

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ c ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ»

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΚΑΜΠΑΝΑΡΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2008

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΚΑΜΠΑΝΑΡΑΚΗΣ

Ηλεκτρονικό Ταχυδρομείο: kampanarakis@sch.gr . Ιστοχώρος: <http://users.sch.gr/kampanarakis>

ΣΠΟΥΔΕΣ

Μάρτιος '94	Φυσικό Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Κρήτης.
Σεπτέμβριος '00	Ιατρική Πληροφορική -Τηλεϊατρική Τεχνολογία Ιατρικών Συστημάτων, Τ.Ε.Ι Κρήτης.
Σεπτέμβριος '08	Μεταπτυχιακό πρόγραμμα Εφαρμοσμένης Μοριακής Φασματοσκοπίας , του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Εκπόνηση ερευνητικής εργασίας στο εργαστήριο Θεωρητικής και Υπολογιστικής Χημείας (Τομέας Φυσικοχημείας), υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Στ. Φαράντου. Τίτλος: «ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ <i>c</i> ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ»

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Δεκέμβριος '93	Αγγλικά, Πολύ Καλά (First Certificate University of Cambridge).
----------------	---

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

'98-'00	Ίδρυση φροντιστηρίου Β/βάθμιας εκπαίδευσης στο Αρκαλοχώρι Ηρακλείου.
'00–σήμερα	Καθηγητής Δημόσιας Β/βάθμιας εκπαίδευσης.

Σεπτέμβριος '02	Πιστοποίηση από Παιδαγωγικό Ινστιτούτο ως επιμορφωτή στο πρόγραμμα 'Κοινωνία της Πληροφορίας'.
Ιούνιος '03	Βαθμολογητής πανελληνίων εξετάσεων Γ' Λυκείου (Γεν. παιδείας & Κατεύθυνσης) 52 ^ο Εξεταστικό κέντρο. Αλικαρνασσός Ηρακλείου.
Απρίλιος '08-σήμερα	Μέλος επιτροπής Ν. Ηρακλείου, για την επιμόρφωση εκπαιδευτικών (Α/βάθμιας και Β/βάθμιας εκπαίδευσης) στη χρήση και αξιοποίηση των Τεχνολογιών Πληροφορίας & Επικοινωνιών (ΤΠΕ) στην εκπαιδευτική διαδικασία.
ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ	
<i>Λειτουργικά συστήματα:</i>	Windows, Linux.
<i>Γλώσσες Προγραμματισμού:</i>	Fortran 77.
<i>Web Publishing:</i>	Microsoft FrontPage, Macromedia Flash, Microsoft Power Point, Adobe Acrobat.
<i>Spreadsheets:</i>	Microcal Origin, Microsoft Excel, Mathematica.
<i>Βάσεις Δεδομένων:</i>	Microsoft Access, Oracle.
<i>Πακέτα Επεξεργ. Κειμένου:</i>	Microsoft Word.
<i>Πακέτα Επεξεργ. Εικόνας:</i>	Adode Photoshop, Corel Draw, Image Pro Plus.
ΆΛΛΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ	
Απρίλιος '02	Πτυχίο Ιστιοπλοΐας ανοικτής θαλάσσης - Ιστιοπλοϊκός Όμιλος Ηρακλείου.
Ιούνιος '03	Πτυχίο αυτόνομης κατάδυσης (επίπεδο προχωρημένων Padi – rescue) - <u>Scubakreta</u> .

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό σημείωμα	2
Περιεχόμενα	4
Περίληψη	6
Κεφάλαιο I: Εισαγωγή – Περιγραφή του οξο-φέρρουλ ενδιάμεσου της Κυτοχρωμικής c Οξειδάσης	
1.1 Γενικά στοιχεία	9
1.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων και οξειδωτική φωσφορυλίωση	14
1.3 Κυτοχρωμική c Οξειδάση	19
1.4 Προτεινόμενος μηχανισμός ενεργοποίησης του O ₂	24
1.5 Θεωρητική και δονητική μελέτη των οξο-φερρύλ ενδιάμεσων στην κυτταρική αναπνοή	28
1.6 Στόχοι παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας	31
Κεφάλαιο II: Μοριακά δυναμικά	
2.1 Εξίσωση του Schrödinger για μοριακά συστήματα	33
2.2 Προσέγγιση Born – Oppenheimer	34
2.3 Μοριακές Δυναμικές Ενεργειακές Επιφάνειες (ΔΕΕ)	37
2.4 Διατομικό Μόριο	40
2.5 Εμπειρικά δυναμικά – Πεδία δυνάμεων	43
2.5.1 Παραμορφώσεις δεσμών	44
2.5.1.1 Αρμονικό δυναμικό	44
2.5.1.2 Δυναμικό Morse	45

