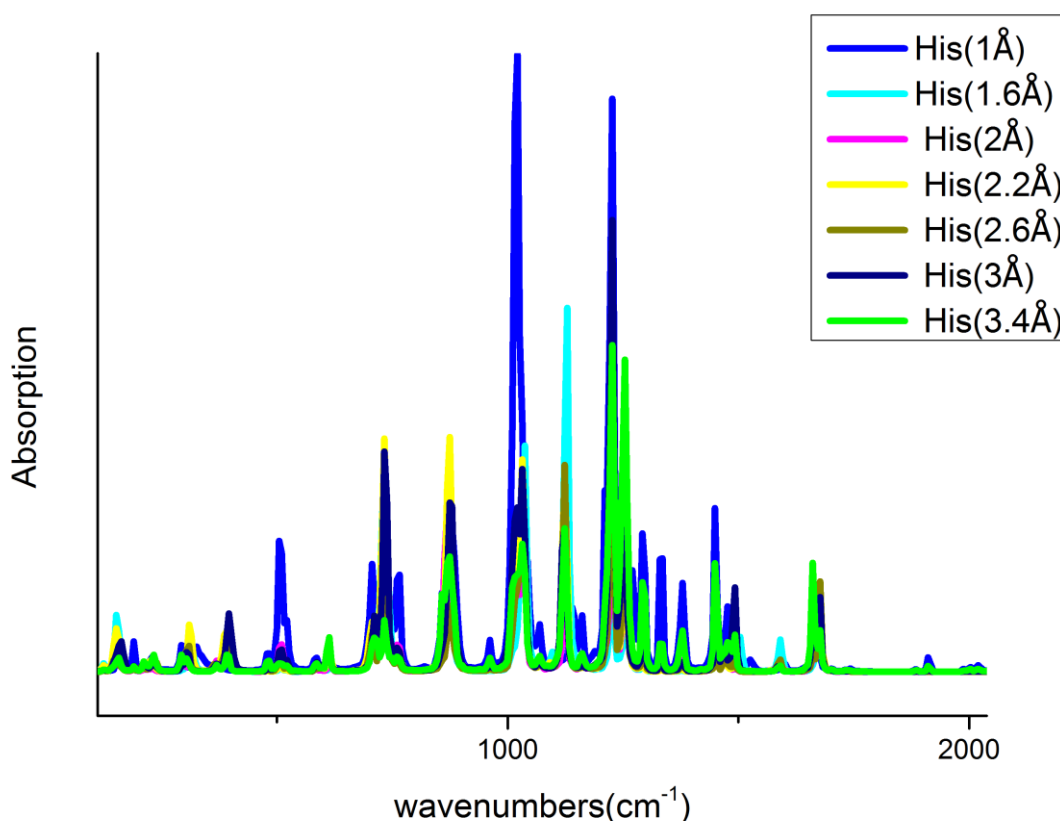
Εικόνα 24: Στατιστική Μελέτη για απόσταση γλυκίνης/ιστιδίνης 1 Å



