

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ELEKTROTEHNIKE I RAČUNARSTVA

SEMINAR

Algoritmi za otkrivanje hinge regija na proteinima

Tihana Oković

Voditelj: *Krešimir Šikić*

Zagreb, svibanj, 2007.

Sadržaj

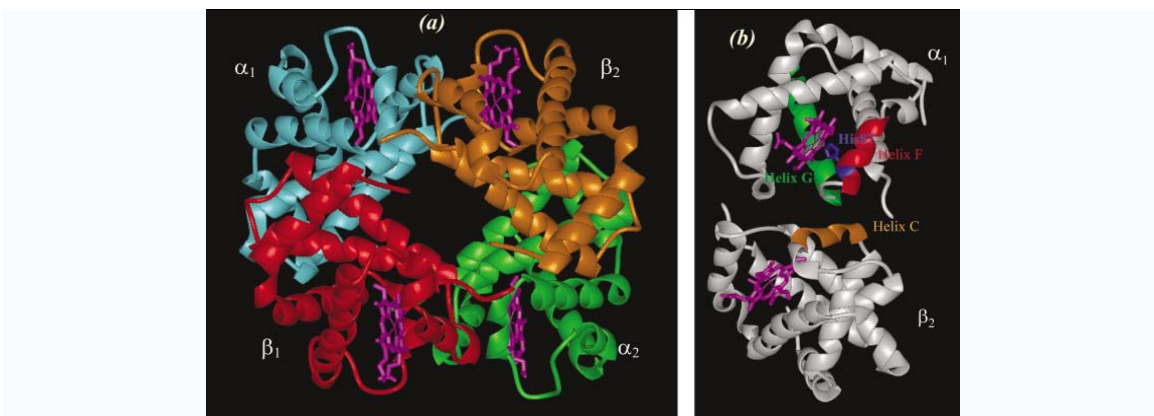
1. Uvod.....	3
2. Seminarski rad	4
3. Zaključak.....	15
4. Literatura.....	16
5. Sažetak	17

1. Uvod

Za početak ovoga seminara trebala bih prvo odgovoriti na dva važna pitanja. Prvo pitanje je: Zašto ljude uopće zanima struktura i funkcioniranje proteina?

Jedan od važnijih razloga je dizajniranje novih lijekova, koje je vrlo aktivno polje istraživanja. Jedan od načina kreiranja lijeka je taj da se zaustavi prijelaz u zaraženo stanje sprječavanjem funkcioniranja neke ključne molekule. Lijekovi mogu biti dizajnirani tako da se vežu na aktivne regije ciljanih molekula i time spriječe njihovo djelovanje. Kako bi se ovako nešto moglo ostvariti potrebno je poznavati strukturu proteina. Stoga je predviđanje strukture proteina postalo jedna od najznačajnijih tehnologija kojima se bave računalna strukturalna biologija i teoretska kemija.

Drugo pitanje je: Što su uopće hinge regije? Budući su proteini veoma fleksibilne molekule, pokrete proteina dijelimo na posmačne, te na hinge (zglobne) pokrete. Dok su posmačni pokreti veoma ograničeni i uključuju velik broj residua, hinge pokreti su slični rotacijama oko zglobnih spojeva. Karakteriziraju ih velike promjene torzionih kuteva glavnog lanca na lokaliziranim regijama zvanim hinge regijama. Hinge pokreti uključuju mali broj residua, budući čak samo jedna veza može pružiti odgovarajuću rotacijsku slobodu. Hinge pokreti se obično javljaju prilikom aktivacije i deaktivacije proteina ili prilikom vezanja druge molekule. Pronalaženje hinge regija opisati ću na primjeru molekule hemoglobina (Slika 1.) i njezinih prijelaza između vezanih i nevezanih stanja.



Slika 1.

Pronalaženje hinge regija na proteinu demonstrirano je na primjeru hemoglobina.

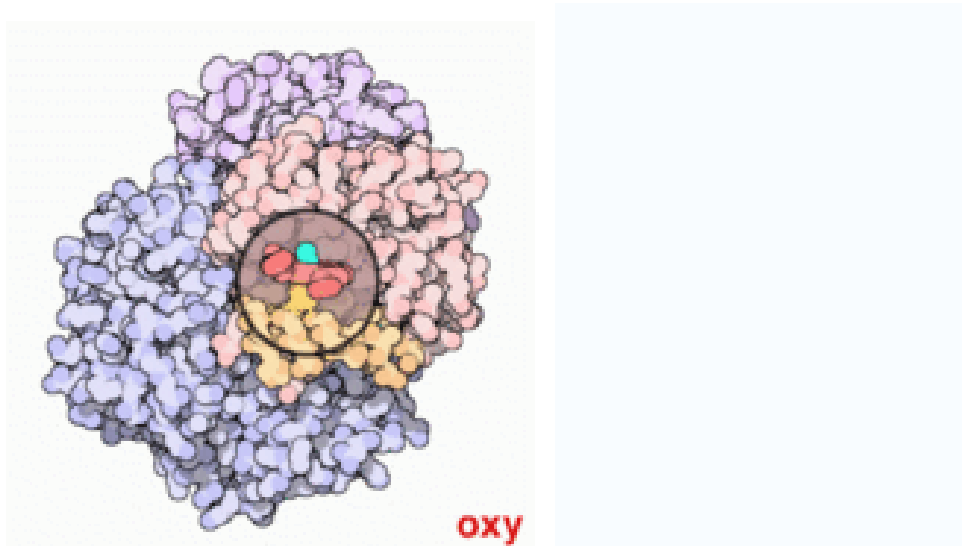
(a) Vrpčasti dijagram Hb tetramera, četiri monomera α_1 , β_1 , α_2 i β_2 prikazana su plavom, zelenom, crvenom i narančastom bojom respektivno, a četiri heme grupe prikazane su ljubičasto. (b) α_1 i β_2 poddijelovi, te sekundarni strukturalni elementi koji se mijenjaju prilikom prijelaza iz nevezanog u vezano stanje (T→R2)

2. Seminarski rad

Informacije o dinamici proteina su uglavnom dobivene spektroskopskim analizama dijelova proteina, ili indirektno, uspoređivanjem različitih konformacija (oblika) proteina nastalih u prisutnosti različitih substrata ili liganada. Iako molekularne simulacije pružaju i uvid u dinamiku proteina, one uglavnom nemogu potpuno ispitati konformacijske prostore proteina, te postaju relativno skupe u istraživanju ukupne dinamike velikih makromolekularnih struktura.