2.5.2	Μεταβολές επίπεδων γωνιών	46
2.5.3	Μεταβολές δίεδρων γωνιών	46
2.5.4	Αλληλεπιδράσεις van der Waals	47
2.5.5	Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	50

Κεφάλαιο III: Μοριακή δυναμική

	Εισαγωγή	56
3.1	Αρχικές συνθήκες	57
3.2	Εξισώσεις κίνησης	58
3.3	Τελικές συνθήκες	67

Κεφάλαιο IV: Αποτελέσματα

4.1	Ενεργό κέντρο	74
4.1.1	Διηλεκτρική εξάρτηση ενεργού κέντρου	75
4.1.2	Θερμοκρασιακή εξάρτηση ενεργού κέντρου	78
4.2	Πρωτεΐνη	81
4.2.1	Θερμοκρασιακή εξάρτηση πρωτεΐνης (720-900cm ⁻¹)	82
4.2.2	Θερμοκρασιακή εξάρτηση πρωτεΐνης (0-500cm ⁻¹)	83

	Συμπεράσματα	84
--	---------------------	----

Παραρτήματα

	Παράρτημα 1 - Καταστάσεις πρωτονίωσης προπιονικού-Asp399	89
	Παράρτημα 2 - Λαγκρανζιανή και Νευτώνεια προσέγγιση	91
	Παράρτημα 3 - Η Αρχή του Hamilton	93
	Παράρτημα 4 - Παράμετροι πεδίου δυναμικής ενέργειας	96

	Βιβλιογραφία	109
--	---------------------	-----

	Ευχαριστίες	113
--	--------------------	-----

Περίληψη

Η κυτοχρωμική *c* οξειδάση (CcO) είναι το τελικό διαμεμβρανικό ένζυμο στην αναπνευστική αλυσίδα. Το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό στο διπυρηνικό κέντρο αιμικού Fe/Cu_B. Η σχάση του δεσμού O-O παράγει το οξο-φερρύλ (Fe^{iv}=O) ενδιάμεσο. Σε αυτήν την ερευνητική εργασία χρησιμοποιούμε υπολογισμούς Μοριακής Δυναμικής προκειμένου να ανιχνεύσουμε τις δονήσεις που ενέχονται στην τάση του Fe-O κατά την αλλαγή της διηλεκτρικής σταθεράς αλλά και κατά την αλλαγή της θερμοκρασίας. Ο ρόλος της πρωτεϊνικής μήτρας αποδεικνύεται σημαντικός για τις φασματικές ιδιότητες του φερρύλ ενδιάμεσου, καθώς οι συχνότητες και οι εντάσεις των ευαίσθητων στο οξυγόνο κορυφών ελέγχονται από αλλαγές της διηλεκτρικής σταθεράς. Επίσης το ένζυμο της κυτοχρωμική *c* οξειδάση αποδεικνύεται ιδιαίτερα σταθερό σ' ένα αρκετά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Συγκεκριμένα η έρευνα μας κατέληξε στα εξής συμπεράσματα:

