



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόβλεψη του Τρόπου Πρόσδεσης
(Docking) των Επικρατειών A1 και A2 του
von Willebrand Factor με τη Βοήθεια του
Προγράμματος HEX και Προσομοιώσεων
Μοριακής Δυναμικής

Διπλωματική Εργασία της Αναστασίας Χαϊδεμένου

Επιβλέπων: Γεώργιος Παπαδόπουλος, Λέκτορας

Λάρισα, Ιούνιος 2011

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων: Γεώργιος Παπαδόπουλος, Λέκτορας

Συνεπιβλέποντες: Δημήτριος Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μαρία Κοντού, Λέκτορας

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου σ' αυτή την προσπάθεια και με βοήθησαν να την φέρω σε πέρας.

Μεγάλος συμπαραστάτης υπήρξε ο επιβλέπων καθηγητής μου, Λέκτορας, κ. Γεώργιος Παπαδόπουλος, μέσα από την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την ηθική του παρότρυνση. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα και για τη στήριξη που μου πρόσφερε σε ορισμένες δύσκολες στιγμές στη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Λέκτορα κα Μαρία Κοντού και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτρη Λεωνίδα .

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από καρδιάς τους συμφοιτητές μου Σταύρο Παπατζέλο, Βαγγέλη Τσιγαρίδα και ιδιαιτέρως την Βίκυ Στάθη, οι οποίοι μου προσέφεραν πρόθυμα τη βοήθειά τους, λειτουργώντας πάντοτε σαν ομάδα εργασίας και όχι σαν μονάδα.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο, θερμό ευχαριστώ στον πατέρα μου Στάθη και την αδερφή μου Γιώτα για την αμέριστη αγάπη και βοήθεια τους σε οικονομικό και ηθικό επίπεδο, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Σκοπός.....	1
1.2 Περίληψη.....	2
2. Θεωρητικό μέρος	3
2.1 Βιοσύνθεση του vWf.....	3
2.2 Λειτουργικές περιοχές του ώριμου vWF.....	4
2.2.1 Λειτουργία του παράγοντα von Willebrand	6
2.2.2 Επικράτεια A1	7
2.2.3 Επικράτεια A2.....	8
2.2.4 Η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13	9
2.2.5 Βοτροσετίνη.....	10
2.3 Ασθένεια του von Willebrand (VWD)	12
3. Εργαλεία και Μέθοδοι	15
3.1 Εργαλεία.....	15
3.1.1 Το πρόγραμμα μοριακής αναγνώρισης HEX	15
3.1.2 Η Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων PDB	15
3.1.3 Το Πρόγραμμα Γραφικής Απεικόνισης RASMOL.....	15
3.1.4 Πρόγραμμα μοριακής απεικόνισης VMD	16
3.1.5 Το πρόγραμμα μοριακής δυναμικής NAMD.....	16
3.2 Μέθοδοι.....	17
3.2.1 Πρόσδεση (docking).....	17
3.2.1.1 Μέθοδοι πρόβλεψης πρόσδεσης.....	18
3.2.1.1.1 Μέθοδοι Monte Carlo.....	18
3.2.1.1.2 Γενετικοί αλγόριθμοι.....	20
3.2.1.1.3 Μέθοδοι συμπληρωματικότητας σημείου	20
3.2.2 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής.....	22
3.2.3 RMSD.....	25

4. Πρακτικό Μέρος.....	27
4.1 Πρόβλεψη πρόσδεσης στο σύμπλοκο A1-A2 με το πρόγραμμα Hex.....	27
4.2 Επιλογή επικρατέστερων διατάξεων	28
4.3 Προετοιμασία για την προσομοίωση του συμπλόκου A1-A2	31
4.3.1 Ενυδάτωση (solvate)	31
4.3.2 Προσθήκη Ιόντων (Neutralization / Add Ions).....	32
4.3.3 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (Energy Minimization)	34
4.3.4 Εξισορρόπηση (Equilibration)	35
4.3.5 Υπολογισμός του RMSD.....	36
5. Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	39
5.1 Ενέργεια αλληλεπίδρασης (Interaction energy) για τις 9 διατάξεις.....	39
5.2 Τα RMSD των εξισορροπήσεων των 4 διατάξεων	40
5.3 Ενέργεια αλληλεπίδρασης (Interaction energy) των 4 στιγμιότυπων	42
Παράρτημα	45
Το script διαχωρισμού της A1(A) από την A2 (E)	45
Script για τη δημιουργία των αρχείων A-E.psf, A-E.pdf	45
Script για την ενυδάτωση (solvate).....	46
Script για την προσθήκη ιόντων	49
Configuration script για Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (energy minimization).....	51
Configuration script της Εξισορρόπησης	51
Script για το rmsd.....	53
Βιβλιογραφία	55

Λίστα Εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα της επεξεργασίας του vWF	4
Εικόνα 2: Δομή υπομονάδων του vWF	5
Εικόνα 3: Ηλεκτροφόρηση ανθρώπινου πλάσματος σε πηκτώμα αγαρόζης 1.6%.....	5
Εικόνα 4: Μηχανισμός πρόσδεσης του vWF στα αιμοπετάλια	6
Εικόνα 5: Περιοχές δέσμευσης προσδετών στην επικράτεια A1 του vWF.....	8
Εικόνα 6: Πρότυπο της A2 επικράτειας	10
Εικόνα 7: Δομή της βοτροσεΐνης.....	12
Εικόνα 8: Τα στάδια της πρόσδεσης μεταξύ πρωτεϊνών	17
Εικόνα 9: Συμπληρωματικότητα σχήματος των πρωτεϊνών και πρόσδεση.....	18
Εικόνα 10: Απεικόνιση της συμπληρωματικότητας των σχημάτων των πρωτεϊνών μέσω του μοντέλου της «διπλής επιφάνειας»	22
Εικόνα 11: Αναπαράσταση των γωνιών που σχηματίζονται σε ένα απλουστευμένο σύστημα επτά ατόμων που συνδέονται το ένα με το άλλο	25
Εικόνα 12: Απόσπασμα αρχείου pdb.....	28
Εικόνα 13: Διάγραμμα ροής που δείχνει τον τρόπο χρήσης των διαφόρων αρχείων από τα προγράμματα VMD και NAMD	29
Εικόνα 14: Η απεικόνιση της A1 με την A2 μέσω VMD μετά την ενυδάτωση.....	32
Εικόνα 15: Χρονική εξέλιξη του RMSD για το στιγμιότυπο 0220.....	40
Εικόνα 16: Χρονική εξέλιξη του RMSD για το στιγμιότυπο 0190.....	40
Εικόνα 17: Χρονική εξέλιξη του RMSD για το στιγμιότυπο 0218.....	41
Εικόνα 18: Χρονική εξέλιξη του RMSD για το στιγμιότυπο 0219.....	41
Εικόνα 19: Η απεικόνιση της επικρατέστερης διάταξης σύνδεσης της επικρατείας A1 με την A2.....	43

Λίστα Πινάκων

Πίνακας I: Τελεστές του δεσμού κολλαγόνου-vWF-GpIba	11
Πίνακας II: Προγράμματα με τα οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί πρόβλεψη πρόσδεσης μεταξύ πρωτεϊνών	19
Πίνακας III: Οι 9 διατάξεις με την χαμηλότερη ενέργεια που προέκυψαν μετά το docking.....	39
Πίνακας IV: Οι ενέργειες των τεσσάρων διατάξεων με την χαμηλότερη ενέργεια που επιλέχθηκαν μετά την ελαχιστοποίηση ενέργειας στο κενό	42

1. Εισαγωγή

Η αιμόσταση είναι μια κεντρική διαδικασία και απαιτεί τη συνδυασμένη δράση των αιμοπεταλίων, των αγγειακών και πλασματικών παραγόντων. Διαιρείται σε δύο βήματα: (α) αρχική αιμόσταση, που συνδέεται με τους κυτταρικούς μηχανισμούς (thrombocytes), και (β) δευτεροβάθμια αιμόσταση, που πραγματοποιείται από ένα πολυσύνθετο σύστημα εξωγενών και ενδογενών παραγόντων περιλαμβάνοντας και τους παράγοντες πήξης. Στο ρέον αίμα, η προσκόλληση αιμοπεταλίων στις περιοχές του αγγειακού τραυματισμού πραγματοποιείται από τον παράγοντα von Willebrand (vWF), ο οποίος είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας σχηματισμού του θρόμβου. Ο vWF ονομάζεται έτσι, από τον Φιλανδό παθολόγο Erik A. Von Willebrand, ο οποίος εξέτασε μια οικογένεια με ιστορικό αιμορραγίας που προσέβαλε και τα δύο φύλα στα νησιά Åland κατά τη διάρκεια του 1925. Ο Von Willebrand κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι η ασθένεια ήταν μια άγνωστη μορφή αιμοφιλίας και την κάλεσε «ψευδο-αιμοφιλία». Τώρα αποκαλείται ως η ασθένεια του Von Willebrand (VWD), με διακριτικό σύμπτωμά της τον παρατεταμένο χρόνο αιμορραγίας [3]. Ο vWF απομονώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '70, και η πλήρης αμινοξική ακολουθία του δημοσιεύθηκε στις αρχές του 1986 [4]. Η έρευνα κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχει παράσχει σημαντική πρόοδο στην κατανόηση της σύνθεσης και της λειτουργίας του vWF, αλλά και της μοριακής βάσης των VWD.

1.1 Σκοπός

Σκοπός της ανά χείρας εργασίας ήταν η πρόβλεψη του τρόπου πρόσδεσης (docking) των επικρατειών A1 και A2 του von Willebrand Factor (vWF) με την βοήθεια του προγράμματος HEX και προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής.

1.2 Περίληψη

Ο παράγοντας Von Willebrand είναι μια πολυμερής, υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη, η οποία είναι παρούσα στο πλάσμα και παίζει θεμελιώδη ρόλο στην επιτυχή στρατολόγηση και ενεργοποίηση αιμοπεταλίων στην περιοχή του αγγειακού τραύματος. Επιπροσθέτως, ο vWF χρησιμεύει ως φέρουσα πρωτεΐνη του παράγοντα πήξης (παράγοντας VIII), προστατεύοντας τον από τη διάσπαση. Οι ώριμες υπομονάδες του vWF αποτελούνται από τέσσερις τύπους συντηρημένων δομικών περιοχών, D'- D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-C3 CK. Η επικράτεια A1 συμμετέχει στην πρόσδεση του vWF στον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα Ib (GpIb) των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια οδηγούν στη συγκρότηση των συμπλεγμάτων των προθρομβωτικών ενζύμων, και τελικά στην παραγωγή θρομβίνης. Το αίμα που ρέει ασκεί μία δύναμη στον όλο και αυξανόμενο θρόμβο, η οποία ξεδιπλώνει τον vWF και εμφανίζεται τελικά μια θέση κοπής στην επικράτεια A2 για την μεταλλοπρωτεάση (ADAMTS-13), περιορίζοντας την ικανότητα σχηματισμού θρόμβων. Ο τρόπος πρόσδεσης των επικρατειών A1 και A2 δεν έχει προσδιοριστεί πειραματικά, κάτι που αποτέλεσε τον στόχο αυτής της εργασίας. Για την επίτευξη του στόχου αυτού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική πρόβλεψης πρόσδεσης (docking) και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Για τις ανάγκες της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές για τις A1 [1] και A2 [2]. Από τον μεγάλο αριθμό των πιθανών διατάξεων πρόσδεσης, που προέκυψαν με χρήση προγράμματος πρόβλεψης, αποκλείστηκαν εκείνες που δεν ικανοποιούσαν κριτήρια που τέθηκαν με βάση δεδομένα της βιβλιογραφίας. Ακολούθως, για έναν μικρό αριθμό διατάξεων προσδιορίστηκαν με τεχνικές προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής οι ενέργειες αλληλεπίδρασης μεταξύ των επικρατειών και προτάθηκε ως πλέον πιθανή εκείνη με την μικρότερη (αρνητικότερη) ενέργεια. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας μπορεί να βοηθήσουν στην ανάπτυξη αντιθρομβωτικών παραγόντων.