Za istraživanje dinamike, uzela sam kao primjer dobro poznati alosterični protein, hemoglobin (Hb). Na primjeru tog proteina može se vidjeti kako jednostavni mehanički model, baziran na Gausovim fluktuacijama residua, može uspješno predvidjeti tranziciju između nevezanog (T, tense, unliganded) stanja i vezanog (relaxed, R ili R2, R kad veže kisik, a R2 kad veže ugljični monoksid) stanja hemoglobina. Glavna razlika u dinamici između T i R2 forme je gubitak savijajuće (hingebending) uloge $\alpha 1-\beta 2$ (ili $\alpha 2-\beta 1$) na graničnim (veznim) rezidualnim dijelovima α Phe36 - His45 i

β Thr87 – Asn102 u R2 formi, što pokazuje smanjenu kooperativnost u R2 formi hemoglobina. Prisutstvo proksimalnog histidina β His99 u ovoj hinge regiji implicira, da se alosterička propagacija lokalnih strukturalnih promjena (uzrokovanih vezivanjem kisika) u globalne promjene, događa zbog hinge regija. Postoji intrinzična tendencija hemoglobina da podlijegne T→R2 tranziciji, uzrokovana samo elastičnim silama entropijskog porijekla, koje su jedinstveno definirane za posebnu kontaktnu topologiju nevezane (T) forme.



Slika 2.

Vezivanje i otpuštanje liganada uzrokuje konformacijske (strukturalne) promjene u hemoglobinu. Slika prikazuje vezivanje molekule kisika. Crvenom bojom u krugu prikazana je samo jedna od četiri heme grupe na hemoglobinu koja je na sebe vezala molekulu kisika (plavi kružić).

Studije o hemoglobinu, proteinu nosiocu kisika u crvenim krvnim stanicama, znatno su pridonjele razumijevanju molekularnih mehanizama pri alosteričnim reakcijama uopće, te i dalje služe kao model pri razumijevanju uloge unutarmolekularnih interakcija u funkcionalnoj kooperativnosti.

Normalni odrasli ljudski hemoglobin (HbA) sastoji se od četiriju poddijelova sličnih trodimenzionalnih struktura. To su dva identična α -lanca, oba sastavljena od po 146 aminokiselina, nazvati ćemo ih α_1 i α_2 poddijelovima, te od dva identična β -lanca, β_1 i β_2 , sastavljena od po 146 aminokiselina. Svaki od tih poddijelova ima jedan "džepić" koji veže kisik. Proces oksigenacije je kooperativan, tj. vezivanje prve molekule kisika, povećava afinitet prema daljnjem vezivanju, što dokazuje smanjenje slobodne energije, primjećeno kod dvostruke O_2 veze. Postoje dva klasična modela preporučena za opisivanje alosteričnih mehanizama u hemoglobinu, MWC usklađeni model i KNF sekvencijalni model. MWC model pretpostavlja da nevezane (T) i vezane (R) forme tetramera koegzistiraju i obje mogu vezati kisik. U nedostatku kisika dominira nevezana (T) forma. Vezivanjem kisika stabilizira se vezana (R) forma, te dolazi do dominacije vezanog hemoglobina. KNF model dozvoljava koegzistiranje vezanog i nevezanog oblika hemoglobina, te svaki poddio može individualno proći promjenu iz vezanog u nevezani oblik. Svojom promjenom, taj poddio, mijenja afinitete susjednih dijelova zbog interakcija na veznim (graničnim) dijelovima.

Treća konformacija hemoglobina (R2) nastaje vezivanjem ugljičnog monoksida, te je slična konformaciji koja nastaje vezivanjem kisika.

Molecular dynamics (MD) simulacije mogu pružiti potpuniji opis konformacijskih promjena. Jedno nedavno važno istraživanje je MD simulacija prijelaza hemoglobina iz nevezanog u vezano (T→R) stanje. U ovoj tehnici MD putanja (trajectory) ne istražuje najvjerojatnije prijalaze, nego podskupove prijelaza koji ispunjavaju ograničenja. Početna i konačna konformacija su unaprijed definirane, kao i potencijal koji natjera molekulu prema finalnoj konformaciji.

Bogatstvo teoretskih i eksperimentalnih istraživanja pruža dokaze o uskoj povezanosti između dinamike i funkcioniranja. Dvije računalne tehnike najčešće korištene za karakteriziranje kolektivne dinamike, te za rasvjetljivanje dominantnih modova (modes) gibanja koji su obično vezani uz funkcionalne mehanizme, su NMA (Normal Mode Analysis) and EDA (Essential Dynamics Analysis).