- Η δόνηση Fe^{iv}=O της CcO δεν επηρεάζεται για τιμές της διηλεκτρικής σταθεράς μικρότερες του 1,5. Για τιμές μεγαλύτερες του 1,5 έχουμε μια ποιο εντοπισμένη δόνηση Fe^{iv}=O.
- Το ηλεκτροστατικό δυναμικό του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης είναι ένας σημαντικός παράγοντας επιρροής στη δόνηση ν(FeO). Το οριακό σημείο αυτής της επιρροής φαίνεται να είναι η τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς 1,5.
- Στη μελέτη μας εμφανίστηκαν πέντε κορυφές τις οποίες αποδώσαμε σε δονήσεις
- Η μελέτη του ενεργού κέντρου της CcO είναι μια καλή προσέγγιση της μελέτης του συνόλου της πρωτεΐνης.
- Το σύστημα μας αποδεικνύεται αρκετά ανθεκτικό στην αλλαγή της θερμοκρασίας.
- Μια και το ηλεκτροστατικό δυναμικό φαίνεται να επηρεάζει την δόνηση Fe^{iv}=O, οι δύο κορυφές στους $790/804\text{ cm}^{-1}$ θα μπορούσαν να αποδοθούν σε δυο διαφορετικές διαμορφώσεις οφειλόμενες σε συμβάντα πρωτονίωσης (πρωτονίωση/αποπρωτονίωση αμινοξέων). Η τιμή 1,5 της διηλεκτρικής σταθεράς φαίνεται να είναι το μεταίχμιο μεταξύ των δύο διαμορφώσεων.

Λέξεις κλειδιά: Κυτοχρωμική *c* οξειδάση, φερρύλ ενδιάμεσο, μοριακή δυναμική, πρωτεϊνική μήτρα, διηλεκτρική εξάρτηση, θερμοκρασιακή εξάρτηση.

“Studies of Temperature dependence of cytochrome *c* oxidase with Molecular Dynamics”

Author: Alexandros Kampanarakis

Abstract

Cytochrome *c* oxidase (CcO) is the membrane bound terminal enzyme in the respiratory chain. Molecular oxygen is reduced to water in its heme Fe/Cu_B active site. The O-O bond cleavage produces the ferryl-oxo (Fe^{iv}=O) intermediate. In this research, Molecular Dynamics calculations are employed to probe the frequencies of vibrational modes which involve the stretching of Fe-O during the change of dielectric constant and the change of temperature. The role of protein frame for the spectroscopic properties of the ferryl intermediate is proved to be significant, as the frequencies and the intensities of the oxygen sensitive bands is controlled by dielectric constant changes. In addition the Cytochrome *c* oxidase is proved to be stable in a large width of temperatures. Concretely our research led to the following conclusions:

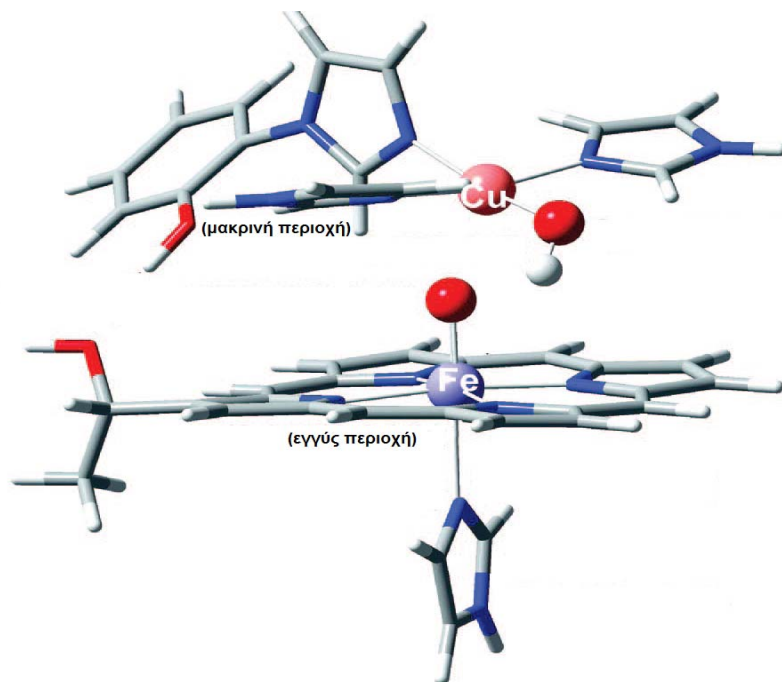
- H vibration Fe^{iv}=O of CcO is not influenced for values of dielectric constant smaller the 1.5. For values bigger the 1,5 we have a localized vibration Fe^{iv}=O.
- The electrostatic potential of active site of protein is an important factor of influence in vibration $\nu(\text{FeO})$. The marginal point of this influence appears to be the value of dielectric constant 1.5.
- In our study five peaks were presented which are attributed to the vibrations of the active site.
- The study of active site of CcO is a good approach of studying the protein.
- The protein frame is stable with respect to temperature increases.
- Since the electrostatic potential appears to influence the vibration Fe^{iv}=O, the two peaks in 790/804 cm⁻¹ could be attributed in two different configurations corresponding to incidents of protonation/deprotonation of amino-acids. The value 1.5 of dielectric constant, appears to be the verge between the two configurations.