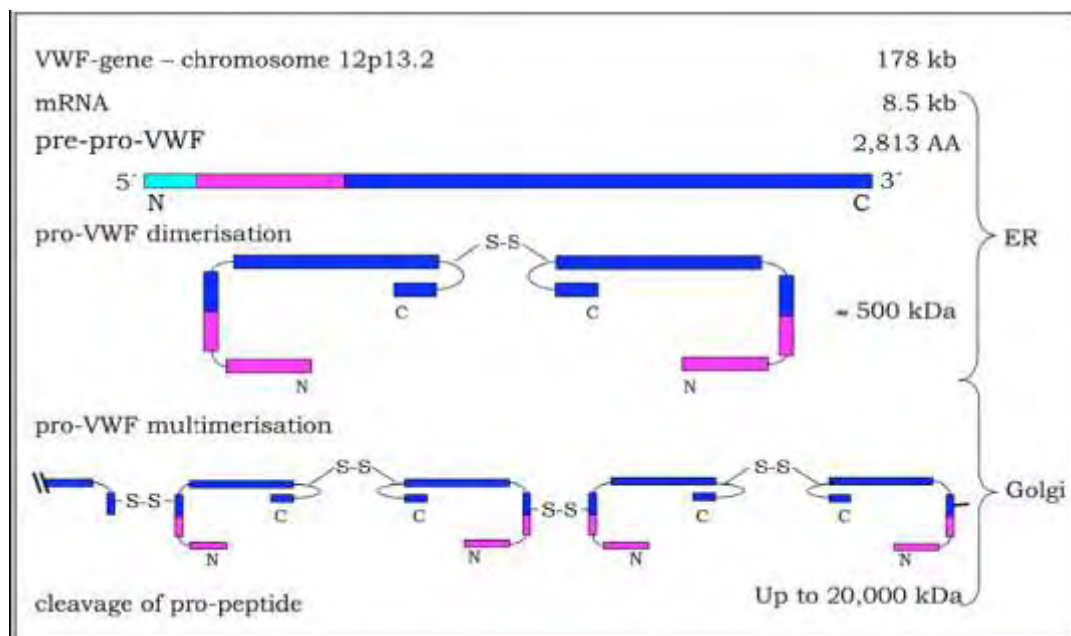
2. Θεωρητικό μέρος

2.1 Βιοσύνθεση του vWF

Ο vWF είναι μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη που κυκλοφορεί στο πλάσμα σαν μια σειρά ετερογενών πολυμερών, η οποία προσκολλάται στις τραυματισμένες περιοχές του ενδοθηλίου. Επιπλέον, ο vWF προστατεύει τον παράγοντα πήξης VIII (FVIII) από τη γρήγορη πρωτεολιτική διάσπαση [5]. Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 και συντίθεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μεγακαρυοκύτταρα, παράγοντας ένα αρχικό προϊόν μετάφρασης 2.813 αμινοξέων (AA), συμπεριλαμβανομένου ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου 22 καταλοίπων, ενός μεγάλου προ-πεπτιδίου 741 και της ώριμης υπομονάδας 2.050 υπολειμμάτων (προ-υπέρ- vWF). Το γονίδιο του vWF που αποτελείται από 178 - 180 KB και έχει 52 εξόνια, κωδικοποιεί το μονομερές του vWF με μοριακό βάρος (MW) 250 - 270 kDa, αποτελούμενο από τις υπομονάδες A, B, C και D, που περιέχουν τις περιοχές σύνδεσης με ποικίλες πρωτεΐνες. Τα μόρια προ vWF διμερίζονται μέσω των δισουλφιδικών δεσμών κοντά στα καρβοξυτελικά τους άκρα μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στη συνέχεια τα διμερή του vWF μεταφέρονται στο σύστημα Golgi ώστε να πολυμεριστούν μέσω N δισουλφιδικών δεσμών και να φτάσουν τα 20.000 kDa. Επίσης, στο σύστημα Golgi λαμβάνει χώρα η πρωτεολιτική διάσπαση του προπεπτιδίου και η γλυκοζυλίωσή του.

Ο vWF του πλάσματος παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα: περίπου 95% των ενδοθηλιακών μορίων vWF εκκρίνονται σε μια συγκέντρωση πλάσματος 10 μg/mL, ενώ το υπόλοιπο αποθηκεύεται στα α- κοκκία των αιμοπεταλίων (φορείς Weibel-Palade) [6]. Ένα σχηματικό διάγραμμα της επεξεργασίας του vWF φαίνεται στην Εικόνα 1.

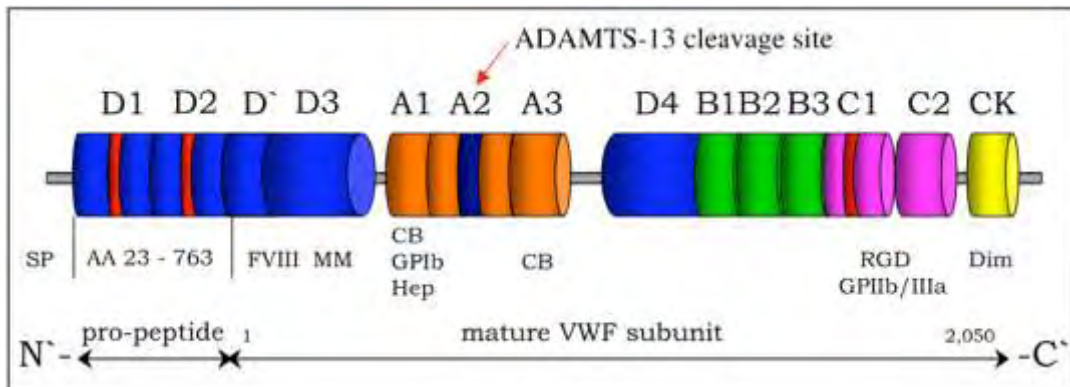
Κατά την έκκριση, τα πολυμερή του vWF διασπώνται σε μικρότερα κομμάτια από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13, η οποία διασπά τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ Y1,605 και M1,606 μέσα στη A2 περιοχή του vWF [8].



Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα της επεξεργασίας του vWF. Το αρχικό προϊόν μετάφρασης περιλαμβάνει 2.813 αμινοξέα (AA), συμπεριλαμβανομένου ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου, ενός μεγάλου προ-πεπτιδίου και μιας ώριμης υπομονάδας (pre-pro-vWF). Οι δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζονται κοντά στα καρβοξυτελικά άκρα των προ vWF διμερών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επιπλέον, δισουλφιδικοί δεσμοί σχηματίζονται κοντά στα αμινοτελικά άκρα των ώριμων υπομονάδων για να σχηματίσουν τα πολυμερή στο σύμπλεγμα Golgi. Τέλος, το προ-πεπτίδιο αποσυνδέεται [7].

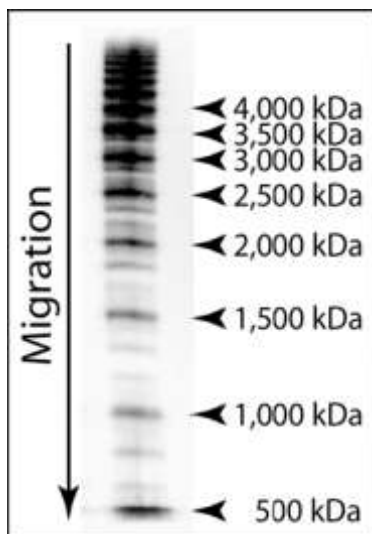
2.2 Λειτουργικές περιοχές του ώριμου vWF

Οι ώριμες υπομονάδες του vWF αποτελούνται από τέσσερις τύπους συντηρημένων δομικών περιοχών, D'- D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-C3 CK, που παρέχουν τις περιοχές συνδέσεων για ποικίλες πρωτεΐνες, π.χ. FVIII, γλυκοπρωτεΐνη αιμοπεταλίων GPIb, ηπαρίνη και κολλαγόνο τύπου I-VI [9]. Οι περιοχές σύνδεσης του vWF φαίνονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Δομή υπομονάδων του vWF. Οι υπομονάδες καθορίζονται ως A, B, C και D περιοχές. Οι περιοχές D/D3 διαθέτουν την περιοχή δέσμευσης του παράγοντα VIII πήξης (FVIII). Η επικράτεια A1 περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης για το κολλαγόνο τύπου VI (CB) καθώς επίσης και τις περιοχές δέσμευσης για τις γλυκοπρωτεΐνες Ib ηπαρίνης (Hep) και αιμοπεταλίων (GPIb). Η περιοχή σύνδεσης του παράγοντα ADAMTS-13 μεταξύ Tyr1605 - Met1606 βρίσκεται μέσα στην επικράτεια A2. Η C-τελική περιοχή διμερισμού είναι εντοπισμένη στη CK περιοχή, ενώ η περιοχή πολυμερισμού (MM) βρίσκεται στη D3 περιοχή. Το προ-πεπτίδιο περιλαμβάνει τα αμινοξέα 23 - 763, και η ώριμη υπομονάδα του vWF αποτελείται από 2.050 αμινοξέα. SP: σηματοδοτικό πεπτίδιο [50].

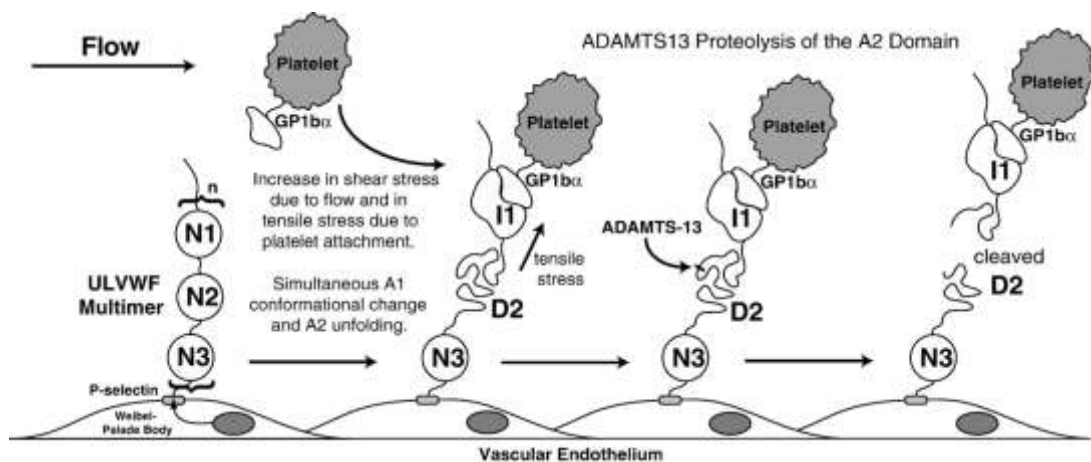
Μετά από τη δημιουργία των πολυμερών του, ο εκκριμένος vWF υποβάλλεται σε περαιτέρω επεξεργασία: ο vWF του πλάσματος έχει μια μοναδική πολυμερική δομή που προκαλείται από την πρωτεολιτική σχάση των πολυμερών από την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS-13 μέσα στην επικράτεια A2 της πρωτεΐνης, με συνέπεια τη δημιουργία ενός σύνθετου σχεδίου ολιγομερών (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Το διαθέσιμο στο εμπόριο τυποποιημένο ανθρώπινο πλάσμα υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης 1.6%. Η πρώτη ζώνη αντιπροσωπεύει το διμερές του vWF περίπου 500 kDa, ενώ οι μεγαλύτερες ζώνες αποτελούν τους πρόσθετους αριθμούς διμερών. Οι υποζώνες αντιπροσωπεύουν τους μικροδορυφόρους [50].

2.2.1 Λειτουργία του παράγοντα von Willebrand

Όταν ένα αιμοφόρο αγγείο τραυματιστεί, τα υποκείμενα κύτταρα που βρίσκονται στο υποενδοθήλιο εκτίθενται στο αίμα. Ο vWF μπορεί να προσδένεται στο κολλαγόνο του υποενδοθηλίου μέσω των επικρατειών του A1 και A3 και εξαιτίας αυτής της πρόσδεσης και των δυνάμεων που ασκεί το αίμα όταν ρέει, επάγεται μία δομική αλλαγή στον vWF που οδηγεί στο ξεδίπλωμά 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 στις επικράτειες A1 και C1. Μόλις προσδεθούν τα αιμοπετάλια γίνονται ενεργά και εκθέτουν στην επιφάνειά τους τον GpIb/IIIa, 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 επιφάνειά τους, η οποία είναι καθοριστική για τη συγκρότηση των συμπλεγμάτων των προθρομβωτικών ενζύμων που οδηγούν στην παραγωγή της θρομβίνης (Εικόνα 4).



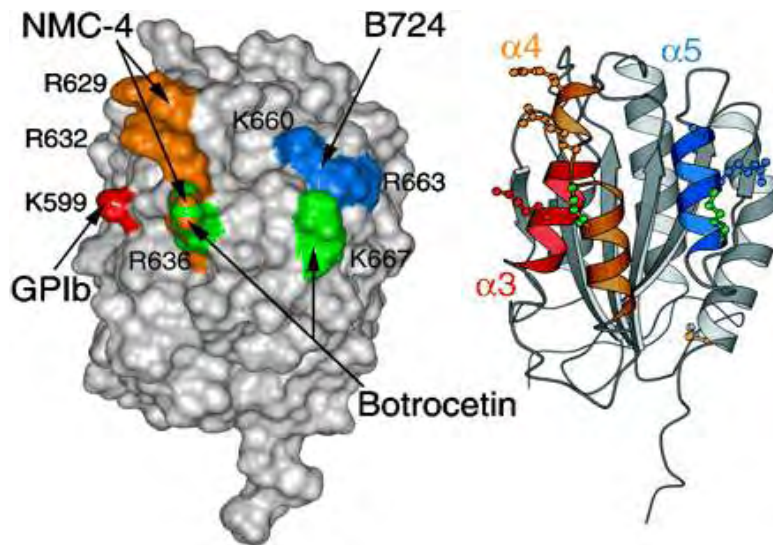
Εικόνα 4: Μηχανισμός πρόσδεσης του vWF στα αιμοπετάλια. Ο vWF μπορεί να προσδένεται στο κολλαγόνο του υποενδοθηλίου μέσω των επικρατειών του A1 και A3 κάτι που οδηγεί σε μία δομική αλλαγή στον vWF και τελικά στο ξεδίπλωμα του. Αυτή η δομική αλλαγή εκθέτει με τη σειρά της τις θέσεις πρόσδεσης της γλυκοπρωτεΐνης (Gp)Iba, με συνέπεια την εμφάνιση των θέσεων πρόσδεσης των αιμοπεταλίων των επικρατειών A1 και C1, την σύνδεση και την ενεργοποίησή τους [48].

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 στην πρώτη επικράτεια, συμμετέχει στην πρόσδεση του vWF στον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα Ib (GpIb) των αιμοπεταλίων. Αυτός είναι ο πρωταρχικός μηχανισμός μέσω του οποίου ο vWF προσδένεται στα αιμοπετάλια υπό την επίδραση ισχυρών δυνάμεων συνάφειας.