NMA aproksimira energetska polje atoma harmonijskim modelom, te daje oblike i frekvencije 3N-6 normalnih modova (stanja) koji

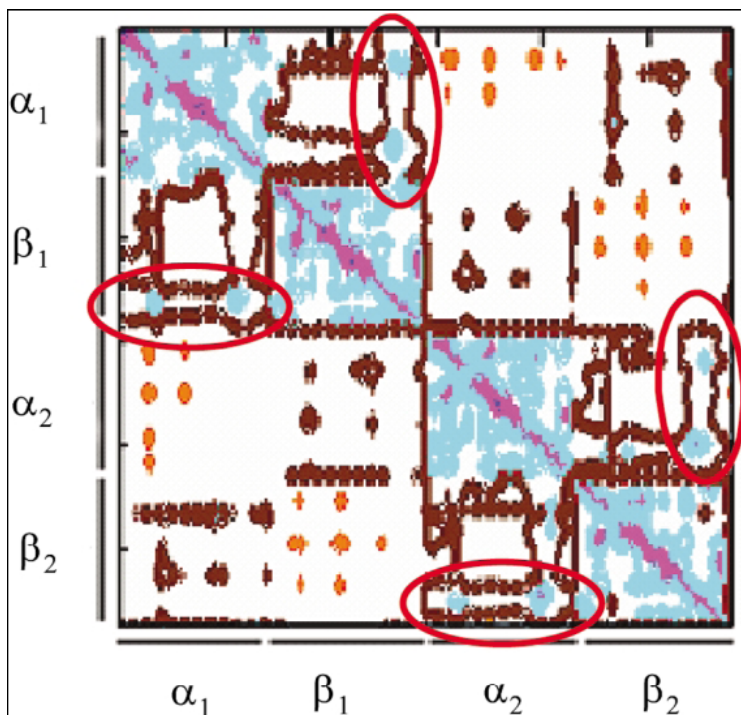
čine temelj kolektivne dinamike. EDA, s druge strane, rastavlja kovarijabilnost matrice C, izvađene iz MD simulacija, kako bi rekonstruirala kretanje duž glavnih koordinata.

Treći pristup razmatra niz snimaka konformacija, napravljenih u fiksnim vremenskim intervalima, koje su zatim projicirane na skup kolektivnih koordinata tehnikom dekompozicije singularnih vrijednosti (singular value decomposition technique). Tu koristimo jednostavnije, isključivo mehaničke, modele To su GNM (Gaussian Network Model), te njegova inačica, ANM (Anisotropic Network Model). GNM promatra strukture kao elastične mreže, čija su čvorišta obično α – ugljični atomi. Identična gibanja povezuju “residue u međudjelovanju”, to jest parove čvorova koji se nalaze bliže od određene granične udaljenosti. GNM kretanja su uzrokovana sa N-1 modova (oblika). ANM, ekstenzija GNM-a u 3D oblik, ima 3N-6 modova i pruža nam saznanja o usmjerenosti. ANM možemo promatrati i kao grublju verziju NMA, sa homogenim izvorišnim konstantama. ANM posjeduje četiri prednosti nad NMA. Kao prvo, sposobnost procjenjivanja gibanja kod neprisutstva funkcija energije i parametara, zatim matematičku jednostavnost, mogućnost obavljanja analize sa strukturama slabe rezolucije ili malo dodirnih podataka, te učinkovitu primjenjivost na velike strukture, složene cjeline ili grupacije. ANM metoda neosjetljiva je na atomske detalje, što također podupire uporabu ove jednostavne metode. Glavni nedostaci su to što se globalni energetska minimum aproksimira kvadratnim izvorom (quadratic well), te proizlazeće pretpostavke gibanja koje se događaju samo unutar tog globalnog izvora. Tranzicije preko energetskih granica stoga se nemogu predvidjeti bez izgađivanja grubih opisa strukture i energija.

Primjenjujući GNM i ANM metode možemo pokazati kako je prijelaz hemoglobina iz nevezane u vezanu formu (T→R) uzrokovan globalnim kretanjima u tetrameru. To razjašnjava zašto lokalne strukturalne promjene, uzrokovane vezanjem kisika, mogu uzrokovati alosteričke reakcije. Molekula je mehanički predodređena da podlijegne toj partikularnoj konformacijskoj promjeni. Vezanje kisika poremeti poziciju proksimalne β His92, koja se podudara sa globalnom hinge regijom, te potiče konformacijsku promjenu.

Dakle, nevezana forma posjeduje entropijsku tendenciju da prijeđe u vezano stanje, dok suprotna tranzicija iz vezanog u nevezano stanje (R2→T) nije ostvariva bez dovođenja određene količine energije.

Primjenom GNM metode dobivena je mapa korelacije za nevezanu formu hemoglobina. Residui unutar svakog poddjelova su veoma povezani, što pokazuju kvadratni blokovi smješteni na dijagonali. Drugim riječima, svaki pojedini poddio $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ i $\beta 2$ podvrgnut je koherentnim, skoro rigidnim pokretima po bloku. Uz grupiranja unutar poddjelova, zamjećuju se i spajanja između poddjelova $\alpha 1$ i $\beta 1$, te $\alpha 2$ i $\beta 2$. To znači da postoji hijerarhijsko grupiranje, prvo unutar monomera, a zatim unutar dimera $\alpha 1\beta 1$ i $\alpha 2\beta 2$, što je konzistentno sa viđenjem tetramera kao dimera od dva kooperativna $\alpha\beta$ dimera. Na slici, regije zaokružene crveno prikazuju korelirane parove $\alpha 1(27-37)$ i $\beta 1(115-132)$, te $\alpha 2(100-117)$ i $\beta 2(107-127)$ koji uspostavljaju grupiranje među monomerima koji formiraju dimere $\alpha 1\beta 1$ i $\alpha 2\beta 2$. Poddjelovi $\alpha 1$ i $\alpha 2$ su pak antikorelirani ($C_{ij} < 0$), kao i poddjelovi $\beta 1$ i $\beta 2$.