Keywords: Cytochrome *c* Oxidase, ferryl intermediate, molecular dynamic, protein frame, dielectric dependence, temperature dependence.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΟΞΟ-ΦΕΡΡΥΛ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ c ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ



1.1 Γενικά στοιχεία

Καθετί που έχει ζωή, αποτελείται από κύτταρα σχετικά απλά ή πολύπλοκα. Ακόμη και το απλούστερο από αυτά διαθέτει μια δομή απίστευτα σύνθετη. Αν η κυτταρική οργάνωση καταστραφεί, χάνεται και η ζωή. Γι' αυτό η εξέλιξη όπλισε τους οργανισμούς με τη δυνατότητα να προσπαθούν να διατηρήσουν σταθερή τη δομή τους. Η ιδιότητα αυτή λέγεται *ομοιόσταση* και είναι ένα διαχωριστικό σημείο ανάμεσα στα έμβια και στα άβια όντα. Η ομοιόσταση είναι απαραίτητη γιατί η φύση έχει την τάση να προσπαθεί να ισοπεδώσει κάθε διαφορά ενέργειας (*εντροπία*). Αυτό σημαίνει ότι οι ζωντανοί οργανισμοί πρέπει να αγωνίζονται συνέχεια για να διατηρήσουν την οργάνωσή τους ενάντια στη φύση. Για να το πετύχουν χρειάζονται μεγάλες ποσότητες ενέργειας. Δύο πηγές ενέργειας είναι διαθέσιμες για τους ζωντανούς οργανισμούς. Η ακτινοβολία (π.χ. φως του ήλιου) και τα θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντος. Από το περιβάλλον, οι ζωντανοί οργανισμοί, παίρνουν ύλη (θρεπτικές ουσίες) την οποία μετατρέπουν σε ενέργεια. Το σύνολο των φυσικοχημικών διεργασιών με τις οποίες γίνεται η μετατροπή ύλης σε ενέργεια μέσα στους οργανισμούς ονομάζεται **μεταβολισμός**.

Οι μεταβολικές αντιδράσεις, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

α) να τείνουν να συνθέσουν πολύπλοκες ενώσεις από απλές, οπότε λέγονται **αναβολικές**, και

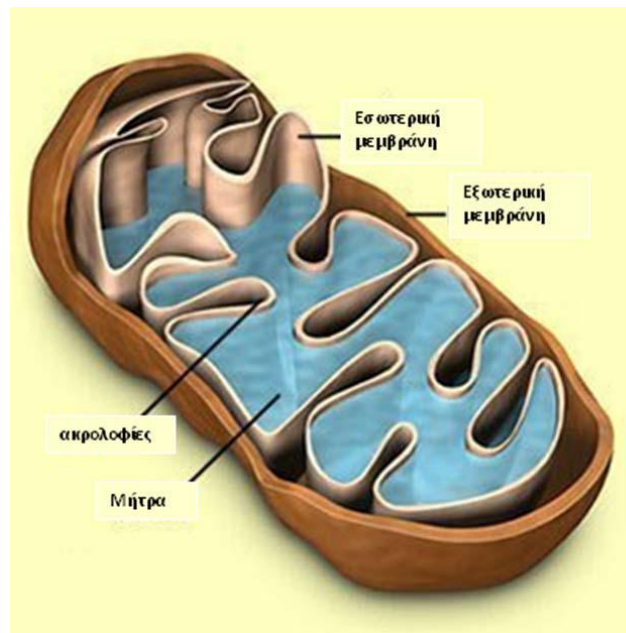
β) να τείνουν να διασπάσουν πολύπλοκες ενώσεις σε απλούστερες και μικρότερης ενέργειας, οπότε λέγονται **καταβολικές**.