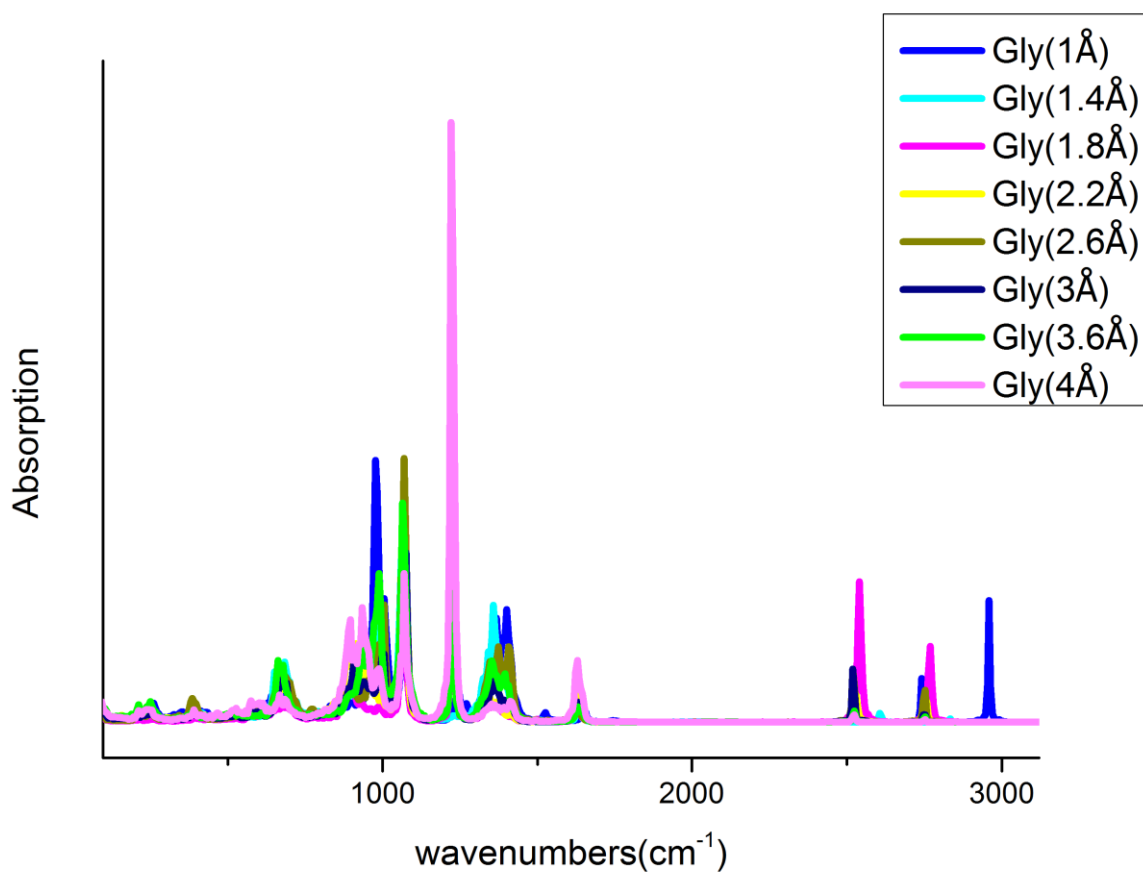
Εικόνα 25: Στατιστική Μελέτη για απόσταση γλυκίνης/ιστιδίνης 4 Å

Εκτός από τις προσομοιώσεις για τις αλλαγές στην απόσταση γλυκίνης/ ιστιδίνης, έγινε και μια στατιστική μελέτη με αλλαγές στις κατανομές των αρχικών ταχυτήτων (διαφορετικά seeds τυχαίων αριθμών, για τυχαία κατανομή ταχυτήτων των ατόμων) με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο επηρεάζεται με την αλλαγή των ταχυτήτων το φάσμα απορρόφησης. Αυτό που προκύπτει από τα αποτελέσματα σύμφωνα με τις Εικόνες 24 και 25 είναι ότι όλες οι κατανομές των ταχυτήτων συγκλίνουν στις ίδιες κορυφές του φάσματος. Αυτό υποδηλώνει ότι σε όποια κατανομή ταχυτήτων τρέξει η προσομοίωση δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα της κορυφής του φάσματος που θα προκύψει, και ενισχύει τη σύγκλιση των δονητικών φασμάτων σε συγκεκριμένες κορυφές. Αυτό δηλώνει πως ο συνολικός χρόνος προσομοίωσης των 400 ps ήταν αρκετός για τη φασματοσκοπική μελέτη.