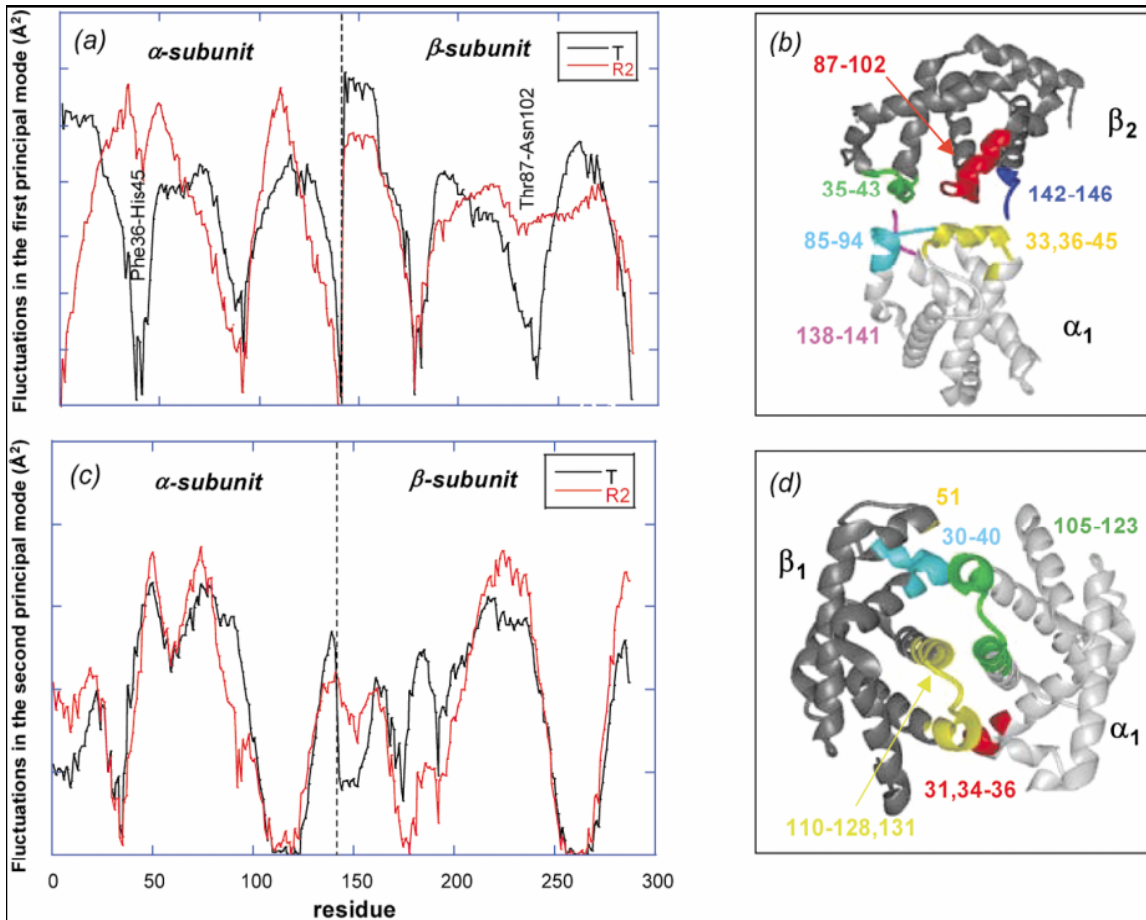
Slika 3.

Korelacijska mapa za nevezani (T) oblik hemoglobina. Na osima su popisani residui. Ljubičasti dijelovi prikazuju jaku koreliranost, plavi koreliranost ($C_{ij} > 0$), smeđi nekoreliranost ($C_{ij} \approx 0$) i narančasti su antikorelirani parovi ($C_{ij} < 0$). Plavi blokovi označavaju pozitivno korelirane dijelove (unutrašnje korelacije α_1 , β_1 , α_2 i β_2 domena), dok plavi dijelovi zaokruženi crveno označavaju međudomenske korelacije među poddijelovima α_1 i β_1 , te α_2 i β_2 . Antikorelacijska kretanja primjećuju se kod poddijelova $\alpha_1 - \alpha_2$, te $\beta_1 - \beta_2$.

Globalna kretanja određena hinge dijelovima proteina na $\alpha_1 - \alpha_2$, te $\beta_1 - \beta_2$ poveznici

Globalna dinamika nevezane (T) forme

Dva α -lanca posjeduju slične karakteristike, što vrijedi i za dva β -lanca. Na slici 4(a) prikazan je oblik trome metode za jedan od α i β poddijelova. Za svaki od poddijelova vidljiva su tri minimuma. Na α -lancu to je na residuima 33, 36-45, 85-94 i 138-141, a na β -lancu na dijelovima 35-43, 87-102 i 142-146. Ti minimumi predstavljaju globalne savijajuće (hinge-bending) dijelove tetramera. Ispitivanjem strukture tetramera, vidljivo je da se ti residui nalaze na α_1 - β_2 (ili α_2 - β_1) graničnim dijelovima. Unakrsne korelacije u globalnom obliku pokazuju da se α_1 i β_1 poddijelovi gibaju duž istog glavnog smjera, a α_2 i β_2 gibaju se usklađeno, ali suprotnim smjerovima, poštujući pritom dimer $\alpha_1\beta_1$. Sve ove observacije usklađene su sa blokovskim gibanjem dimera $\alpha_1\beta_1$ srodnog sa $\alpha_2\beta_2$, kojeg koordiniraju hinge dijelovi (minimumi na global mode shape) na graničnim dijelovima α_1 - β_2 i β_1 - α_2 .



Slika 4.

(a) Distribucija ms fluktuacija uzrokovanih globalnim modelom gibanja.

Rezultati su prikazani za nevezani (T) HbA i za HbA koji je vezao ugljični monoksid (R2). Maksimumi označavaju fleksibilne regije, a minimumi hinge regije proteina. Uspoređujući sa nevezanim (T) oblikom, primjećujemo da dva minimuma na $\alpha 36-45$ i $\beta 87-102$ nestaju u vezanoj (R) formi, što upućuje na opuštanje ili relaksaciju, a time i na nemogućnost mehaničkog funkcioniranja hinge regija. Dinamika α i β poddjelova veoma je slična u nevezanoj formi, dok je u vezanoj (R2) formi različita.