2.2.2 Επικράτεια A1

Η επικράτεια A1 εκτείνεται στα κατάλοιπα 509 - 695 και περιέχει την περιοχή σύνδεσης της GpIba [12, 22, 23] και η κρυσταλλική δομή της έχει επιλυθεί [10,11]. Συνδέεται με τα εξής μόρια: GpIba [12], κολλαγόνο [13,14], ριστοσετίνη [15], βοτροσετίνη [16], βιτισκετίνη [17], σουλφατίδια [19-20] και ηπαρίνη [12, 18]. Τα N και C τελικά άκρα συνδέονται με ένα δισουλφιδικό δεσμό, απαραίτητο για τη λειτουργία της επικράτειας A1. Ελλείψει του δισουλφιδικού δεσμού, η συγγένεια σύνδεσης της GpIba μειώνεται έντονα [23]. Επιπλέον, η λειτουργία της επικράτειας A1 εξαρτάται από το μέγεθος (αριθμό καταλοίπων) των N και C-τελικών άκρων [24] και την παρουσία Ο-γλυκανών. Αφαίρεση των Ο-γλυκανών ή αφαλάτωση ενεργοποιούν την επικράτεια A1. Το αντιβιοτικό ριστοσετίνη A και τα δηλητήρια φιδιών βοτροσετίνη και βιτισκετίνη δεσμεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές στην A1 με συνέπεια την ενεργοποίησή της (Εικόνα 5).

Η επικράτεια A1 δεν δεσμεύεται αυθόρμητα στην GpIba. Πιστεύεται ότι καθοριστικό ρόλο διαδραματίζουν οι δομικές αλλαγές που επέρχονται μετά την πρόσδεση του παράγοντα στο κολλαγόνο του υποενδοθηλίου. Πειράματα in vitro έδειξαν, ότι η πρόσδεση του vWF στα αιμοπετάλια μπορεί να επαχθεί από το αντιβιοτικό ριστοσετίνη και δύο τύπους παραγώγων της βοτροσετίνης, παρόλο που οι δύο αυτές ενώσεις αντιδρούν με διαφορετικά κατάλοιπα της επικράτειας A1 [21]. 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.



Εικόνα 5: Περιοχές δέσμευσης προσδετών στην επικράτεια A1 του vWF. Στα δεξιά ο χρωματισμός των πλευρικών αλυσίδων είναι ο ίδιος όπως στην αριστερή εικόνα. Ο δισουλφιδικός δεσμός Cys509-Cys695 φαίνεται κάτω δεξιά, με τα άτομα S να έχουν κίτρινο χρώμα [49].

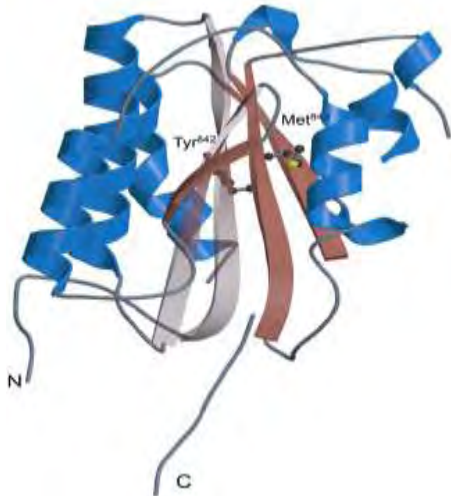
2.2.3 Επικράτεια A2

Ο καθορισμός των ορίων της επικράτειας A2 δεν είναι απλός, επειδή η επικράτεια A2 δεν περιέχει γέφυρα δισουλφιδίου που να συνδέει τα N και C τελικά άκρα. Με βάση την ομολογία με άλλα μόρια τύπου A, τα όρια καθορίζονται μεταξύ των καταλοίπων Ser731 και Cys907. Η επικράτεια A2 περιέχει την περιοχή σύνδεσης της πρωτεάσης (vWFcp) που είναι επίσης γνωστή ως ADAMTS13 [24, 25, 26]. Η επικράτεια A2 έχει έναν δισουλφιδικό δεσμό στο κατώτατο σημείο της περιοχής, που δεν συνδέει τα N-τελικό και C-τελικό άκρο, αλλά διαμορφώνεται μεταξύ δύο διαδοχικών καταλοίπων. Διάφορες μεταλλάξεις στην επικράτεια A2 (και επίσης μερικές στην επικράτεια A1), γνωστές ως μεταλλάξεις τύπου 2A, έχουν προσδιοριστεί σε ασθενείς που ο vWF είναι πιο ευαίσθητος προς την vWFcp [27]. Πιθανότατα, αυτές οι μεταλλάξεις ξετυλίγουν μερικώς την επικράτεια A2 με τρόπο που να την καθιστά πιο ευαίσθητη στην πρωτεάση. Κατά συνέπεια, αυτοί οι ασθενείς στερούνται τα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή στο πλάσμα τους. Μια ανεπάρκεια στην vWFcp, οδηγεί στην παρουσία εξαιρετικά-μεγάλων πολυμερών του vWF που μπορούν να προκαλέσουν την ασθένεια Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα του συνδρόμου Χάιντε (TTP), η οποία χαρακτηρίζεται από θρομβοκυτοπενία, αιμορραγία και άλλα συμπτώματα [28].

2.2.4 Η μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13

Το γονίδιο για την μεταλλοπρωτεάση ADAMTS13 (vWFcp) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9q34. 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 vWF και εμποδίζουν την διάχυτη μικροαγγειακή θρόμβωση [29]. 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. Το ένζυμο αυτό κόβει την επικράτεια A2 μεταξύ των καταλοίπων Tyr842 και Met843. (Εικόνα 6), με αποτέλεσμα να την κόβει σε μικρότερα πεπτίδια και έτσι να απελευθερώνονται προσκολλημένα αιμοπετάλια [30]. 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 [31]. 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 επικράτειας A2 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 [31].

Φυσιολογικά, φαίνεται ότι η πρωτεάση κυκλοφορεί σε σύμπλεγμα με τον πολυμερή παράγοντα. Όμως η πρόσδεσή της δε χρειάζεται απαραίτητα να συνοδεύεται από πρωτεόλυση [32]. Πρόσφατα έχει αποδειχτεί, ότι η A1 αναστέλλει την πρόσβαση της πρωτεάσης στη θέση κοπής στην A2. Αυτή η αναστολή εξαλείφεται κατά την παρουσία της GrIba, 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 [33]. Επιπλέον ο vWF είναι ανθεκτικός στην ADAMTS13 μέχρι να υποβληθεί σε διατμητικές τάσεις ροής.



Εικόνα 6: Πρότυπο της A2 επικράτειας. Ο ADAMTS13 κόβει μεταξύ των υπολειμμάτων Tyr842 και Met843, τα οποία απεικονίζονται και βρίσκονται στο κέντρο του β-φύλλου στο εσωτερικό της περιοχής [51].

2.2.5 Βοτροσετίνη

Οι λειτουργίες του vWF μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους τελεστές. Διάφορα μόρια έχουν περιγραφεί που παρεμποδίζουν τη σύνδεση του vWF στο κολλαγόνο ή στην GrIba. Αυτοί οι τελεστές ενεργούν είτε με απώλεια λειτουργίας είτε με κέρδος λειτουργίας (Πίνακας I).

Οι τελεστές ανήκουν στην υπεροικογένεια των λεκτινών τύπου C (αν και δεν έχουν τη δραστηριότητα λεκτίνης), στην οικογένεια μεταλλοπρωτεασών, στα αντιβιοτικά με γλυκοπεπτίδια ή με αρωματικές ενώσεις.

Πίνακας. 1: Τελεστές του δεσμού κολλαγόνου-vWF-GpIba [51].

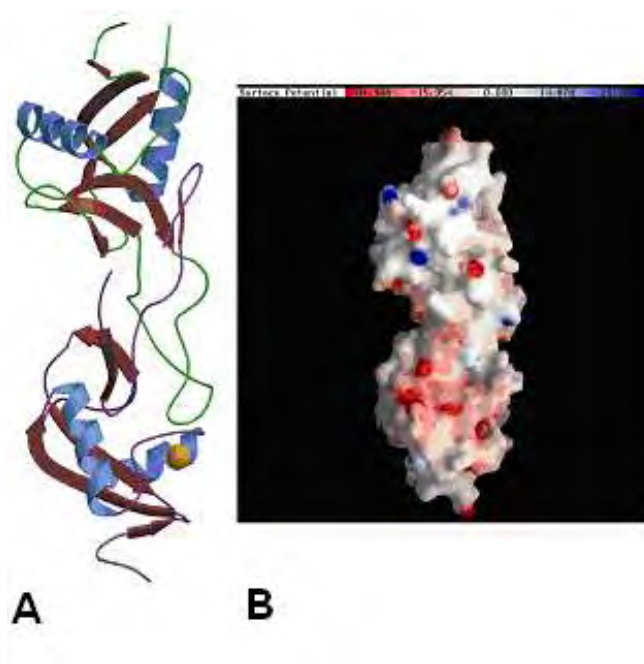
Modulation	Modulator	Isolated from	Family	Function
Gain-of-function	Ristocetin	<i>Nocardia lurida</i>	antibiotics	activates A1
	Botrocetin	<i>Bothrops jararaca</i>	C-type lectin	activates A1
	Jararhagin	<i>Bothrops jararaca</i>	metalloproteinase-desintegrin	activates A1
	Bitiscetin	<i>Bitis orientans</i>	C-type lectin	activates A1 but binds to A1 and A3 domain
	Jaracetin	<i>Bothrops jararaca</i>	metalloproteinase desintegrin	activates A1
Loss-of-function	Heparin		poly glycan	blocks A1
	Flavocetin-A/B	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	C-type lectin	Blocks GpIb
	Alboaggregin-B		C-type lectin	Blocks GpIb
	Mamushigin	<i>Agkistrodon halys blomhoffii</i>	C-type lectin	Blocks GpIb
	Agkistin	<i>Agkistrodon acutus</i>	C-type lectin	Blocks GpIb
	Echicetin	<i>Echis carinatus</i>	C-type lectin	Blocks GpIb
	Jararaca GpIb-BP	<i>Bothrops jararaca</i>	C-type lectin	Blocks GpIb
	Tocaracetin	<i>Trimeresurus tokarensis</i>	C-type lectin	Blocks GpIb
	Heparin		glycosamineglycan	Blocks A1
	Aurintricarboxylic acid			Blocks A1

Η βοτροσετίνη ανήκει στην υπεροικογένεια λεκτινών τύπου C [34]. Είναι ένα ετεροδιμερές μόριο που περιέχει μια α υπομονάδα αποτελούμενη από 133 αμινοξέα (15 kDa) και μια β υπομονάδα αποτελούμενη από 125 αμινοξέα (14.5 kDa), κάθε μια από τις οποίες περιέχει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς και έναν δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των δύο αλυσίδων. Επίσης έχει απομονωθεί μια παραλλαγή της βοτροσετίνης, αποτελούμενη από μία αλυσίδα (32 kDa), αλλά αυτή η παραλλαγή είναι λιγότερο καλός ενεργοποιητής και ανήκει στην οικογένεια μεταλλοπρωτεϊνών [35]. Η κρυσταλλική δομή της βοτροσετίνης έχει επιλυθεί (Εικόνα 7) [36]. Ένας μεγάλος βρόχος προεξέχει από κάθε μια από τις υπομονάδες και ένα ιόν μαγνησίου είναι συνδεδεμένο στην α -αλυσίδα του ετεροδιμερούς. Μία αρνητικά φορτισμένη περιοχή στο κέντρο του μορίου φαίνεται να αλληλεπιδρά με την θετικά φορτισμένη επικράτεια A1.

Η σύνδεση της βοτροσετίνης στην A1 δεν προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές μέσα στην A1. Η μεταλλαξιγένεση και οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι τα κατάλοιπα της A1 στις έλικες $\alpha 4A$, $\alpha 4B$ και $\alpha 5$ είναι σημαντικά για την δέσμευση της βοτροσετίνης [37, 38]. Αυτά τα υπολείμματα είναι κοντά στην Lys599, η οποία βρίσκεται μέσα στην περιοχή σύνδεσης της GpIba, κάτι που δείχνει ότι η βοτροσετίνη δεσμεύεται κοντά στην περιοχή σύνδεσης της GpIba.

Η βοτροσετίνη αλληλεπιδρά επίσης άμεσα με την GrIba. Έχει υποτεθεί ότι η βοτροσετίνη δεσμεύεται στην επικράτεια A1 και με αυτόν τον τρόπο εκθέτει την επιφάνεια που αλληλεπιδρά με την GrIba [38].

Οι σχέσεις αυτές της βοτροσετίνης και της GrIba με την επικράτεια A1 αξιοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας, προκειμένου να περιορισθεί ο αριθμός των πιθανών θέσεων πρόσδεσης της A1 με την A2.



Εικόνα 7: Δομή της βοτροσετίνης.

Η βοτροσετίνη ενεργοποιεί την επικράτεια A1 του vWF και οδηγεί στη σύνδεση της GrIba [51].

A: Απεικονίζεται η κρυσταλλική δομή της βοτροσετίνης. Οι α (μωβ) και β (πράσινο) αλυσίδες αλληλεπιδρούν στενά μέσω ενός μεγάλου προεξέχοντος βρόχου.

B: Ηλεκτρικό δυναμικό της επιφάνειας της βοτροσετίνης. Οι θετικές και αρνητικές επιφάνειες είναι χρωματισμένες μπλε και κόκκινες, αντίστοιχα. Εκτιμάται ότι η αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια στο κέντρο της βοτροσετίνης αλληλεπιδρά με τις θετικά φορτισμένες περιοχές της A1 [52].