#### 4.5 Φάσματα απορρόφησης για Gly, His(για διάφορες αποστάσεις)για την αίμη στην κατάσταση Ferryl με δεσμευμένο O<sup>2</sup>



Εικόνα 26: Φάσμα απορρόφησης για την Ιστιδίνη( διαφορετικές αποστάσεις γλυκίνης – ιστιδίνης )



Εικόνα 27: Φάσμα απορρόφησης για την Γλυκίνη ( διαφορετικές αποστάσεις γλυκίνης – ιστιδίνης )

Αυτό που διαπιστώνεται είναι ότι η αλλαγή στην απόσταση της γλυκίονης/ιστιδίνης, δεν επηρεάζει το φάσμα απορρόφησης για τα άτομα τόσο της γλυκίνης, αλλά και της ιστιδίνης. Καθώς όλες οι κορυφές συμπίπτουν η μία πάνω στην άλλη όπως διακρίνεται και στις Εικόνες 26-27.

## ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η δυναμική εντός της κοιλότητας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των πρωτεϊνών και των ενζύμων. Τα μόρια-υποστρώματα /υποκαταστάτες κατευθύνονται στο ενεργό κέντρο ή τις εσωτερικές κοιλότητες μιας πρωτεΐνης. Η εξειδίκευση ή η δραστικότητα μιας ενζυματικής καταλυτικής αντίδρασης στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πλέγματος της πρωτεΐνης και του υποστρώματος. Η θεωρία του Συναρτησιακού της Ηλεκτρονιακής Πυκνότητας (DFT) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση αυτών των αλληλεπιδράσεων, ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η κρυσταλλική δομή δεν έχει λυθεί. Με βάση τις θεωρητικές μελέτες και προσομιώσεις που παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι για τα μικρά μόρια, όπως NO και CO, οι απώτερες αλληλεπιδράσεις πιθανόν να καθίσταται σημαντικές για δέσμευση - αναγνώριση από τις πρωτεΐνες, ενώ οι εγγύς (μέσω του αξονικού υποκαταστάτη της αίμης – της ιστιδίνης) ασκούν χαμηλότερη συμμετοχή. Παρ'όλα αυτά, οφείλουμε να παρατηρήσουμε ότι στην περίπτωση του O<sub>2</sub> τα αποτελέσματα της εγγύς αλληλεπίδρασης, είναι πολύ πιο έντονα. Επιπλέον, οι εσωτερικές αλληλεπιδράσεις εντός της κοιλότητας της πρωτεΐνης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πολωσιμότητα των αερίων όπως τα, NO και CO. Η τεχνική της μοριακής δυναμικής μέσω των προσομιώσεων μπορεί να οδηγήσει ορισμένες φορές σε αποτελέσματα με χαμηλότερες θεωρητικές αλληλεπιδράσεις, καθώς δεν λαμβάνει υπόψη την πολωσιμότητα των αερίων αυτών, κυρίως του CO.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aono,S & Kato,T & Nakagawa,E & Nakajima,H & Sakaguchi, T &Shinohara, H & Kumazaki,S & Yoshihara,K (2001), Structure and function of the heme-based sensor proteins, *Focused on New Trends in Bio-Trace Elements Research* (98-101)
2. Bellamy,T.C & Wood,J & Garthwaite,J (2001), On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide, *Wolfson Institute for Biomedical Research*(1-4)
3. Ballou,D.P & Zhao,Y & Brandish,P.E & Marletta,M.A (2002), Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: The simple NO-binding model is incorrect, *Harvard Medical School*,(1-5)
4. Meller, Jarosaw (2001), Molecular Dynamics, *Encyclopedia of life sciences*,(1-8)
5. Jorgensen,William.L & Tirado-Rives,J (1996), Monte Carlo vs Molecular Dynamics for Conformational Sampling, *J. Phys. Chem.* 100, (14508-14513)
6. Puranik,M & Brøndsted,S & Youn,H & Hvitved,A.N & Bourassa,J.L & Case,M.A & Tengroth,C & Balakrishnan,G & Thorsteinsson,M.V & Groves,J.T & McLendon,G.L & Roberts,G.P & Olson,J.S & Spiro,T.G (2004),Dynamics of Carbon Monoxide Binding to CooA, *JBC Papers in Press*,(21096–21108)
7. Youn,R.H & Kerby,R.L & Conrad,M & P,G (2004), Functionally Critical Elements of CooA-Related CO Sensors,*JOURNAL OF BACTERIOLOGY*(1320–1329)
8. Oda, A & Yamaotsu,N & Hirono,S(2004),New AMBER Force Field Parameters of Heme Iron for Cytochrome P450s Determined by Quantum Chemical Calculations of Simplified Models,*Wiley InterScience*(818-826)
9. Autenrieth,F& Tajkhorshid,E & Baudry,J & Luthey-Schulten,Z (2004),Classical Force Field Parameters for the Heme Prosthetic Group of Cytochrome c,*Wiley InterScience*(1613-1622)
10. Daskalakis,V & Farantos,S.C & Varotsis,K(2005),Protein dynamics and spectroscopy for intermediate of Cytochrome c Oxidase: A molecular dynamics approach
11. Shiro, Y & Nakamura,H(2002),Heme-based oxygen sensor protein FixL:its structure and function, *International Congress Series 1233*(251-257)
12. Daskalakis,V & Varotsis,K(2009), Binding and Docking Interactions of NO, CO and O<sub>2</sub> in Heme Proteins as Probed by Density Functional Theory, *International Journal of Molecular Sciences*(1-20)