(b) Hinge regije najsporijeg modela odgovaraju $\alpha 1\beta 2$ granici. Prikazani su $\alpha 1\beta 2$ poddjelovi samo za nevezani (T) oblik. Obojeni dijelovi predstavljaju hinge regije proteina.

(c) Oblik drugog najsporijeg modela. Minimumi odgovaraju hinge regijama na spojevima $\alpha 1-\beta 1$ i $\alpha 2-\beta 2$.

(d) Hinge regije prikazane za vezanu (R2) formu hemoglobina.

Usporedba dinamike nevezane (T) i vezane (R2) forme

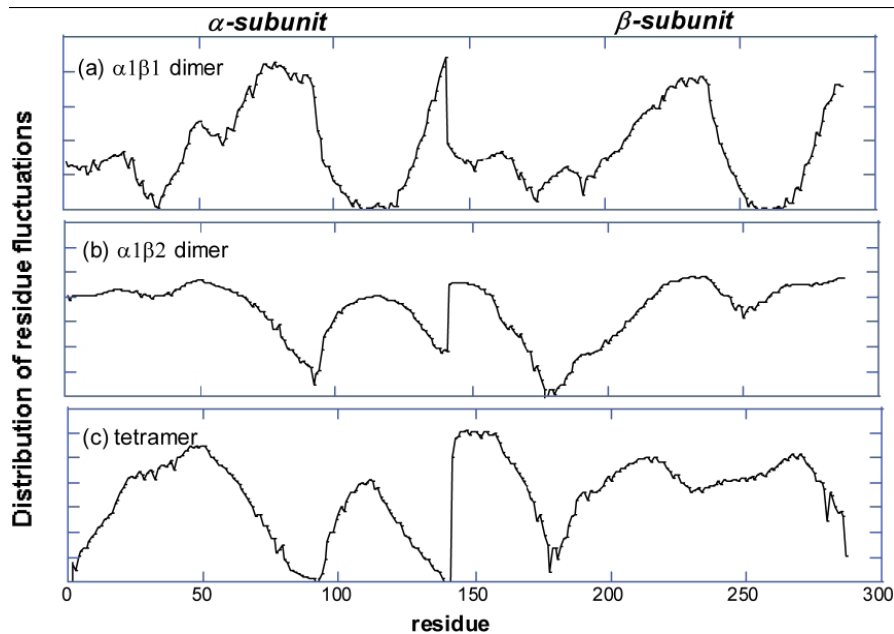
Najveća razlika između oblika globalnih modela tih dviju formi je u promjeni mobilnosti residua, α Phe36-His45 i β Thr87-Asn102, vezane (R2) forme (Slika 4(a)). Ti segmenti točno određuju takozvanu switch regiju na α 1- β 2 poveznici (Slika 4(b)). Prvi model tetramera stoga direktno interferira sa savijajućom (hinge-bending) ulogom switch regija α 1- β 2 i α 2- β 1 poveznicama. Još jedna razlika je u N-završetcima α -lanaca koji su fleksibilni u T, a ograničeni u R2 formi.

Allosteričke promjene uzrokovane hinge regijom i implikacija različite dinamike switch residua u dvije forme

Pažnju trenutnih istraživanja privlače dva poteza rezidua α 36-45 i β 87-102 na α 1- β 2 i α 2- β 1 poveznicama. Oni podliježu jakoj promjeni u dinamici, od veoma ograničenog (T forma), do fleksibilnog (R2 forma) ponašanja. Činjenica da β 87-102, na kojeg direktno utječe vezivanje kisika, preuzima hinge ulogu u globalnoj dinamici, sugerira da lokalne strukturalne promjene prelaze u globalne zbog hinge regija. Također, činjenica da ti residui gube svoju hinge ulogu u R formi omogućava efikasno sprečavanje većeg širenja gibanja duž poddijelova α 1 i β 2 (ili α 2 i β 1) i objašnjava smanjenu kooperativnost R forme.

Globalna dinamika tetramera upravljana dinamikom α 1 β 2 dimera

U T formi, dinamika α i β poddijelova pokazuje slične karakteristike (Crna krivulja na slici 4(a)). Dok se u R2 formi razlikuju (slika 4(a), crvena krivulja) zbog opuštanja α 36-45 i β 87-102 na α 1 β 2 (ili α 2 β 1) poveznici. Promjena dinamike na ovom interakcijskom dijelu, čini se, kontrolira kvaternarnu strukturnu dinamiku. Kako bi se udgovorilo na pitanje, do koje mjere interakcije na poveznicama α 1- β 2 (ili α 2- β 1) kontroliraju dinamiku tetramera, napravljena je GMA analiza pojedinih α i β poddijelova, te dimera α 1 β 1 i α 1 β 2 (ili α 2 β 2 i α 2 β 1). Dinamike poddijelova bile su skoro jednake kada su bili analizirani kao pojedinačni poddijelovi. Dimeri α 1 β 1 (slika 5(a)), razmatran pojedinačno, također je pokazao zanemarive razlike globalnog modela α i β poddijelova. Različita dinamika α i β poddijelova mogla je biti zamijećena jedino analizom α 1 β 2 (ili α 2 β 1) dimera) (usporedba slike 5(b) i (c)). To potvrđuje da je interakcija između α 1 i β 2 glavna odrednica dinamike tetramera, te pokazuje da je kooperativno vezivanje kisika uzrokovano α 1- β 2 (i α 2- β 1) interakcijama.



Slika 5.