Ο αναβολισμός είναι κυρίως αναγωγική αντίδραση η οποία απαιτεί ενέργεια, ενώ ο καταβολισμός είναι οξειδωτική αντίδραση η οποία ελευθερώνει ενέργεια.

Αυτά τα δυο είδη αντιδράσεων δεν πρέπει να τα θεωρήσουμε τελείως ανεξάρτητα μεταξύ τους. Ο οργανισμός παίρνει πολύπλοκες ενώσεις, τις διασπά σε απλές και με αυτές συνθέτει νέες μεγαλομοριακές ουσίες που του χρειάζονται. Η εικόνα που σχηματίζεται με αυτόν τον τρόπο είναι εικόνα δυναμικής και όχι στατικής ισορροπίας. Ο μεταβολισμός αποτελεί τόσο σημαντικό τμήμα των βιοχημικών διεργασιών σε ένα οργανισμό, ώστε ο έλεγχός του να επιτρέπει την απότομη μετάβαση από μια κατάσταση νάρκης σε μια κατάσταση έντονης σωματικής άσκησης. Επιπλέον, πολλές ασθένειες έχουν τη βάση της παθοφυσιολογίας τους στις αντιδράσεις του μεταβολισμού.

Το ερώτημα που γεννιέται από τη μελέτη του μεταβολισμού είναι με ποιο τρόπο διατηρείται αυτή η τάξη τόσο στο είδος όσο και στη σειρά των βιοχημικών αντιδράσεων. Υπάρχουν ουσίες οι οποίες έχουν αναλάβει αυτή την αποστολή και ονομάζονται βιοκαταλύτες. Οι βιοκαταλύτες – ένζυμα, κατευθύνουν και ελέγχουν τις μεταβολικές αντιδράσεις, ρυθμίζοντας όχι μόνο το είδος αλλά και την ποσότητα των προϊόντων τους. Συγκρίνοντας τα κυριότερα μεταβολικά μονοπάτια διαφορετικών οργανισμών εμφανίζονται σημαντικές ομοιότητες. Με μια πρώτη εκτίμηση, αυτό μπορεί να φαίνεται περίεργο, ωστόσο στηρίζει την υπόθεση πως η ζωή προήλθε από μια κοινή αρχέγονη μορφή.

Οι ευκαριωτικοί οργανισμοί, στο εσωτερικό των κυττάρων τους (κυτταρόπλασμα) περιέχουν ένα οργανίδιο το οποίο αποτελεί τη βασική μονάδα «παραγωγής ενέργειας» του κυττάρου. Το οργανίδιο αυτό είναι το μιτοχόνδριο. **(Εικόνα 1.1)**