13. Franzen, Stefan (2002), Carbonmonoxy Rebinding Kinetics in H93G Myoglobin: Separation of Proximal and Distal Side Effects, *J. Phys. Chem. B*, (1-10)

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

## 1.1 Αρχείο .cfg

```
annealing = false
backend = {
}
checkpoint = {
    first = 0.0
    interval = 100
    name = "$JOBNAME.cpt"
    write_last_step = true
}
coulomb_method = ["pme" 1e-09 ]
cpu = [1 1 1 ]
cutoff_radius = 12.0
elapsed_time = 0.0
energy_group = false
eneseq = {
    first = 0.0
    interval = 10.0
    name = "$JOBNAME$_replica$REPLICA$.ene"
}
ensemble = {
    barostat = {
        tau = 2.0
    }
    class = "NVT"
    method = "NH"
    thermostat = {
        tau = 1.0
    }
}
fep = {
    i_window = ?
    lambda = "default:12"
    output = {
        first = 0.0
        interval = 1.2
        name = "$JOBNAME$_replica$REPLICA$.dE"
    }
}
glue = "solute"
maeff_output = {
    first = 0.0
    interval = 120.0
    name = "$JOBNAME$_replica$REPLICA$-out.cms"
    trjidx = "$JOBNAME$_replica$REPLICA$-out.idx"
}
meta = false
pressure = 1.01325
```

```

randomize_velocity = {
  first = 0.0
  interval = inf
  seed = 2007
  temperature = "@*.temperature"
}
simbox = {
  first = 0.0
  interval = 1.2
  name = "$JOBNAME$_replica$REPLICA$_simbox.dat"
}
surface_tension = 4000.0
taper = {
  method = "clswitch"
  width = 3.0
}
temperature = [
  [300.0 0 ]
]
time = 400.0
timestep = [0.0005 0.0005 0.0015 ]
trajectory = {
  first = 0.0
  frames_per_file = 125
  interval = 0.003
  name = "$JOBNAME$_replica$REPLICA$_trj"
  periodicfix = true
  write_velocity = true
}