Usporedba prvog glavnog modela R2 tetramera (c) sa $\alpha 1\beta 1$ (a) i $\alpha 1\beta 2$ (b) dimerima. Koordinate za R2 tetramer, $\alpha 1\beta 1$ dimer ili $\alpha 1\beta 2$ dimer R2 forme, korištene su za izračunavanje kvadratne fluktuacije upravljane sporijim modom. Primjećujemo da na $\alpha 1\beta 1$ dimeru, dinamika α -poddijela slična je dinamici β -poddijela, dok je kod $\alpha 1\beta 2$ dimera, dinamika α -poddijela veoma različita od dinamike β -poddijela. Profili $\alpha 1\beta 2$ dimera i R tetramera su veoma slični, što upućuje da je oblik globalnog modela tetramera većinski kontroliran oblikom globalnog modela $\alpha 1\beta 2$ dimera.

Drugi mod

Značaj

Dok prvi GNM mod obično definira kooperativne i funkcionalne konformacijske promjene, drugi mod u nekim slučajevima ima suprotnu ulogu, te može biti značajan u ispitivanju vezanih gibanja kao još jednog mehanizma kojeg preferira tetramerna arhitektura. Doprinos drugog moda dinamici hemoglobina slabiji je od doprinosa prvog moda za faktor veličine 2. Ovaj mod kontrolira relativna kretanja dimera $\alpha 1\beta 2$ i $\alpha 2\beta 1$ u nevezanoj (T) formi hemoglobina, te $\alpha 1\alpha 2$ i $\beta 1\beta 2$ u R2 formi. Slika 4(c) pokazuje fluktuacijsko ponašanje α i β poddjelova u ovom modu, a slika 4(d) prikazuje regije koje postaju savijajući (hinge-bending) centri (minimumi na slici 5(c)). Svi se oni nalaze na $\alpha 1$ - $\beta 1$ (ili $\alpha 2$ - $\beta 2$) poveznici. O ulozi $\alpha 1$ - $\beta 1$ poveznice u alosteričnosti hemoglobina još uvijek se raspravlja.

Materijali i metode

GNM

U GNM modelu struktura se vidi kao EN. Svaki čvor predstavljen je jednim residuom, a za parove residua lociranih unutar granične udaljenosti, r_c , se podrazumijeva da su spojeni elastičnim vezama. Hemoprotein je modeliran uzimanjem reprezentativnog uzorka atoma koji imaju istu razinu rezolucije kao i on, koristeći atomske koordinate hemoproteina u PDB–strukturama. Kalkulacije su neosjetljive na uključenje ili isključenje malih molekula (kao što su O_2 ili CO) . Razlika u dinamici formi vezanih oblika uzrokovana je deformacijom koordinata atoma tetramera, a ne toliko izravnim uključivanje tih malih molekula. Konstanta elastičnosti γ (gama) usvojena je za sve parove. Dinamika mreže je potpuno definirana topologijom interesidualnih kontakata, ili Kirchhoffovom matricom Γ , zvanom matricom susjedstva u teoriji grafova.

Za mrežu od N interagirajućih lokacija. Elementi matrice su definirani kao:

$$\Gamma_{ij} = \begin{cases} -1 & \text{if } i \neq j \text{ and } R_{ij} \leq r_c \\ 0 & \text{if } i \neq j \text{ and } R_{ij} > r_c \\ -\sum_{i \neq j} \Gamma_{ij} & \text{if } i = j \end{cases} \quad (1)$$

Gdje je R_{ij} razmak između lokacija i i j (dobiven kristalografijom X – zraka, NMR-om ili EM-om). Granični razmak od 7 \AA usvojen je u GNM izračunima. Γ prenosi isti tip informacija kao i uobičajene mape veza. Elementi Γ matrice koji nisu na dijagonali i različiti su od nule označavaju interagirajuće parove, a i -ti dijagonalni element matrice jednak je koordinacijskom broju i -tog dijela.

Vjerojatnosti distribucije u ΔR_i i odgovarajuća slobodne energija entropijskog porijekla dane su izrazima :

:

$$W(\Delta R_i) = \exp\{-3(\Delta R_i)^2/2((\Delta R_i)^2)\} \quad (2)$$

$$\Delta G_i = -T\Delta S_i = k_B T \ln W(\Delta R_i)$$

gdje je k_B Boltzmanova konstanta, T apsolutna temperatura i $((\Delta R_i)^2)$ je ms fluktuacija residualnog dijela i . Korelacije $(\Delta R_i \cdot \Delta R_j)$ između ΔR_i i ΔR_j dobivenei su iz statističkog mehaničkog prosjeka:

$$\langle \Delta R_i \cdot \Delta R_j \rangle = (1/Z_N) \int (\Delta R_i \cdot \Delta R_j) e^{-V/k_B T} d(\Delta R)$$

$$= (3k_B T/\gamma) [\Gamma^{-1}]_{ij} \quad (3)$$

gdje $[\Gamma^{-1}]_{ij}$ označava ij -ti element inverzne matrice Γ , (ΔR) je $3N$ -dimenzionalni stupčani vektor $(\Delta R_1, \Delta R_2, \dots, \Delta R_N)$ fluktuacija svih čvorova, a Z_N je konfiguracijska raščlambena funkcija:

$$Z_N = \int \exp\left(-\frac{\gamma}{2k_B T} (\Delta R^T \Gamma \Delta R)\right) d(\Delta R) \quad (4)$$

Poprečni odnosi u Slici 3 dobiveni su iz:

$$\begin{aligned} C_{ij} &= \langle (\Delta R_i \cdot \Delta R_j) \rangle / [\langle (\Delta R_i)^2 \rangle \langle (\Delta R_j)^2 \rangle]^{1/2} \\ &= [\Gamma^{-1}]_{ij} / ([\Gamma^{-1}]_{ii} [\Gamma^{-1}]_{jj})^{1/2} \end{aligned} \quad (5)$$

Potencijalna energija V u jednadžbi (3) može se zapisati kao:

$$\begin{aligned} V &= (\gamma/2) (\Delta R^T) \Gamma (\Delta R) \\ &= (\gamma/2) \sum_i \sum_j h(r_c - R_{ij}) (\Delta R_j - \Delta R_i)^2 \end{aligned} \quad (6)$$

gdje T označava transponiranje. Zbrajaju se sve interakcijske lokacije, h(x) je Heavyside-ova step funkcija, jednaka 1 ako je $x \geq 0$, a nula inače. Tako se sortiraju svi parovi locirani bliže od granične udaljenosti r_c .