2.3 Ασθένεια του von Willebrand (VWD)

Υπάρχουν τέσσερις τύποι της κληρονομούμενης νόσου (VWD):

- 1) τύπου 1: το 60-80% των περιπτώσεων. Οφείλεται σε ποσοτική ανεπάρκεια (ετεροζυγωτία για το γονίδιο που προκαλεί την ασθένεια). Τα επίπεδα του vWF που ανιχνεύονται είναι μειωμένα.
- 2) Τύπου 2: το 20-30% των περιπτώσεων. Οφείλεται σε ποιοτική ανεπάρκεια. Τα επίπεδα του vWF είναι φυσιολογικά, αλλά τα πολυμερή είναι δομικά μη φυσιολογικά ή υποομάδες (subgroups) μικρών ή μεγάλων πολυμερών απουσιάζουν. Ο συγκεκριμένος τύπος της νόσου εμφανίζει τέσσερις υποτύπους: 2A, 2B, 2M και 2N (Normandy).
- 3) Τύπου 3: είναι η πιο σοβαρή μορφή της ασθένειας (ομοζυγωτία του επιβλαβούς γονιδίου).
- 4) Αιμοπεταλιακού τύπου: κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και προκαλείται από μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας του υποδοχέα του vWF που βρίσκεται πάνω στα αιμοπετάλια και συγκεκριμένα της α -αλυσίδας του GrIb. Η απώλεια των μεγάλων πολυμερών εμφανίζεται και στον υπότυπο 2B στον οποίο όμως δεν ανιχνεύονται καθόλου μεταλλάξεις.

Οι τύποι 1 και 2 κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, ενώ ο τύπος 3 (και μερικές φορές και ο τύπος 2) με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο.

Έχοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω προχωρήσαμε στην πρακτική επίλυση του τρόπου πρόσδεσης της επικράτειας A1 με την A2 χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα HEX, με το οποίο βρίσκουμε όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς με τους οποίους θα μπορούσε να γίνει η σύνδεση. Στη συνέχεια με την βοήθεια του προγράμματος VMD και προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής προχωρήσαμε σε εξισορρόπηση του συστήματος A1-A2 σε νερό των επικρατέστερων διατάξεων και υπολογισμό της ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ A1 και A2. Τέλος, καταλήξαμε σε εκείνη τη διάταξη που ικανοποιεί όλες τις συνθήκες που την κάνουν να είναι η πιο κατάλληλη.

3. Εργαλεία και μέθοδοι

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε εργαλεία της βιοπληροφορικής, την βιολογική βάση δεδομένων, PDB (Protein Data Bank) και τα λογισμικά Hex, RASMOL, VMD και NAMD.

3.1 Εργαλεία

3.1.1 Το πρόγραμμα μοριακής αναγνώρισης HEX

Το HEX είναι ένα Πρόγραμμα Μοριακής Αναγνώρισης ζευγών μορίων. Το HEX μπορεί να προσδιορίσει την πρόσδεση πρωτεΐνης - προσδέτη, που μπορεί να είναι ένα μικρό μόριο, μία πρωτεΐνη ή DNA, υποθέτοντας ότι ο προσδέτης είναι άκαμπτος, χρησιμοποιώντας μόνο τη γνώση των τριδιάστατων μορφών τους [39]. Κάθε μόριο αναπαρίσταται με τη βοήθεια τριδιάστατων αναπτυγμάτων πραγματικών, ορθοκανονικών, σφαιρικών πολικών συναρτήσεων βάσης για την κωδικοποίηση τόσο του σχήματος της επιφάνειας όσο και του ηλεκτροστατικού φορτίου καθώς και της κατανομής του δυναμικού [40].

3.1.2 Η Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων PDB

Το PDB είναι το ενιαίο παγκόσμιο αρχείο των δομικών στοιχείων των βιολογικών μακρομορίων, το οποίο δημιουργήθηκε στα εθνικά εργαστήρια Brookhaven (BNL) το 1971 [41]. Περιέχει τις δομικές πληροφορίες των μακρομορίων που καθορίζονται με κρυσταλλογραφία ακτινών X, με τη μέθοδο του NMR κ.λ.π.

3.1.3 Το Πρόγραμμα Γραφικής Απεικόνισης RASMOL

Το RASMOL είναι ένα πρόγραμμα οπτικοποίησης μορίων προοριζόμενο για τη δομική απεικόνιση των πρωτεϊνών, των νουκλεϊνικών οξέων και των μικρών βιομορίων. Το πρόγραμμα διαβάζει τα αρχεία pdb των μορίων και ταυτόχρονα τα απεικονίζει στην οθόνη με ποικιλία χρωμάτων και σχεδίων.

3.1.4 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 αρχεία τροχιών (trajectories) 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 [42].

3.1.5 Το πρόγραμμα μοριακής δυναμικής NAMD

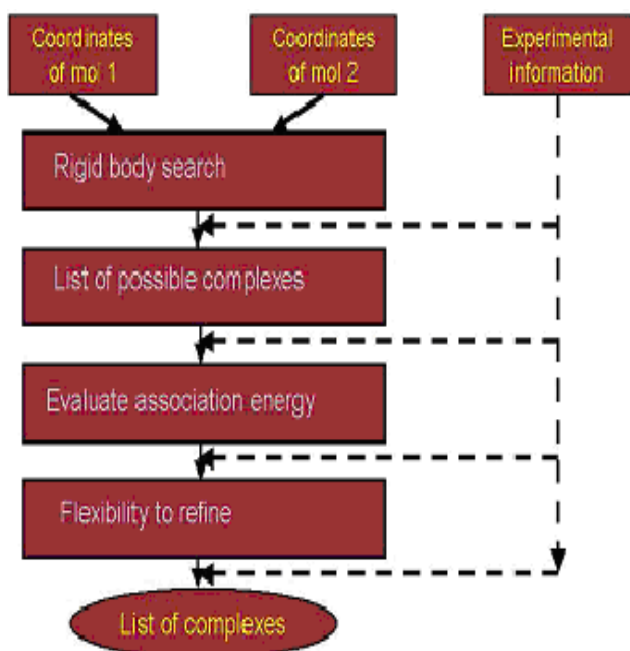
Οι Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD) υπολογίζουν τις ατομικές τροχιές με την επίλυση των εξισώσεων της κινηματικής χρησιμοποιώντας εμπειρικές συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας (Force Fields, FF), όπως το πεδίο δυνάμεων CHARMM, που προσεγγίζει τα πραγματικά ατομικά δυναμικά στα συστήματα βιοπολυμερών. Για τη διεξαγωγή προσομοιώσεων MD, έχουν αναπτυχθεί διάφορα προγράμματα υπολογιστών. 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 $O(N \log n)$ [43].

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.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Πρόσδεση (docking)

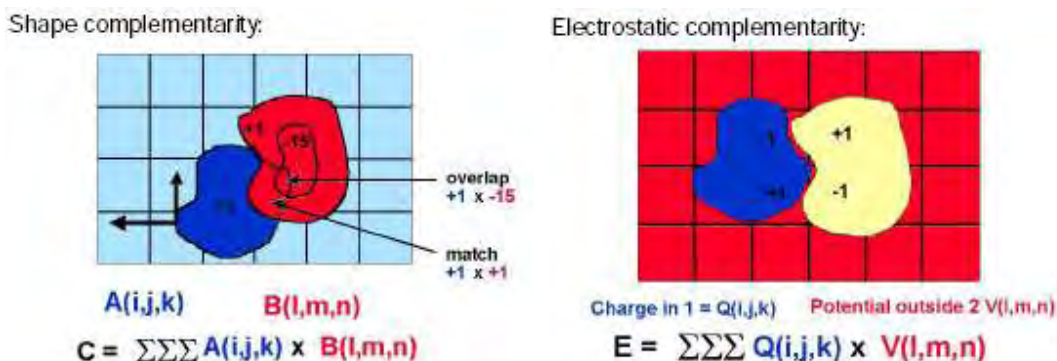
Για να είναι σε θέση ο προσδέτης να προσδεθεί στον υποδοχέα και να δώσει αποτελέσματα, θα πρέπει να διαθέτει την κατάλληλη γεωμετρία ώστε να ταιριάζει στη θέση πρόσδεσης, αλλά και να αναπτύσσει τις απαιτούμενες αλληλεπιδράσεις (χημική συγγένεια) με τα άτομα του υποδοχέα στη θέση πρόσδεσης, ώστε να παραμείνει σταθερά συνδεδεμένος όσο χρειάζεται για να ασκήσει τη δράση του. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα που ενδέχεται να λάβουν χώρα κατά την πρόσδεση μπορεί να είναι τριών τύπων: ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις *van der Waals* και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 8: Τα στάδια της πρόσδεσης μεταξύ πρωτεϊνών [53].

Η διαδικασία της υπολογιστικής πρόβλεψης της πρόσδεσης μεταξύ πρωτεϊνών εκτελείται σε τέσσερα στάδια τα οποία φαίνονται στην Εικόνα 8.

1. Οι πρωτεΐνες θεωρούνται ως άκαμπτα μόρια, τα οποία συνδέονται μέσω της συμπληρωματικότητας των σχημάτων και των ηλεκτροστατικών τους φορτίων (Εικόνα 9).
2. Διαμορφώνεται ένα σύνολο από τις πιθανές διατάξεις σύνδεσης.
3. Αξιολόγηση των διατάξεων με βάση την Ενέργεια .
4. Εισάγεται η παράμετρος της ευελιξίας των πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών [53].



Εικόνα 9: Α: Φαίνεται, πώς χρησιμοποιείται η συμπληρωματικότητα του σχήματος των πρωτεϊνών για την πρόσδεση. Β: Φαίνεται το αντίστοιχο διάγραμμα για την συμπληρωματικότητα του ηλεκτροστατικού φορτίου [54].

3.2.1.1 Μέθοδοι πρόβλεψης πρόσδεσης

Η πρόβλεψη της μοριακής πρόσδεσης μπορεί να χωριστεί σε δύο μέρη. Το πρώτο είναι η εύρεση όλων εκείνων των διατάξεων που ικανοποιούν τις συνθήκες που ορίζουμε για την πρόσδεση μέσω ενός αλγορίθμου. Το δεύτερο είναι η αξιολόγηση μέσω συναρτήσεων αξιολόγησης ώστε να διακριθούν οι διατάξεις εκείνες που είναι οι καταλληλότερες.

Οι πιο συνήθεις αλγόριθμοι για την πρόσδεση λειτουργούν με βάση τις εξής μεθόδους (στην παρούσα εργασία αναφέρονται οι τρεις συνηθέστερες):

3.2.1.1.1 Μέθοδοι Monte Carlo

Οι μέθοδοι Monte Carlo (MC) βρίσκονται μεταξύ των περισσότερο εδραιωμένων και ευρέως χρησιμοποιούμενων τεχνικών πρόσδεσης, οι οποίες χρησιμοποιούν τυχαίους αριθμούς και στατιστική πιθανοτήτων για τη διερεύνηση διαφόρων προβλημάτων.

Η χρήση των MC μεθόδων δίνει τη δυνατότητα επίλυσης σύνθετων προβλημάτων. Για παράδειγμα η επίλυση εξισώσεων που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο ατόμων είναι σχετικά απλή, η επίλυση όμως των ίδιων εξισώσεων για εκατοντάδες χιλιάδες άτομα είναι αδύνατη. Με τις MC μεθόδους, ένα μεγάλο σύστημα δειγματοληπτείται σε έναν αριθμό τυχαίων διαμορφώσεων και τα δεδομένα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την περιγραφή της συμπεριφοράς ολόκληρου του συστήματος. Σε γενικές γραμμές οι

μέθοδοι MC ξεκινούν με μια αρχική διαμόρφωση και πραγματοποιώντας τοπικές αλλαγές μετακινούνται προς διαμορφώσεις χαμηλότερης ενέργειας [56].

Κριτήριο Metropolis

Το πιο διαδεδομένο κριτήριο για την αποδοχή ή απόρριψη μιας διαμόρφωσης στις προσομοιώσεις MC, είναι αυτό που χρησιμοποιείται στη μέθοδο Metropolis [57] (1953), που θεωρείται η πρότυπη MC μέθοδος. Η μέθοδος αυτή, περιλαμβάνει εφαρμογή τυχαίων καρτεσιανών μετακινήσεων στο σύστημα και αποδοχή ή απόρριψη μιας μετακίνησης με βάση την πιθανότητα Boltzman.

Πίνακας II: Προγράμματα με τα οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί πρόβλεψη πρόσδεσης μεταξύ πρωτεϊνών [53].

Programs for protein–protein docking.				
Program*	Algorithm	Laboratory	URL	Details
Downloadable				
3D-Dock	Global: FFT; rescoring: residue potentials; refinement: mean-field sidechain multicoopy	Imperial Cancer Research Fund/Imperial college (Stemberg)	www.bmm.icnetuk/docking/	Free to academic; distribution mostly source code (C); refinement sgi/linux executables
HEX	Global: Fourier correlation of spherical harmonics	Aberdeen University (Ritchie)	www.biochem.abdn.ac.uk/hex/	Free to academic; sgi/sun/linux executables
GRAMM	Global: FFT clustering and rescoring decoys also available	SUNY/MUSC (Vakser)	reco3.ams.sunysb.edu/gramm/	Free to academic; sgi/sun/ibm/dec/linux/win32 executables
PPD	Global: geometric hashing; rescoring: multiple filters	Columbia (Honig)	ftp://flash62.bioc.columbia.edu/pub/other	Free to academic; sgi executables
DOT	Global: FFT for shape complementarity and approximate Poisson–Boltzmann electrostatics	University of California San Diego (Ten Eyck)	www.sdsc.edu/CMS/DOT	Free to academic; parallelised under mpi; source (C/fortran) and sun/sgi/dec/ibm executables
BIGGER (Chemera)	Global: bit mapping; rescoring: multiple filters	Universidade Nova de Lisboa	www.dq.fc.t.unl.pt/bioinfo/chemera/ www.biotechol.com/Paginas/Chemera.htm	Free to academic; win32 executables
MERL refinement protocol	Constrained minimisation desolvation	University of Boston (MERL) (Vajda)	engpub1.bu.edu/bioinfo/MERL/software/decoys.html	Free; Charmm input scripts, source code (f77)
<i>DOCK</i>	Global: grid-based energy function; flexible docking: random search plus incremental construction	University of California San Francisco (Kuntz)	www.cmpham.ucsf.edu/kuntz/dock.html	Free to academic; sgi executables
<i>AutoDock</i>	Grid-based empirical potential flexible docking via Monte Carlo search and incremental construction	Scripps Institute (Olson)	www.scripps.edu/pub/olson-web/download.html	Free to academic; source code and executables for sgi/dec/sun
<i>FlexX</i>	Fragment assembly energy function: (Boehm potential)	GMD-SCAI (Lengauer)	cartan.gmd.de/flexx/	Licence required from Tripos.com
Contact authors				
Program	Algorithm	Laboratory	Contact	
DARWIN	GA Chamm force field	University of Pennsylvania	burnett@wistar.upenn.edu	
ZDOCK	FFT for complementarity, electrostatics and residue potential	University of Boston (Weng)	sullivan.bu.edu/~rong/dock/download.shtml	

*Programs given in italics are designed principally for protein–ligand docking, but may be usable in the protein–protein case. Programs for MD, BD and continuum electrostatics calculations are also useful.