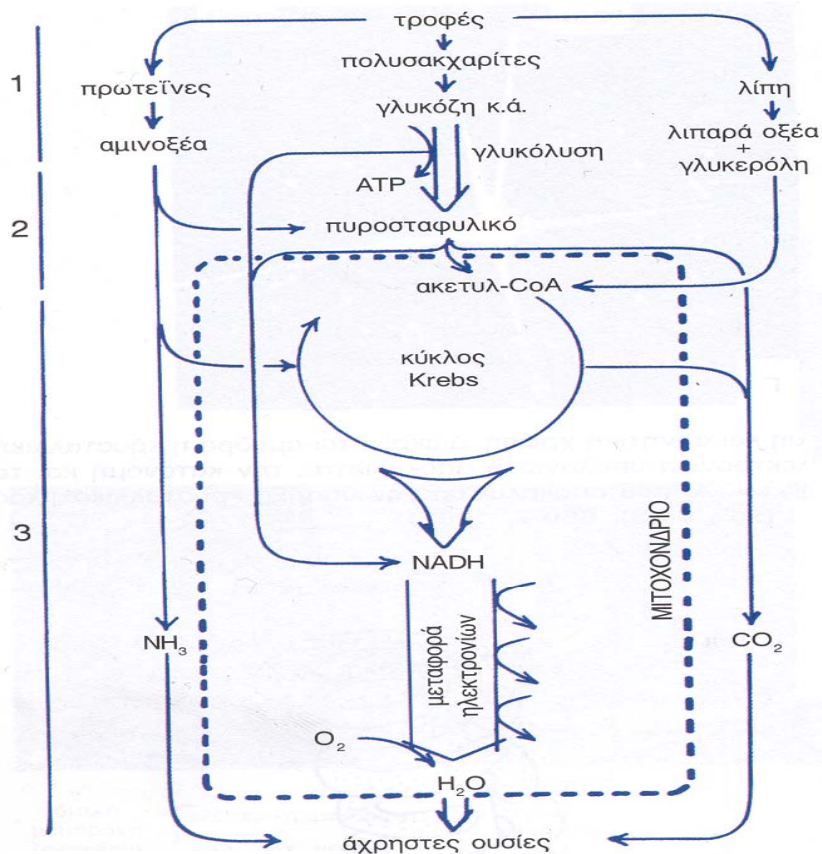


Εικόνα 1.1 Μιτοχόνδριο

Σύμφωνα με την *ενδοσυμβιωτική υπόθεση* τα μιτοχόνδρια, αλλά και οι χλωροπλάστες, έχουν προέλθει από τα βακτήρια. Τα δύο αυτά οργανίδια έχουν ανεξάρτητο πλήρες γενετικό σύστημα με σημαντικές ομοιότητες με αυτό των βακτηρίων. Τη βακτηριακή τους προέλευση ενισχύει και η αναπαραγωγή τους με αύξηση του όγκου τους και κατόπιν διαίρεση με διχοτόμηση.

Το μιτοχόνδριο έχει κατά κανόνα σχήμα σφαιρικό ή ραβδοειδές με διάμετρο 0,2-1,0 μm και μήκος 3-10 μm . Όμως το σχήμα και το μέγεθος των μιτοχονδρίων εξαρτάται από τις συγκεκριμένες λειτουργικές ανάγκες, π.χ. στο αξόνημα των μαστιγίων των σπερματοζωαρίων τα μιτοχόνδρια έχουν κυλινδρική μορφή. Κάθε κύτταρο περιέχει πολλά μιτοχόνδρια. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων ενός κυττάρου κυμαίνεται από μερικές δεκάδες ως μερικές χιλιάδες, ανάλογα με την αποστολή που εκτελεί το κύτταρο. Τα μιτοχόνδρια είναι διασκορπισμένα τυχαία μέσα στο κυτταρόπλασμα ή είναι συγκεντρωμένα σε μια περιοχή του, όταν σε αυτή την περιοχή υπάρχουν αυξημένες ενεργειακές ανάγκες. Τα κύτταρα

των θηλαστικών περιέχουν από 800 έως 2500 μιτοχόνδρια , ενώ άλλοι τύποι κυττάρων μπορεί να έχουν περιορισμένο αριθμό (ένα ή δύο) ή ακόμα και μέχρι μισό εκατομμύριο μιτοχόνδρια. Στα μιτοχόνδρια λαμβάνει χώρα και ο κύκλος του κιτρικού οξέος, όπως και η οξείδωση των λιπαρών οξέων. Συνοπτική παρουσίαση αυτών των διαδικασιών φαίνεται στην **Εικόνα 1.2** ^[1]. Το σύμβολο *CoA* (στην Εικόνα) σημαίνει συνένζυμο A.



Εικόνα 1.2

παρουσίαση των τριών διαδοχικών φάσεων καταβολισμού, από τη διασπορά των τροφών μέχρι το σχηματισμό των άχρηστων ουσιών με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας (ATP). **Φάση 1:** Διάσπαση των μακρομορίων σε απλά μόρια. **Φάση 2:** Σχηματισμός ακετυλο-συνένζυμου A με σχηματισμό ATP και NADH. **Φάση 3:** Οξείδωση της οξεικής ομάδας του ακετυλο-CoA σε νερό και CO₂ με παραγωγή NADH που προκαλεί το σχηματισμό ATP μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το σύνολο της 3ης φάσης πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια (στικτή γραμμή).