Ms fluktuacije residualnih dijelova i odgovarajućih B – faktora kristalografije X – zrakama. Dobiveni su jednadžbom (3) sa $i = j$, tj.:

$$\langle (\Delta R_i)^2 \rangle = (3k_B T / \gamma) [\Gamma^{-1}]_{ii} \quad B_i = 8\pi^2 (k_B T / \gamma) [\Gamma^{-1}]_{ii} \quad (7)$$

Jednadžba (7) predstavlja vrlo učinkovit način proračuna ms fluktuacija residualnih dijelova.

Iako teorija daje jedinstveno rješenje distribucije fluktuacija za svaku pojedinačnu arhitekturu, apsolutne veličine fluktuacija ovise o konstanti elastičnosti γ (gamma).

Analize modova (Mode analysis (MA))

Glavna prednost GNM – a je mogućnost određivanja globalnih modova kvartarne strukture sa minimalnom računarnom složenosti. U tu svrhu prvi korak je svojstvena vrijednost dekompozicije Γ .

$$\Gamma = U \Lambda U^{-1} \quad (8)$$

gdje je U ortogonalna matrica čiji stupci u_k , $1 \leq k \leq N$ su vektori Γ , a Λ (lambda) je dijagonalna matrica svojstvenih vrijednosti (λ_k). Svojstvene vrijednosti predstavljaju frekvencije N - 1 GNM modova različitih od nule, obično organiziranih u rastući poredak, tj. $\lambda_1 \leq \lambda_i \leq \lambda_{N-1}$ i $\lambda_N = 0$. I-ti element $(u_k)_i$ k-tog vektora opisuje kretanje residualnog dijela i duž k-te glavne koordinate. Ms fluktuacije ostataka mogu se zapisati kao suma svih modova:

$$\langle (\Delta R_i)^2 \rangle = \sum_k [(\Delta R_i)^2]_k = \sum_k (3k_B T / \gamma) [\lambda_k^{-1} (u_k)_i (u_k)_i] \quad (9)$$

i doprinos *k-tog* moda:

$$[\Delta R_i \cdot \Delta R_j]_k = (3k_B T / \gamma) [\gamma_k^{-1} u_k u_k^T]_{ij} \quad (10)$$

Oblik *k-tog* moda, dobiven je iscrtavanjem $(u_k)_i (u_k)_i$ kao funkcije ostatatka indeksa i za $1 \leq i \leq N$, predstavlja distribuciju pokretljivosti residualnih dijelova u *k* modu. Po definiciji ova je distribucija normalizirana, tj. $\sum_i (u_k)_i (u_k)_i = 1$. λ_k^{-1} služi kao statistička težina za mod k . Najsporiji mod dakle daje i najveću kontribuciju $(\Delta R_i)^2$

ANM

Fluktuacije procjenjene GNM – om su po definiciji izotropne, tj. $(\Delta X_i)^2 = (\Delta Y_i)^2 = (\Delta Z_i)^2 = (\Delta R_i)^2 / 3$, i sustav je opisan sa $N - 1$ unutarnjih modova, umjesto $3N - 6$, a oni pružaju informacije samo o veličinama fluktuacija. Nema informacija o smjerovima fluktuacija. ANM je sličan GNM-u, ali nema ovaj nedostatak. Glavna razlika je da potencijal za svaki par (i, j) interaktivnih ostataka je $\{(\gamma/2)(|R_{ij}| - |R_{ij}^0|)^2\}$ u ANM-u, naprema $\{(\gamma/2)(\Delta R_{ij} \cdot \Delta R_{ij})\}$ u GNM-u. Ovdje je R_{ij}^0 originalni vektor udaljenosti između čvorova i i j , R_{ij} je takav nakon deformacije, i $\Delta R_{ij} = R_{ij} - R_{ij}^0$. U ANM-u, Γ je zamijenjena sa $3N \times 3N$ matricom konektivnosti H . Matrica H proporcijonalna je Hessian matrici u NMA-u uz dva pojednostavljenja: (i) svi residui su homogeni, vezani istim konstantnim silama; i (ii) grublji prikaz. Kao i GNM, ANM donosi analitičko rješenje.. H je $N \times N$ super matrica, čiji nedijagonalni super elementi su:

$$H_{ij} = \begin{bmatrix} \partial^2 V / \partial X_i \partial X_j & \partial^2 V / \partial X_i \partial Y_j & \partial^2 V / \partial X_i \partial Z_j \\ \partial^2 V / \partial Y_i \partial X_j & \partial^2 V / \partial Y_i \partial Y_j & \partial^2 V / \partial Y_i \partial Z_j \\ \partial^2 V / \partial Z_i \partial X_j & \partial^2 V / \partial Z_i \partial Y_j & \partial^2 V / \partial Z_i \partial Z_j \end{bmatrix} \quad (11)$$

Dijagonalni super elementi pronađeni su iz negativnog zbroja nedijagonalnih članova, kao Γ . Druga derivacija od V s obzirom na komponente položajnih vektora može se lako pronaći iz jednadžbe (6):

$$\text{e.g. } \partial^2 V / \partial X_i \partial Y_j = -\gamma (X_j - X_i)(Y_j - Y_i) / R_{ij}^3.$$