Μερικά από τα προγράμματα που χρησιμοποιούν αυτή τη μέθοδο είναι τα εξής: AutoDock, ProDock, ICM, MCDOCK, DockVision, QXP και Affnity (Πίνακας II).

3.2.1.1.2 Γενετικοί αλγόριθμοι

Η κεντρική ιδέα των γενετικών αλγορίθμων είναι η σμίκρυνση ενός πληθυσμού πιθανών λύσεων μέσω των γενετικών τεχνικών (μεταλλαγή, διασταυρώσεις και μεταναστεύσεις). Κάθε λύση (κατάσταση του συστήματος) κωδικοποιείται σε μια μορφή συμβολοσειράς (string) που αποκαλείται χρωμόσωμα. Τα χρωμοσώματα διαφοροποιούνται/ αναπαράγονται με μετάλλαξη (τυχαία αλλαγή σε κάποιο στοιχείο του χρωμοσώματος) ή/και διασταύρωση (ανταλλαγή πληροφορίας μεταξύ χρωμοσωμάτων). Μετά από κάθε κύκλο αναπαραγωγής, τα χρωμοσώματα μεταφράζονται και πάλι σε καταστάσεις του συστήματος και εφαρμόζεται μια διαδικασία επιλογής που καθορίζει τις καταστάσεις που θα επιβιώσουν (τις “καλύτερες”) και θα δώσουν απογόνους στην επόμενη γενιά. Στην νέα γενιά εφαρμόζονται οι ίδιες λειτουργίες και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για έναν αριθμό από γενιές, οπότε επιβιώνουν οι πιο κατάλληλες καταστάσεις [55]. Μερικά από τα προγράμματα του χρησιμοποιούν την μέθοδο των γενετικών αλγορίθμων είναι τα εξής: GOLD, AutoDock, DIVALI και DARWIN (Πίνακας II).

3.2.1.1.3 Μέθοδοι συμπληρωματικότητας σημείου

Αυτές οι μέθοδοι είναι βασισμένες στην αξιολόγηση της μορφής και της χημικής συμπληρωματικότητας μεταξύ των αλληλεπιδρώντων μορίων. Τα αλληλεπιδρώντα μόρια τοποθετούνται συνήθως σε ένα γραφικό σύστημα αποτελούμενο, συνήθως, από σφαίρες ή κύβους. Ο προσδέτης περιστρέφεται για να δώσει το μέγιστο αριθμό αντιστοιχιών μεταξύ αυτού και του υποδοχέα. Επειδή οι περισσότεροι αλγόριθμοι αυτής της μεθόδου είχαν σχεδιαστεί για πρόσδεση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης συνήθως δεν μπορούν να κάνουν flexible docking [55]. Μερικά παραδείγματα προγραμμάτων του χρησιμοποιούν την μέθοδο συμπληρωματικότητας σημείου είναι τα εξής: FTDOCK, SANDOCK και FLOG (Πίνακας II).

Στην παραπάνω μέθοδο βασίζεται και ο σχεδιασμός του προγράμματος HEX, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, το οποίο, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 3.1.1, χρησιμοποιεί σφαιρικούς πολικούς μετασχηματισμούς fourier για τον υπολογισμό των διατάξεων πρόσδεσης πρωτεϊνών [39].

Σφαιρικοί Πολικοί Συσχετισμοί Fourier (SPF)

Στην προσέγγιση του HEX τόσο το σχήμα όσο και η κατανομή του ηλεκτρικού φορτίου μιας πρωτεΐνης παριστάνονται ως αναπτύγματα σφαιρικών αρμονικών καθώς και ακτινικών συναρτήσεων βάσης. Αυτό επιτρέπει τον ταχύτατο συσχετισμό ζευγών πρωτεϊνών.

Μια πλήρης αναζήτηση για την πρόσδεση μέσω HEX, πραγματοποιείται με έξι βαθμούς ελευθερίας (κάθε πρωτεΐνη έχει από τρεις) για το σύστημα των «άκαμπτων» πρωτεϊνών [40].

Στο HEX τοποθετούνται οι δύο πρωτεΐνες με προσανατολισμό που φαίνεται να είναι ο σωστότερος σύμφωνα με πληροφορίες που αντλούνται από τη βιβλιογραφία. Έπειτα εκτελούνται περιστροφές και προκύπτουν αρκετές διατάξεις κοντινές δομικά της αρχικής, λόγω του ότι αποκλείονται οι διατάξεις που είναι εκτός της περιοχής ενδιαφέροντος.

Για να επιτευχθούν τα παραπάνω, οι πρωτεΐνες αντιμετωπίζονται ως μόρια με «διπλή επιφάνεια». Η εξωτερική από τις δύο επιφάνειες είναι ανάμεσα στην μοριακή (εσωτερική) επιφάνεια και στην επιφάνεια εκείνη που ορίζει τα εξωτερικά όρια της πρωτεΐνης. Έπειτα περιστρέφονται με τέτοιο τρόπο οι πρωτεΐνες ώστε να υπάρχει ο βέλτιστος βαθμός αλληλοεπικάλυψης μεταξύ τους (Εικόνα 10). Τέλος η ηλεκτροστατική ενέργεια E , και η βαθμολογία στερεοδιαταξικής συμπληρωματικότητας S , συνδυάζονται για την εύρεση της ενέργειας του συστήματος μέσω της εξίσωσης [40]:

$$E_{\text{total}} = \left(\frac{1391.4}{K_R} \right) E + K_H S$$



Εικόνα 10: Απεικόνιση της συμπληρωματικότητας των σχημάτων των πρωτεϊνών μέσω του μοντέλου της «διπλής επιφάνειας». Η εξωτερική επιφάνεια εκτείνεται στην περιοχή ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές και στην γραμμοσκιασμένη επιφάνεια η οποία είναι η εσωτερική (a). Στο σχήμα (b) φαίνεται ο προσανατολισμός εκείνος που δίνει τη μέγιστη αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των δύο πρωτεϊνών [40].

3.2.2 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.

Οι προσομοιώσεις που εκτελούνται στον υπολογιστή, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ μικροσκοπικών μεγεθών και χρονικών κλιμάκων και του μακροσκοπικού κόσμου του εργαστηρίου. Επίσης, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος [44].

Η Μοριακή Δυναμική σχετίζεται με διαδικασίες που εξαρτώνται από τον χρόνο και που λαμβάνουν χώρα σε μοριακά συστήματα [45]. Κάθε δυναμική διεργασία (π.χ. κίνηση) έχει μία χρονική κλίμακα, ένα πλάτος, καθώς και ένα ενεργειακό εύρος [45]. 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) [45]. Αρκετές από αυτές τις κινήσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημική λειτουργία της πρωτεΐνης [45].

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 [46]. Προς το παρόν, μόνο η «κλασική» Μοριακή Δυναμική, αυτή δηλαδή που χρησιμοποιεί τους νόμους της κλασικής μηχανικής, είναι πρακτικά εφαρμόσιμη σε προσομοιώσεις βιομοριακών συστημάτων [46].

Μια προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής αποτελείται από την αριθμητική, βήμα προς βήμα, επίλυση των κλασικών εξισώσεων της κίνησης [44]:

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

Η πρώτη εξίσωση είναι ο γνωστός 2ος Νόμος 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 αρνητική κλίση της δυναμικής ενέργειας u ως προς την θέση 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 συναρτήσεως της θέσης (συναρτήσεως δυναμικού ή force fields), όπως είναι το AMBER και το CHARMM. Στις προσομοιώσεις της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικού CHARMM, όπως θα δούμε πιο αναλυτικά παρακάτω. Μια μαθηματική συνάρτηση δυναμικού, περιλαμβάνει εξισώσεις που περιγράφουν την μεταβολή της δυναμικής ενέργειας που οφείλεται α) σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων που δεν συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό και β) σε αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εξισώσεις αυτές:

Η εξίσωση

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

αφορά στην δυναμική ενέργεια λόγω αλληλεπιδράσεων Van der Waals [29].

Το δυναμικό αυτό καλείται δυναμικό Lennard-Jones. Το σ είναι η απόσταση κατά την οποία η δυναμική ενέργεια μεταξύ δύο ατόμων είναι μηδέν. Το ϵ έχει διαστάσεις ενέργειας. Το r είναι η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων.

Η εξίσωση

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

αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, και οι οποίες διέπονται από τον νόμο του Coulomb. Τα Q_1 και Q_2 είναι τα φορτία δύο ατόμων, το r είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων, ενώ το ϵ_0 είναι η διηλεκτρική σταθερά του κενού και το π είναι η γνωστή σταθερά που ισούται με 3,1416.

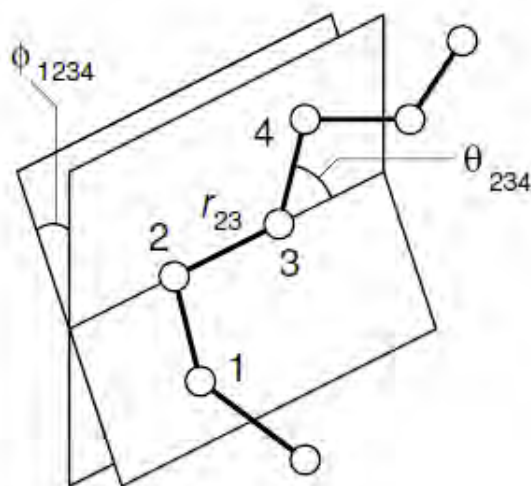
Τέλος, η εξίσωση:

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

αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Το δυναμικό αυτό αποτελείται από τρεις όρους: Ο πρώτος όρος περιγράφει την δυναμική ενέργεια λόγω απομάκρυνσης των ατόμων από την θέση ισορροπίας σε ομοιοπολικό δεσμό. Ο δεύτερος όρος αναφέρεται στην δυναμική ενέργεια λόγω κάμψεων και ο τρίτος στην δυναμική ενέργεια λόγω στρέψεων [44].

Τα παραπάνω γίνονται κατανοητά με την βοήθεια της εικόνας 11.

Το r_{23} συμβολίζει την απόσταση μεταξύ των ατόμων 2 και 3, τα οποία είναι συνδεδεμένα με χημικό δεσμό [44]. Η θ_{234} συμβολίζει την γωνία μεταξύ των φορέων δύο διαδοχικών χημικών δεσμών. Τέλος, η γωνία ϕ_{1234} συμβολίζει την γωνία στρέψης.



Εικόνα 11: Αναπαράσταση των γωνιών που σχηματίζονται σε ένα απλουστευμένο σύστημα επτά ατόμων που συνδέονται το ένα με το άλλο [44].

Συνοψίζοντας λοιπόν, ένα πρόγραμμα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, χρησιμοποιεί μια συνάρτηση δυναμικού και υπολογίζει από τις τρέχουσες συντεταγμένες των ατόμων σε κάθε βήμα της προσομοίωσης και για κάθε άτομο, την συνισταμένη δύναμη που ασκείται πάνω του. Από τις δυνάμεις υπολογίζονται οι επιταχύνσεις και ακολούθως οι νέες θέσεις και ταχύτητες για χρονικό βήμα Δt (συνήθως 2 fs). Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για χιλιάδες ή εκατομμύρια βήματα.

3.2.3 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) (Εξίσωση 1). Στην εξίσωση αυτή \vec{r} είναι το διάνυσμα θέσης του κάθε ατόμου στην πρωτεΐνη, t_j 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.

$$RMSD(t_j) = \sqrt{\frac{\sum_{\alpha=1}^N [\vec{r}(t_j) - \vec{r}(t_0)]^2}{N}} \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

4. Πρακτικό Μέρος

4.1 Πρόβλεψη πρόσδεσης στο σύμπλοκο A1-A2 με το πρόγραμμα Hex

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε τα αρχεία *pdb* που αφορούν στις κρυσταλλικές δομές των επικρατειών A1 και A2. Τα παρακάτω βήματα ακολουθήθηκαν για τρεις διαφορετικούς προσανατολισμούς της A2. Πρώτον, ο προσανατολισμός είναι αυτός με τον οποίο εισάγεται η A2 στο σύστημα, δεύτερον, αναστρέφεται ως προς τον άξονα των *z* κατά 180° και τρίτον αναστρέφεται 180° ως προς τον άξονα των *ψ*.