```



## 1.1 Κώδικας Matlab

```
% Calculation of the Power Spectrum out of
% the Velocity Autocorrelation Function (VAF)
% by Daskalakis Vangelis

clear all
clc

% DEFINE PARAMETERS FOR THE SPECTRA AND
% VISUALIZATION
%-----
%-----
db=1; % Dump data before frame (usually first frame)
da=133336; % Dump data after frame (end of frames)
fstep=1; % framestep: Read frame 1 then frame 1+fstep, 1+2*fstep
etc...
tstep=fstep*0.003; % The trajectory sampling step in picoseconds (ps)
Num=56; % The number of atoms (spheres in MD)
parts=64; % Split the dataset into parts (power of two
4,8,16,32,64,128...)
pad=1; % Padding parameter
filename='vel_4000c'; % The file containing the velocities
% in Num x (vx vy vz) triplets
fileextension='dat'; % What is the file extension?

% Visualization Parameters (FOR DISPLAY ONLY - DOES NOT
AFFECT SPECTRUM)
wavenrange=[0 3000]; % The range of wavenumbers
intensityrange1=[0 inf]; % The Intensity range for meanVAF -> FFT
intensityrange2=[0 inf]; % The Intensity range for VAFs -> FFTs ->
meanFFT
zoomint=1.2*10^(-6); % Zooming of the z-padded intensity

% Which spectrum do you want to export?
% Type 1 for VAFs -> mean VAF -> FFT
% Type 2 for VAFs -> FFTs -> mean FFT
% Type 3 for VAFs -> mean VAF -> smoothed FFT
% Type 4 for VAFs -> FFTs -> smoothed mean FFT
exportspectrum=4; % Default is 4
%-----
%-----
```

```

% Load the velocities and calculate additional parameters for the FFT
%-----
vel=load([filename, '.',fileextension],'-ascii'); % name of the file
vel1={vel(db:fstep:da,:)}; % Take into account only part of the whole
data
L=length(vel1{1}); % Number of lines, unparted discreet data
NFFT=2^nextpow2(L); % Number of data in the next power of 2
vel1{1}=vel1{1}(1:2^(nextpow2(L)-1),:); % Number of data in the power
of 2
L=length(vel1{1}); % Number of lines, unparted discreet data
L1=L/parts; % New length of each part
NFFT2=2^nextpow2(L1); % New NFFT for each part

% Frequencies to Wavenumbers
%-----
Freq=1/tstep; % The frequency of sampling
fvel = (Freq/NFFT2)*(0:NFFT2/2); % The Frequency in Hz
vv=fvel*2*pi*0.01517871*349.7554; % The wavenumbers involved

%Calculate and normalize the Velocity Autocorrelation Functions
(VAFs)
%-----
vafN{1}=zeros(L,1);

for j=1:L
    for i=1:Num
        vafN{1}(j)=dot(vel1{1}(1,3*i-2:3*i),vel1{1}(j,3*i-2:3*i))+vafN{1}(j);
    end
end

vaf{1}=vafN{1}/vafN{1}(1); % Divide the VAF(t) by VAF(t=0)

% The split of the dataset (VAF) into smaller parts
%-----

for p=1:parts
    for j=1:L1
        vafp{p}(j)=vaf{1}(j+(p-1)*L1);
    end
end

% Calculate and subtract the mean value in parts for the VAFs
%-----
for p=1:parts

```

```

    mv(p)=mean(vafp{p});
end
for p=1:parts
    for j=1:L1
        mvaf{p}(j)=vafp{p}(j)-mv(p);
    end
end

% Mean value of VAFs with mean subtraction
%-----
mmvaf=zeros(L1,1);

for j=1:L1
    for p=1:parts
        mmvaf(j)=mmvaf(j)+vafp{p}(j);
    end
end

mmvaf=mmvaf/parts;
mmvaf=mmvaf-mean(mmvaf);

% The actual FFT process for the mean VAF, plot of the spectrum
%-----
Ymmvaf=fft(mmvaf,NFFT2);
PYmmvaf=Ymmvaf.*conj(Ymmvaf)/L1;
h1=subplot(2,2,1);
plot(vv,PYmmvaf(1:NFFT2/2+1),'b-')
axis([h1],[wavenrange intensityrange1]);
title('FFT on mean VAF')

% The actual FFT process for the each VAF, plot of the spectrum
%-----
for p=1:parts
    Yvaf{p}=fft(mvaf{p},NFFT2);
end
for p=1:parts
    PYvaf{p}=Yvaf{p}.*conj(Yvaf{p})/L1;
end

mPYvaf=zeros(1,L1); % Mean value of FFTs

for j=1:L1
    for p=1:parts
        mPYvaf(j)=mPYvaf(j)+PYvaf{p}(j);
    end
end