Korelacije između fluktuacija mogu se izvesti iz jednadžbe (3) ako $\gamma^{-1} H$ zamjeni Γ , koji daje dobro znanu inverznu ovisnost kovarijance matrice C i Hessian matrice. Frekvencije moda u ANM dane su relacijom $\omega_i = (\gamma \lambda_i)^{1/2}$, gdje je λ_i njegova *i-ta* svojstvena vrijednost $\gamma^{-1} H$ (ili Γ) za $1 \leq i \leq 3N - 6$. Neka C_{ij} odredi *ij-ti* super element C , tj. 3×3 matricu korelacije između komponenata ΔR_i i ΔR_j . C_{ij} je izražen kao suma $3N - 6$ modova različitih od nule:

$$C_{ij} = \langle \Delta R_i \Delta R_j^T \rangle = (k_B T / \gamma) \sum_k \lambda_k^{-1} [(u_k^{ANM})(u_k^{ANM})^T]_{ij} \quad (12)$$

Ovdje (u_k^{ANM}) je k -ti vektor nađen dijagonaliziranjem $\lambda^{-1}H$ i uvjeta $[(u_k^{ANM})(u_k^{ANM})^T]_{ij}$ koji označava ij -ti superelement matrice zatvoren u zgradama. Ms fluktuacije residua dobivene su iz:

Gdje tr označava trag C_{ii} , a kontribucija moda k je dobivena iz:

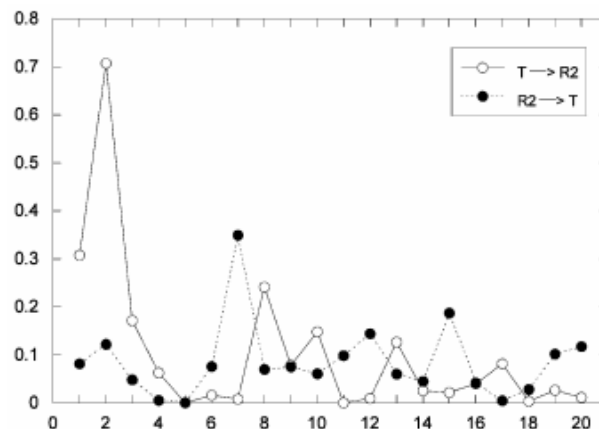
$$[(\Delta R_i)^2]_k = (k_B T / \gamma) \lambda_k^{-1} \text{tr}[(u_k^{ANM})(u_k^{ANM})^T]_{ii} \quad (14)$$

$$\langle (\Delta R_i)^2 \rangle = \sum_k [(\Delta R_i)^2]_k = \text{tr} C_{ii} \quad (13)$$

$$B_i = (8\pi^2/3) \text{tr} C_{ii}$$

Korelacija između ANM modova i vektora pomaka između T i R2 formi

U principu, deformacija residua tijekom prijelaza iz nevezanog (T) u vezano (R2) stanje nije nužno sukladna pomaku vektora dobivenom linearnom interpolacijom između 2 stanja. Međutim, interesantno je ispitati koliko su međusobno vezani vektori pomaka sa vektorima uzrokovanim individualnim modovima. Za usporednu analizu, ispitane su kosinusne korelacije između vektora pomaka i vektora povezanih sa prvih 20 modova dobivenih ANM – om za nevezana (T) i vezana (R2) stanja. Slika 6 prikazuje rezultate iz tih korelacija. U skladu s prijašnjim analizama, drugi najsporiji ANM mod dobiven za nevezano (T) stanje prikazuje visoku korelaciju (>0.7) sa aktualnim vektorima pomaka. Vektori dobiveni za vezano (R2) stanje, s druge strane, prikazuju slabiju korelaciju sa vektorima pomaka, izuzev sedmog moda, čiji doprinos nije tako jak kao doprinos nekoliko vodećih modova, što potvrđuje da prijelaz $R2 \rightarrow T$ nije pogodan kao $T \rightarrow R2$ prijelaz.



Slika 6.

Korelacije između vektora pomaka povezane sa $T \rightleftharpoons R2$ prijelazom Ordinata je kosinusna korelacija pomaknutih vektora i vektora odgovarajućih 20 prvih modova.

3. Zaključak

Dakle, čak i jednostavan model, poput GNM ili ANM, može predvidjeti tranziciju iz nevezane (T) u vezanu (R2) formu hemoglobina. Prethodne primjene su pokazale da je globalni model proteina neosjetljiv na detalje strukture, te kolektivna kretanja domene. Stoga, bez skoro ikakvog znanja iz kemije i biologije o samom funkcioniranju hemoglobina, te poznavanja detalja atomske strukture ili energetskih parametara, koristeći samo strukturalne (čisto geometrijske) podatke, možemo otkriti hinge regije hemoglobina, i pokazati da one odgovaraju spojnim regijama na $\alpha 1\beta 2$ poveznici.

4. Literatura

<http://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin>

<http://www.bio-computing.org/showabstract.php?pmid=14516750>

5. Sažetak

Informacije o dinamici proteina su uglavnom dobivene spektroskopskim analizama dijelova proteina, ili indirektno, uspoređivanjem različitih konformacija (oblika) proteina nastalih u prisutnosti različitih substrata ili liganada. Iako molekularne simulacije pružaju i uvid u dinamiku proteina, one uglavnom nemogu potpuno ispitati konformacijske prostore proteina, te postaju relativno skupe u istraživanju ukupne dinamike velikih makromolekularnih struktura. Stoga koristimo jednostavnije, isključivo mehaničke, modele kao što su GNM (Gaussian Network Model), te njegova inačica, ANM (Anisotropic Network Model) u treženju hinge regija, tj. općenito prilikom proučavanja proteina. Dakle, čak i jednostavan model, poput GNM ili ANM, može predvidjeti tranziciju iz nevezane (T) u vezanu (R2) formu hemoglobina. Stoga bez skoro ikakvog znanja iz kemije i biologije o samom funkcioniranju hemoglobina, koristeći samo strukturalne podatke, možemo otkriti njegove hinge regije.