1. Ανοίγουμε το πρόγραμμα Hex 4.5 και φορτώνουμε ως υποδοχέα το αρχείο *pdb* του συμπλέγματος A1, GPIb, βοτροσετίνη: *File > Open > Receptor*.
2. Αφαιρούμε τις αλυσίδες του GPIb και της βοτροσετίνης.
3. Περιστρέφουμε την A1 ώστε να έχει εκτεθειμένη προς την A2 την περιοχή εκείνη με την οποία συνδέεται με την βοτροσετίνη. Αυτό γίνεται μέσω του *controls > orientation* και αλλάζοντας τις τιμές Alpha, Beta, Gamma, που αντιστοιχούν στους άξονες *χ*, *ψ*, *z*. Αποθηκεύουμε επιλέγοντας την εντολή *Commit*.
4. Φορτώνουμε και το *pdb* του προσδέτη που είναι η A2: *File > Open > Ligand*. Προχωράμε στο *docking: Controls > Docking*, βάζοντας τις εξής παραμέτρους:

<i>Search Mode:</i>	Full rotation		
<i>Correlation Type:</i>	Shape-electrostatics		
<i>Radial Filter:</i>	None		
<i>Post Processing:</i>	MM minimization		
<i>Grid Dimension:</i>	0.6	<i>Solutions:</i>	500
<i>Receptor Range:</i>	45	<i>Samples:</i>	642
<i>Ligand Range:</i>	180	<i>Samples:</i>	642
<i>Twist Range:</i>	360	<i>Samples:</i>	128
<i>Distance Range:</i>	40		
<i>Scan Step:</i>	1.0	<i>Substeps:</i>	2
<i>Steric Scan:</i>	16		
<i>Final Search:</i>	25		
<i>Soin:</i>	0		

Δηλαδή αφήνουμε περιθώριο ελευθερίας κίνησης στην A1 45° ενώ στην A2 180°. Τελικά προκύπτουν 317 διατάξεις από το docking με τον πρώτο προσανατολισμό της A2, 301 απ' τον δεύτερο και 311 απ' τον τρίτο, σύνολο 929 διατάξεις, με την μορφή αρχείων pdb (Εικόνα 12).

ATOM	2065	N	ASP	A1498	7.415	15.789	20.586	1.00	54.75
ATOM	2066	CA	ASP	A1498	7.602	15.392	21.949	1.00	54.75
ATOM	2067	C	ASP	A1498	9.084	15.366	22.132	1.00	54.75
ATOM	2068	O	ASP	A1498	9.769	14.533	21.539	1.00	54.75
ATOM	2069	CB	ASP	A1498	7.090	13.976	22.267	1.00	54.75
ATOM	2070	CG	ASP	A1498	5.568	13.996	22.274	1.00	54.75
ATOM	2071	OD1	ASP	A1498	4.994	15.118	22.286	1.00	54.75
ATOM	2072	OD2	ASP	A1498	4.961	12.892	22.274	1.00	54.75
ATOM	2073	H	ASP	A1498	7.625	15.161	19.836	1.00	99.99

Εικόνα 12: Απόσπασμα αρχείου pdb, που προκύπτει μετά το docking και αφορά την επικράτεια A1 του von Willebrand.

4.2 Επιλογή επικρατέστερων διατάξεων

Τα κριτήρια επιλογής που χρησιμοποιήσαμε είναι τα εξής:

- I. Ενέργεια (όσο μικρότερη τόσο πιο σταθερό το σύμπλοκο)
- II. Έλεγχος της περιοχής σύνδεσης της A1 με την A2 με την βοήθεια του προγράμματος RASMOL (πρέπει η A2 να συνδέεται κοντά στην περιοχή σύνδεσης της βοτροσετίνης και του GPIb)

Από τις 929 διατάξεις καταλήξαμε σε εννέα με τις οποίες προχωρήσαμε σε ελαχιστοποίηση ενέργειας στο κενό.

1. Αρχικά κάναμε διαχωρισμό (split) στα αρχεία που έχουμε από το docking ώστε να χωρίσουμε την A1 (chain A) από την A2 (chain E) με την βοήθεια του προγράμματος VMD και ενός tcl script (split_A-E), το οποίο παρατίθεται στο παράρτημα.
2. Από τα δύο νέα αρχεία pdb δημιουργήσαμε ένα ενιαίο αρχείο pdb. Ένα αρχείο pdb, δεν περιέχει καμία πληροφορία για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων, των οποίων τις συντεταγμένες περιέχει. Για να πραγματοποιηθεί όμως μία