```

```

    end
end

mPYvaf=mPYvaf/parts;

h2=subplot(2,2,2);
plot(vv,mPYvaf(1:NFFT2/2+1),'b-')
axis([h2],[wavenrange intensityrange2]);
title('mean FFT on VAFs')

%Smoothing of the final Result by Zero Padding and Gaussian
multiplication
%-----
sigma=L/2.5; % Gaussian sigma for smoothing
j=[1:L1];
g=(1/(sigma*sqrt(2*pi)))*exp(-(j.^2)/(2*(sigma^2))); % Gaussian
Function

for p=1:parts
    gvaf{p}=mvaf{p}.*g;
end

gmmvaf=mmvaf.*transpose(g);

for p=1:parts % Calculate and substract the mean value
    mgvaf(p)=mean(gvaf{p});
end
for p=1:parts
    for j=1:L1
        gvaf{p}(j)=gvaf{p}(j)-mgvaf(p);
    end
end

for p=1:parts
    zvaf{p}=zeros(pad*L1,1);
end

zmmvaf=zeros(pad*L1,1);

for p=1:parts
    zvaf{p}(1:L1)=gvaf{p}(1:L1);
end

zmmvaf(1:L1)=gmmvaf(1:L1);

```

```

LZ=length(zvaf{p}); % New FFT parameters
ZNFFT=2^nextpow2(LZ);
zfvel = (Freq/ZNFFT)*(0:ZNFFT/2);
vz=zfvel*2*pi*0.01517871*349.7554;

for p=1:parts % The FFT process on VAFs
    Yvaf2{p}=fft(zvaf{p},ZNFFT);
end
for p=1:parts
    PYvaf2{p}=Yvaf2{p}.*conj(Yvaf2{p})/LZ;
end

Yzmmvaf=fft(zmmvaf,ZNFFT);
PYzmmvaf=Yzmmvaf.*conj(Yzmmvaf)/L1;
h3=subplot(2,2,3);
plot(vz,PYzmmvaf(1:ZNFFT/2+1),'b-')
axis([h3],[wavenrange zoomint*intensityrange1]);
title('0-pad Gaussian mVAF FFT')

mPYvaf2=zeros(1,LZ); % Mean value of FFTs

for j=1:LZ
    for p=1:parts
        mPYvaf2(j)=mPYvaf2(j)+PYvaf2{p}(j);
    end
end

mPYvaf2=mPYvaf2/parts;

h4=subplot(2,2,4);
plot(vz,mPYvaf2(1:ZNFFT/2+1),'b-')
axis([h4],[wavenrange zoomint*intensityrange2]);
title('0-pad Gaussian VAF mFFT')

% Wrire the " VAFs->FFTs->z-padded meanFFT" output spectrum to a
file
%-----
if (exportspectrum==1)
    myFFT=PYmmvaf(1:NFFT2/2+1);
    myFreq=vv;
elseif (exportspectrum==2)
    myFFT=mPYvaf(1:NFFT2/2+1);
    myFreq=vv;
elseif (exportspectrum==3)

```

```
    myFFT=PYzmmvaf(1:ZNFFT/2+1);
    myFreq=vz;
else
    myFFT=mPYvaf2(1:ZNFFT/2+1);
    myFreq=vz;
end

PSpectrum=transpose([myFreq;myFFT]);
exportfile=[filename,'_PSpectrum.',fileextension];
save(exportfile, 'PSpectrum','-ascii','-tabs');
```