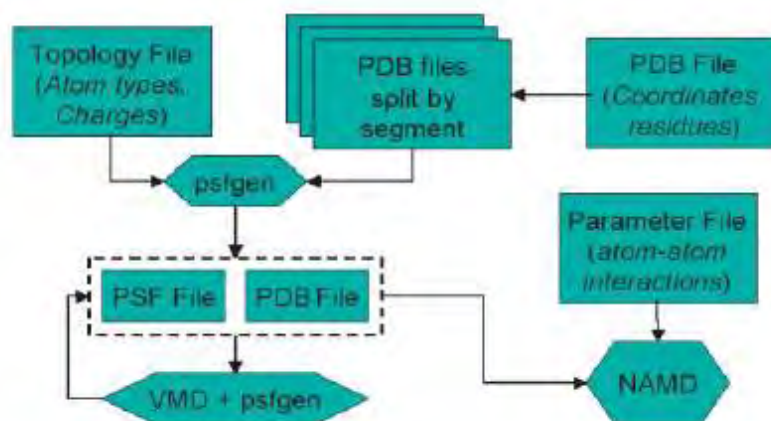
προσομοίωση, είναι απαραίτητη αυτή η πληροφορία [47]. Έτσι πρέπει να δημιουργηθεί ένα αρχείο psf, που περιέχει αυτήν την πληροφορία. Το αρχείο αυτό μπορεί να δημιουργηθεί από το πρόγραμμα psfgen με βάση το αρχικό αρχείο pdb και ένα αρχείο τοπολογίας (topology file), το οποίο στην δική μας ανάλυση είναι 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, 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 A-E.pgn
```

Έτσι λοιπόν δημιουργήσαμε τα αρχεία A-E.pdb και A-E.psf με βάση τα οποία πραγματοποιήθηκε η προσομοίωση.

Στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιούνται τα διάφορα αρχεία, και τα προγράμματα VMD και NAMD:

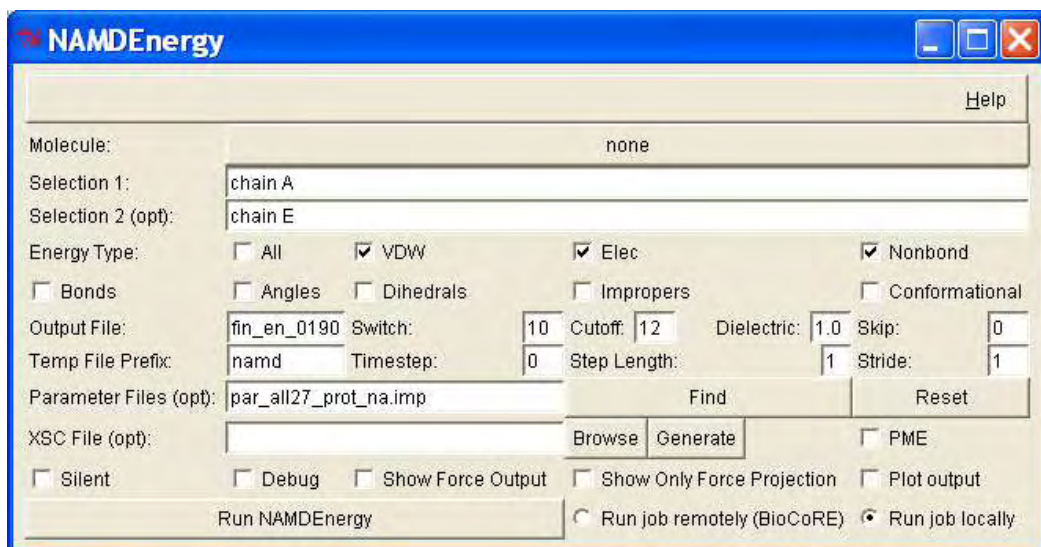


Εικόνα 13: Διάγραμμα ροής που δείχνει τον τρόπο χρήσης των διαφόρων αρχείων από τα προγράμματα VMD και NAMD [47].

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13, το πρόγραμμα NAMD είναι ο τελικός προορισμός, είναι δηλαδή το πρόγραμμα που εκτελεί τις προσομοιώσεις. Το parameter file, δηλαδή το αρχείο παραμέτρων, το οποίο δεν σχολιάστηκε παραπάνω, είναι ένα αρχείο που περιέχει τις σταθερές της συνάρτησης δυναμικού για κάθε τύπο ατόμου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το αρχείο παραμέτρων par_all27_prot_na.inp για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.

3. Προχωρήσαμε στην ελαχιστοποίηση ενέργειας, η οποία περιλαμβάνει τα βήματα της παραγράφου 4.3.3 (ελαχιστοποίηση ενέργειας) που περιγράφονται παρακάτω στην ενότητα 4.3.
4. Μέσω του VMD υπολογίζουμε την ενέργεια αλληλεπίδρασης (interaction energy) των 9 αυτών φάσεων ως εξής:
 - 1) Φορτώνουμε το αρχείο psf του συμπλόκου: *VMD Main > File > New Molecule*.
 - 2) Κάνουμε δεξί κλικ στο σύμπλοκο που ανοίξαμε και επιλέγουμε *Load Data Into Molecule* και φορτώνουμε το αντίστοιχο αρχείο coor που προέκυψε από την minimization
 - 3) Υπολογίζουμε την ενέργεια αλληλεπίδρασης ως εξής:
Extentions > Analysis > NAMD Energy

Συμπληρώσαμε τα πεδία του παράθυρου NAMDenergy ως εξής:



4.3 Προετοιμασία για την προσομοίωση του συμπλόκου A1-A2

4.3.1 Ενυδάτωση (solvate)

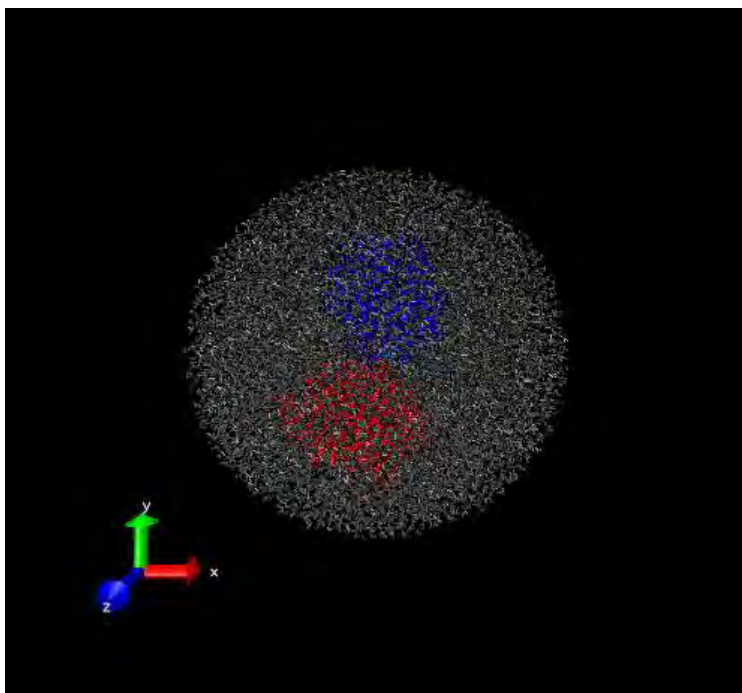
Πριν από την ενεργειακή ελαχιστοποίηση (energy minimization) που ακολουθείται από την εξισορρόπηση (equilibration), πρέπει να διαμορφωθούν οι κατάλληλες συνθήκες γύρω από το μόριο της πρωτεΐνης ώστε να προσεγγίζουν αυτές της πραγματικότητας. Επειδή το άμεσο περιβάλλον της πρωτεΐνης που μελετάμε είναι 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. Το script παρατίθεται στο 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 του συμπλέγματος A1-A2.
 - β) Στο VMD Main κάνουμε δεξί κλικ στο μόριο που φορτώσαμε και επιλέγουμε *Load Data Into Molecule*. Διαλέγουμε το αντίστοιχο αρχείο pdb του συμπλέγματος A1-A2 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 14) και ένα αρχείο txt που θα αναφέρει ότι έγινε επιτυχώς το solvate ή ότι υπήρξαν σφάλματα.



Εικόνα 14: Η απεικόνιση της A1 με την A2 μέσω VMD μετά το solvate. Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα άτομα του νερού, με μπλε η A2 επικράτεια και με κόκκινο η A1 επικράτεια.

4.3.2 Προσθήκη Ιόντων (Neutralization / Add Ions)

Τα αρχεία psf και pdb που λάβαμε από το solvation περιέχουν το σύστημα συμπλέγματος (A1-A2)-νερού. 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. Το script παρατίθεται στο παράρτημα.

Η διαδικασία είναι η εξής:

1. Φορτώνουμε στο VMD το psf και το αντίστοιχο pdb για το σύστημα συμπλέγματος (A1-A2)-νερού, 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 αποθηκευτούν 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 συμπλέγματος (A1-A2)-νερού, με τη βοήθεια του VMD.

Η διαδικασία είναι η έξης:

1. Φορτώνουμε στο VMD το psf και το αντίστοιχο pdb για το σύστημα συμπλέγματος (A1-A2)-νερού, 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 το σύμπλεγμα (A1-A2) 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 καταλοίπου, 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 αποθηκεύσουμε το τροποποιημένο pdb 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.

4.3.3 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (Energy Minimization)

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

1. Για να τρέξουμε την minimization χρειάζεται να συντάξουμε ένα configuration script, που παρατίθεται στο 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 ιόντων, 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 tcl83.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 αυτήν την εντολή θα δημιουργηθεί στον 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 (<10) και όσο το δυνατόν μικρότερος, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί αυξάνοντας τα βήματα.

5. Όταν τελειώσει η διαδικασία θα δημιουργηθούν στον 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.

4.3.4 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 στον 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 στον 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 σύμπλεγμα A1-A2.

4.3.5 Υπολογισμός του RMSD

Για να ολοκληρωθεί η μελέτη μας, πραγματοποιήσαμε τον υπολογισμό του RMSD, δηλαδή την απόκλιση που παρουσιάζει η δομή της πρωτεΐνης σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή, από την αρχική δομή. Μπορούμε σε ένα διάγραμμα, να αναπαραστήσουμε την μεταβολή του RMSD για κάθε στιγμιότυπο της εξισορρόπησης. Αυτά τα στιγμιότυπα περιέχονται στο αρχείο τύπου *.dcd*, και η συχνότητά τους ορίζεται στο script της εξισορρόπησης. Στο δικό μας script ορίστηκε ότι θα καταγράφονται στιγμιότυπα για κάθε 500 βήματα της εξισορρόπησης. Άρα συνολικά έχουμε $500000/500 = 1000$ στιγμιότυπα.

Για να θεωρήσουμε ότι η εξισορρόπηση έχει φτάσει σε ένα ικανοποιητικό σημείο, η μεταβολή του RMSD θα πρέπει να φτάνει σε ένα πλατώ, να σταθεροποιείται δηλαδή γύρω από μία τιμή.

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

στην Tk Console του προγράμματος, αφού προηγουμένως είχαμε φορτώσει το αρχείο:

`min_A-E_all_dock0190.coor` ακολουθώντας τις επιλογές:

New Molecule → *Browse* → *Load* και το αρχείο

`eq_dock0190.dcd` ακολουθώντας τις επιλογές:

Load Data Into Molecule → *Browse* → *Load*.

Τα διαγράμματα με τις μεταβολές του RMSD και για τις τέσσερις διατάξεις της μελέτης μας, παρουσιάζονται παρακάτω στην ενότητα Αποτελέσματα - Συζήτηση.

5. Αποτελέσματα - Συζήτηση

5.1 Ενέργεια αλληλεπίδρασης (Interaction energy) για τις 9 διατάξεις

Όπως αναλυτικά περιγράφηκε στην παράγραφο 4.2, από τις 929 διατάξεις, που προέκυψαν από το docking για την σύνδεση της επικράτειας A1 με την A2, καταλήξαμε σε εννέα με τις οποίες προχωρήσαμε σε ελαχιστοποίηση ενέργειας στο κενό.

Μέσω του VMD υπολογίζουμε την interaction energy των 9 αυτών διατάξεων η οποία φαίνεται στον Πίνακα III.

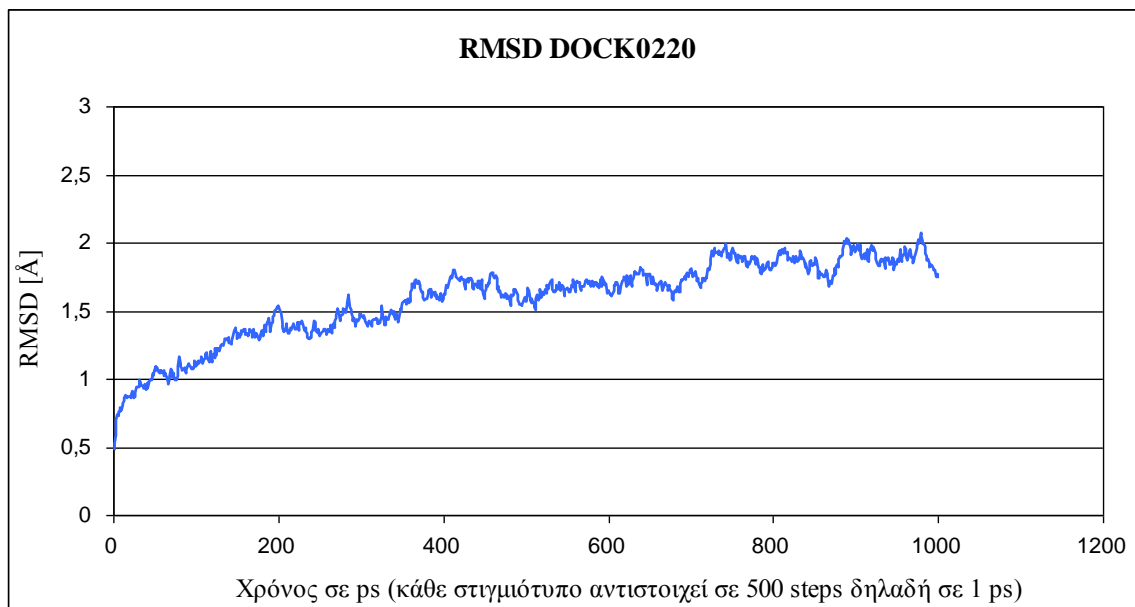
Πίνακας III: Οι 9 διατάξεις με την χαμηλότερη ενέργεια που προέκυψαν μετά το docking.

Διάταξη	Ενέργεια (kJ/mol)
dock_0195	-545,3
dock_0215	-530,8
dock_0220	-572,3 ←
dock_0190	-598,5 ←
dock_0204	-496,9
dock_0008	-513,3
dock_0211	-509,5
dock_0218	-576,4 ←
dock_0219	-570,0 ←

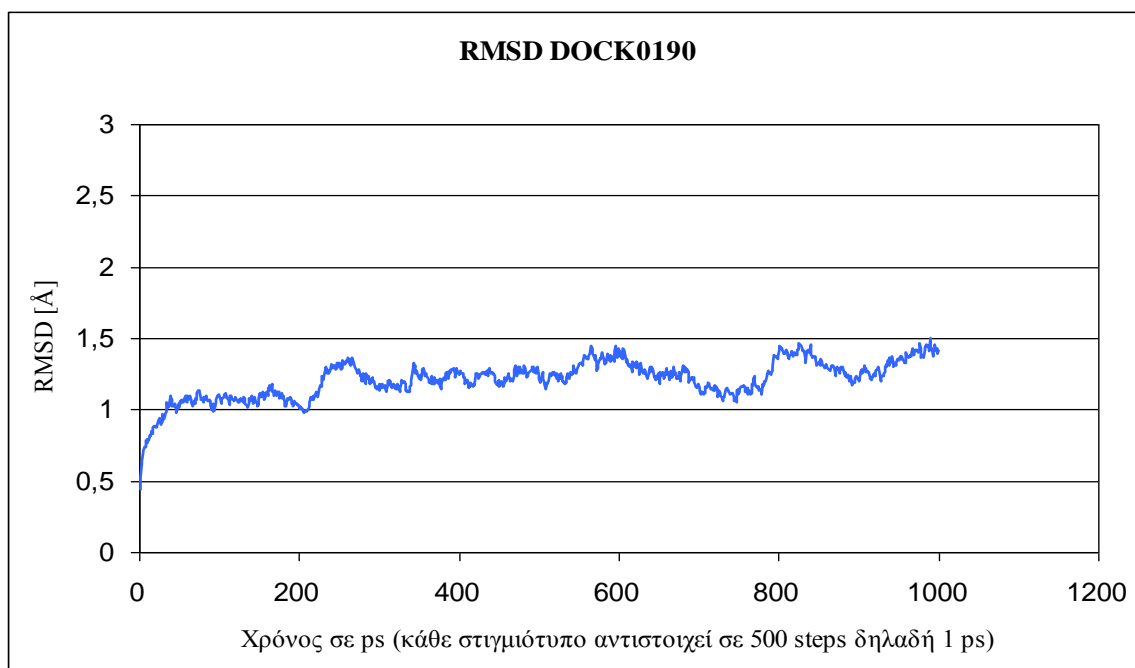
Με ← σημειώνονται οι τέσσερις διατάξεις με τις χαμηλότερες ενέργειες, με τις οποίες προχωρήσαμε σε νέα ελαχιστοποίηση ενέργειας.

5.2 Τα RMSD των εξισορροπήσεων των 4 διατάξεων

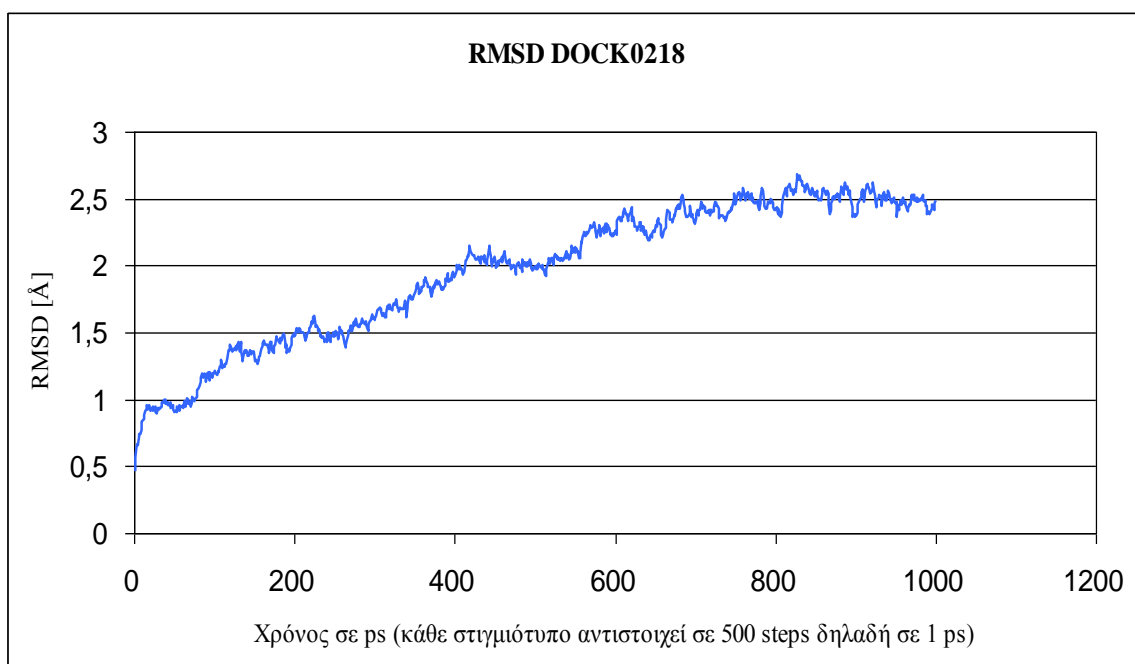
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα διαγράμματα της μεταβολής του RMSD, των στιγμιότυπων της εξισορρόπησης για την κάθε μία από τις τέσσερις επικρατέστερες διατάξεις που προέκυψαν μετά το docking.



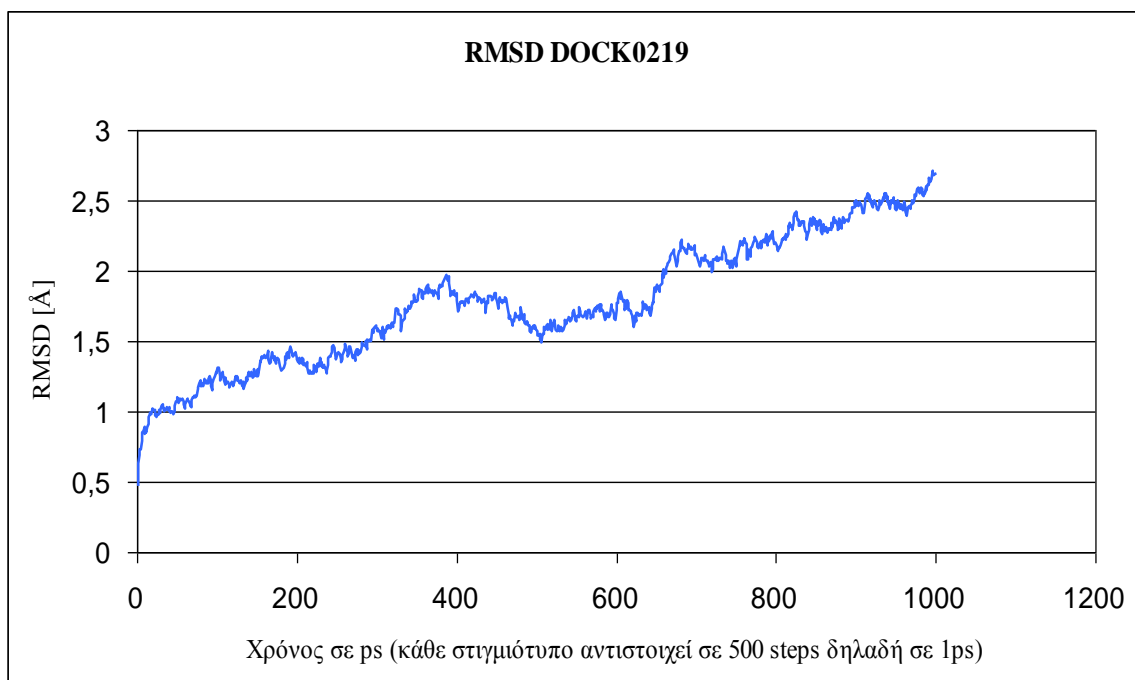
Εικόνα 15: Χρονική εξέλιξη του RMSD για τη διάταξη 0220.



Εικόνα 16: Χρονική εξέλιξη του RMSD για τη διάταξη 0190.



Εικόνα 17: Χρονική εξέλιξη του RMSD για τη διάταξη 0218.



Εικόνα 18: Χρονική εξέλιξη του RMSD για τη διάταξη 0219.

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

5.3 Ενέργεια αλληλεπίδρασης (Interaction energy) των 4 στιγμιοτύπων

Υπολογίζουμε εκ νέου την interaction energy για τις τέσσερις διατάξεις στις οποίες προηγήθηκε εξισορρόπηση ενέργειας ώστε να επιλέξουμε αυτή με την χαμηλότερη ενέργεια ως την πιο πιθανή διάταξη. Αυτή η διάταξη δίνει και τον πιο πιθανό προσανατολισμό με τον οποίο συνδέονται η επικράτεια A1 με την επικράτεια A2 του νWF.

Η διαδικασία είναι η ίδια που περιγράφηκε για την παράγραφο 4.1 και αναφέρεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.2. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα IV.

Πίνακας IV: Οι ενέργειες των τεσσάρων διατάξεων με την χαμηλότερη ενέργεια που επιλέχθηκαν μετά την ελαχιστοποίηση ενέργειας στο κενό.

Διάταξη	Ενέργεια (kJ/mol)
dock_0220	-363,9
dock_0190	-428,2
dock_0218	-419,4
dock_0219	-436,1

Συνοψίζοντας, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η πρόσδεση της A2 στην A1 επικράτεια του νWF και να βρεθεί ο προσανατολισμός εκείνος που δίνει το καλύτερο αποτέλεσμα.

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Hex για το docking οδηγηθήκαμε σε πλήθος πιθανών διατάξεων σύνδεσης της επικράτειας A1 με την A2. Από αυτές επιλέξαμε τις εννέα πιο σταθερές έχοντας σαν κριτήριο την ενέργεια του συστήματος, όπως υπολογίσθηκε από το HEX. Έπειτα, υπολογίσαμε την ενέργεια αλληλεπίδρασης του συστήματος για τις εννέα διατάξεις και διαλέξαμε τις τέσσερις με την μικρότερη ενέργεια για να προχωρήσουμε, με τη βοήθεια των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, σε εξισορρόπηση. Τα διαγράμματα 2, 3, 4 και 5 που παρατίθενται παραπάνω δείχνουν ότι η εξισορρόπηση των συστημάτων έφτασε σε ένα ικανοποιητικό σημείο ώστε να χρησιμοποιήσουμε τα δεδομένα που προκύπτουν από αυτή (αρχείο .coor) για την πορεία της έρευνας. Στην συνέχεια υπολογίσαμε εκ νέου την ενέργεια αλληλεπίδρασης των τεσσάρων επικρατέστερων διατάξεων, η οποία αποτέλεσε και το κριτήριο επιλογής της καταλληλότερης διάταξης.

Με κριτήριο την ενέργεια του συμπλόκου A1-A2 ώστε να επιλεγεί η μία διάταξη ως η πιο πιθανή, η διάταξη με την χαμηλότερη ενέργεια, άρα πιθανότατα και η πιο σταθερή, είναι η dock_0219 όπως φαίνεται και στον πίνακα III. Η διάταξη dock_0219 φαίνεται στην Εικόνα 19 με την βοήθεια του προγράμματος RASMOL.



Εικόνα 19: Η απεικόνιση της επικρατέστερης διάταξης σύνδεσης της επικράτειας A1 με την A2 (dock_0219), μέσω του προγράμματος RASMOL. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η επικράτεια A1 ενώ με κόκκινο η επικράτεια A2. Με κίτρινο χρώμα φαίνονται τα αμινοτελικά άκρα των επικρατειών A1 και A2.

Παράρτημα

To script διαχωρισμού της A1(A) από την A2 (E)

```
# Split a file containing protein, ions and water into  
separate segments.
```

```
# Requires VMD.
```

```
mol load pdb dock_.pdb
```

```
set proteinA [atomselect top "protein chain A"]  
$proteinA writepdb dockA_.pdb
```

```
set proteinE [atomselect top "protein chain E"]  
$proteinE writepdb dockE_.pdb
```

Script για τη δημιουργία των αρχείων A-E.psf, A-E.pdf

```
#package require psfgen  
topology top_all127_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 dockA_0190.pdb  
first none  
last none  
}
```



```

patch DISU A:509 A:695

coordpdb dockA_0190.pdb A

guesscoord

segment E {
pdb dockE_0190.pdb
first none
last none
}
coordpdb dockE_0190.pdb E

guesscoord

writepdb A-E.pdb
writepsf A-E.psf
#resetpsf

```

Script για την ενυδάτωση (solvate)

```

Water Sphere tcl Script

# 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      A-E.psf
set pdb      A-E.pdb
set box      A-E_box
set psfDrop  A-E_ws.psf
set pdbDrop  A-E_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

```

Script για την προσθήκη ιόντων

```

source math.tcl

package require psfgen
package require math

proc additions { newpsf newpdb } {
    topology top_all127_prot_na.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_A-E_ws.psf neutr_A-E_ws.pdb

```

Configuration script για Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (energy minimization)

```
# NAMD CONFIGURATION FILE FOR A1-A2

# protocol params

# initial config
coordinates      A-E.pdb
temperature      300K
seed             12345
outputEnergies   1

# output params
outputname       min_A-E_dock0190
binaryoutput     no

# integrator params
timestep         1.0

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

minimize         3000
```

Configuration script της Εξισορρόπησης

```
#####
### JOB DESCRIPTION
#####
# Short equilibration of min_test.coor_min
#####

## ADJUSTABLE PARAMETERS
#####

structure neutr_A-E_ws.psf
coordinates min_A-E_all_dock0190.coor
set temperature 300
set outputname eq_dock0190
firsttimestep 0
```

```

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

# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na.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 1ps
dcdfreq 500
outputEnergies 100
outputPressure 100

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

# Spherical boundary conditions
sphericalBC on
sphericalBCcenter 15.056 34.416 27.251
sphericalBCr1 50 # distance at which the first boundary
potential begins to act
sphericalBCk1 10 # force constant for the harmonic boundary
potential
sphericalBCexpl 2

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

```

```
# Minimization
#minimize 100
reinitvels $temperature;

run 500000;
```

Script για το rmsd

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

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


Βιβλιογραφία

- [1] J.Emsley, M.Cruz, R.Handin, R.Liddington, Crystal structure of the von willebrand factor a1, *J. Biol. Chem.* 1998;273:10396
- [2] Qing Zhang, Yan-Feng Zhou, Cheng-Zhong Zhang, Xiaohui Zhang, Chafen Lu, and Timothy A. Springer, Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. 2009;106:9226–9231
- [3] Von Willebrand EA. Über hereditäre Pseudohämophilie. *Acta Medica Scandinavica.* 1926;76:521-549, Von Willebrand EA, Jürgens R. Über ein neues vererbbares Blutungsübel: die konstitutionelle Thrombopathie. *Dtsch Arch Klin Med.* 1933;175:453-483
- [4] Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry.* 1986;25:3171-3184
- [5] Matsushita T, Dong Z, Sadler JE. Von Willebrand's factor and von Willebrand's disease. *Curr Opin Hematol.* 1994;1:362-368
- [6] Wagner DD, Saffaripour S, Bonfanti R, Sadler JE, Cramer EM, Chapman B, Mayadas TN. Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propolypeptide. *Cell.* 1991;64:403-413
- [7] Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN: Hemostasis and Thrombosis – Basic principles & clinical practice. 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins 2001, ISBN 0-7817-1455-9, Chapter 14: Structure and function of von Willebrand factor. Montgomery RR, p253
- [8] Tsai, H.M. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996;87:4235-4244
- [9] Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2008; 112: 11-18, Ruggeri ZM. Von Willebrand factor: Looking back and looking forward. *Thromb Haemost.* 2007;98:55-62
- [10] Celikel R, Varughese KI, Madhusudan, Yoshioka A, Ware J, Ruggeri ZM. Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain in complex with the function blocking NMC-4 Fab. *Nature Struct Biol.* 1998;5:189-194
- [11] Emsley J, Cruz M, Handin R, Liddington RC. Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 1998;273:10396-10401
- [12] Sixma JJ, Schiphorst ME, Verweij CL, Pannekoek H. Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin. *Eur J Biochem.* 1991;196:369-375
- [13] Roth GJ, Titani K, Hoyer LW, Hickey MJ. Localization of binding sites within human von Willebrand factor for monomeric type III collagen. *Biochemistry.* 1986;25:8357-8361

- [14] Hoylaerts MF, Yamamoto H, Nuyts K, Vreys I, Deckmyn H, Vermynen J. Von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochem J.* 1997;324:185-191
- [15] Hoylaerts MF, Nuyts K, Peerlinck K, Deckmyn H, Vermynen J. Promotion of binding of von Willebrand factor to platelet glycoprotein Ib by dimers of ristocetin. *Biochem J.* 1995;306:453-463
- [16] Fujimura Y, Holland LZ, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. The von willebrand factor domain-mediating botrocetin induced binding to glycoprotein IB lies between Val449 and Lys728. *Blood.* 1987;70:985-988
- [17] Matsui T, Hamako J, Matsushita T, Nakayama T, Fujimura Y, Titani K. Binding site on human von Willebrand factor of bitiscetin, a snake venom-derived platelet aggregation inducer. *Biochemistry.* 2002;41:7939-7946
- [18] Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, et al. A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1987;262:1734-1739
- [19] Christophe O, Obert B, Meyer D, Girma J-P. The binding domain of von Willebrand factor to sulfatides is distinct from those interacting with glycoprotein Ib, heparin, and collagen and resides between amino acid residues Leu 512 and Lys 673. *Blood.* 1991;78:2310-2317
- [20] Data RE, Williams SB, Roberts DD, Gralnick HR. Platelets adhere to sulfatides by von willebrand factor dependent and independent mechanisms. *Thromb Haemost.* 1991;65:581-587
- [21] Sugimoto M, Mohri H, McClintock RA, Ruggeri Z. Indification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with botrocetin. *J. Biol. Chem.* 1991;266:18172-18178
- [22] Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, et al. von Willebrand Factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 1986;261:381-385
- [23] Mohri H, Yoshioka A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Isolation of the von Willebrand factor domain interacting with platelet glycoprotein Ib, heparin, and collagen and characterization of its three distinct functional sites. *J. Biol. Chem.* 1989;264:17361-17367
- [24] Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factorcleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* 2001;276:41059-41063
- [25] Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factorcleaving protease. *Blood.* 2001;98:1654-1661
- [26] Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, Lopez-Otin C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene.* 2002;283:49-62
- [27] Sadler JE. A revised classification of von willebrand disease. *Thromb Haemost.* 1994;71:520-525

- [28] Chow TW, Turner NA, Chintagumpala M, et al. Increased von Willebrand factor binding to platelets in single episode and recurrent types of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 1998;57:293-302
- [29] 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;103:19099-19140
- [30] Furlan M., Robles R. and Lammle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996;87:4223-4234
- [31] Majerus, E.M., Anderson, P.J. and Sandler, J.E. Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 2005;280:21773-21778
- [32] Ai, Smith P., Wang, Zhang, Zheng. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem* 2005;280:29428-29434
- [33] Majerus EM, Zheng x, Tuley EA, Sandler JE. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *J. Biol. Chem.* 2003;278: 46643-46648
- [34] Usami Y, Fujimura Y, Suzuki M, et al. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *PNAS.* 1993;90:928-932
- [35] Fujimura Y, Titani K, Usami Y, et al. Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry.* 1991;30:1957-1964
- [36] Sen U, Vasudevan S, Subbarao G, et al. Crystal Structure of the von Willebrand Factor Modulator Botrocetin. *Biochemistry.* 2001;40:345-352
- [37] Matsushita T, Meyer D, Sadler JE. Localization of von willebrand factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 2000;275:11044-11049
- [38] Huizinga EG, Schouten A, Romijn RAP, et al. Crystal structures of snake venom botrocetin and its complex with the von Willebrand Factor A1 domain [abstract]. *Thromb Haemost.* 2001:Abstract OC80
- [39] David. W. Ritchie. Evaluation of Protein Docking Predictions using Hex 3.1 in CAPRI rounds 1-2, , *Proteins, Structure, Function and Genetics* 2003;52:98-106
- [40] D.W. Ritchie & G.J.L. Kemp. Protein Docking Using Spherical Polar Fourier Correlations. , *Proteins, Structure, Function and Genetics* 2000;39:178-194
- [41] The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research.* Oxford University Press. 2000;28:235-242
- [42] VMD User's Guide, Version 1.8.6 , Theoretical and Computational Biophysics Group1, University of Illinois and Beckman Institute, http, April 3, 2007

- [43] NAMD User's Guide, , M. Bhandarkar, R. Brunner, C. Chipot, A. Dalke, S. Dixit, P. Grayson, J. Gullingsrud, A. Gursoy, D. Hardy, J. H'enin, W. Humphrey, D. Hurwitz, N. Krawetz, S. Kumar, M. Nelson, J. Phillips, A. Shinozaki, G. Zheng, F. Zhu. Theoretical Biophysics Group. University of Illinois and Beckman Institute. 2006
- [44] Michael P. Allen, Computational Soft Matter. From Synthetic Polymers to Proteins, Lecture Notes, Norbert Attig, Kurt Binder, Helmut Grubmuller, Kurt Kremer (Eds.), John von Neumann. Introduction to Molecular Dynamics Simulation. Institute for Computing, Jeulich, NIC Series. 2004;23:1-28
- [45] <http://staff.science.nus.edu.sg/~phywjs/lecture-notes/cpnote3.pdf>
- [46] Jarosaw Meller, Molecular Dynamics, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / April 19 2001 Nature Publishing Group / www.els.net
- [47] NAMD tutorial, University of Illinois at Urbana-Champaign, NIH Resource for Macromolecular Modelling and Bioinformatics, Beckman Institute, Computational Biophysics Workshop, October 2007
- [48] Auton, M. Cruz M.A. and Moake, J. Conformational stability and domain unfolding of the Von Willebrand factor A domains. J. Mol. Biol. 2007;366:986-1000
- [49] Tadashi Matsushita, Dominique Meyer, and J. Evan Sadler, Vol. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in U.S.A, Issue of April 14 2000;275:11044–11049
- [50] Birte Fuchs, Structure-function relationship of von Willebrand factor, February 2009
- [51] <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2003-0714-123214/c1.pdf>
- [52] Sen U, Vasudevan S, Subbarao G, et al. Crystal Structure of the von Willebrand Factor Modulator Botrocetin. Biochemistry. 2001;40:345-352
- [53] Graham R Smith and Michael JE Sternberg, Prediction of protein-protein interactions by docking methods, Current Opinion in Structural Biology 2002;12:28–35
- [54] <http://www.cs.princeton.edu/courses/archive/fall05/cos597A/lectures/proteindocking.pdf>
- [55] Aatu Kaapro and Janne Ojanen, Protein docking, November 27, 2002
- [56] Manhold R., Kubinyi H., Timmerman H. Bioinformatics-From Genomes to Drugs. Wiley-VCH, 2001
- [57] Metropolis N., Rosenbluth A. W., Rosenbluth M. N., Teller A. H. ,Teller E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. Journal of Chemical Physics, 1953;21:1087–1092