Κάθε μιτοχόνδριο έχει δύο μεμβράνες πάχους περίπου 60Å. Η εξωτερική μεμβράνη είναι λεία, ενώ η εσωτερική φέρει αναδιπλώσεις,

οι οποίες χωρίζουν το χώρο μέσα στο μιτοχόνδριο σε διαμερίσματα που συνήθως επικοινωνούν μεταξύ τους. Η εσωτερική μεμβράνη είναι περισσότερο πολύπλοκη. Οι δυο μεμβράνες απέχουν μεταξύ τους 60-80 Å. Ο χώρος μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης ονομάζεται *διαμεμβρανικός χώρος*, ενώ ο χώρος που ορίζεται από την εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται μήτρα (matrix). Η λεία εξωτερική μεμβράνη που στην ουσία καθορίζει και το σχήμα των μιτοχονδρίων, έχει λιπιδική σύσταση 30 με 40%, ενώ η πρωτεϊνική της σύσταση ανέρχεται στο 60 με 70%. Επιπλέον, παρουσιάζει σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την *πορίνη*, η οποία σχηματίζει μεγάλα κανάλια εγκάρσια της μεμβράνης, επιτρέποντας την ελεύθερη διάχυση μορίων με M.W. μικρότερο του 10000. Η πυκνότερη πρωτεϊνική σύσταση της εσωτερικής μεμβράνης ανέρχεται στο 80%, ενώ τα λιπίδια της είναι κυρίως ακόρεστα και περιλαμβάνουν καρδιολιπίνη και διφωσφατυλογλυκερόλη, ενώ απουσιάζει η χοληστερόλη. Σε αντίθεση με την εξωτερική, η εσωτερική μεμβράνη είναι μη διαπερατή σε μόρια και ιόντα. Επιπλέον, καθίσταται σημαντικά πτυχωτή παρέχοντας μεγάλη επιφάνεια σε μικρό χώρο. Η μορφή των αναδιπλώσεων της εσωτερικής μεμβράνης αλλάζει συχνά. Η μορφή των μιτοχονδρίων και ιδιαίτερα η κατανομή των πτυχώσεων φαίνεται να έχει σχέση με την έκταση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που επιτελείται, αφού ο αριθμός των πτυχώσεων αυξάνει καθώς αυξάνει ο ρυθμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

1.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων και οξειδωτική φωσφορυλίωση

Οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διαδικασία κατά την οποία οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις εκλύουν ενέργεια η οποία είναι συζευγμένη με την παραγωγή ATP. Το μόριο ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) ανήκει στα βιομόρια υψηλής ενέργειας. Αποτελεί ένα βραχυπρόθεσμο μέσο αποθήκευσης – μεταφοράς ενέργειας από το ένα ενζυμικό σύστημα στο άλλο. Το ATP χαρακτηρίζεται και ως «ενεργειακό νόμισμα» γιατί παρέχει την «κινητήρια δύναμη» για όλες σχεδόν τις δραστηριότητες του κυττάρου π.χ. σύνθεση πολύπλοκων βιομορίων, ενεργητική μεταφορά ουσιών, κυτταρική κινητικότητα καθώς επίσης και σύσπαση των μυών.

Το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας από ουσίες που εισέρχονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και της γλυκόλυσης αποθηκεύεται με τη μορφή του NADH^I και ανοιγμένων φλαβονοπρωτεϊνών $[\text{FADH}_2]^{II}$. Το σύστημα $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ αποτελεί μέσο μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια όπου και καταλήγουν στο μοριακό οξυγόνο, τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων.

Τα ηλεκτρόνια που είναι αποθηκευμένα στα NADH και $[\text{FADH}_2]$ είναι υψηλού αναγωγικού δυναμικού. Τα ηλεκτρόνια αυτά διασχίζουν, μια καλά οργανωμένη αλυσίδα πρωτεϊνών και συνενζύμων (στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων) των ευκαρυωτικών κυττάρων και καταλήγουν στο O_2 , (**Εικόνα 1.3**).

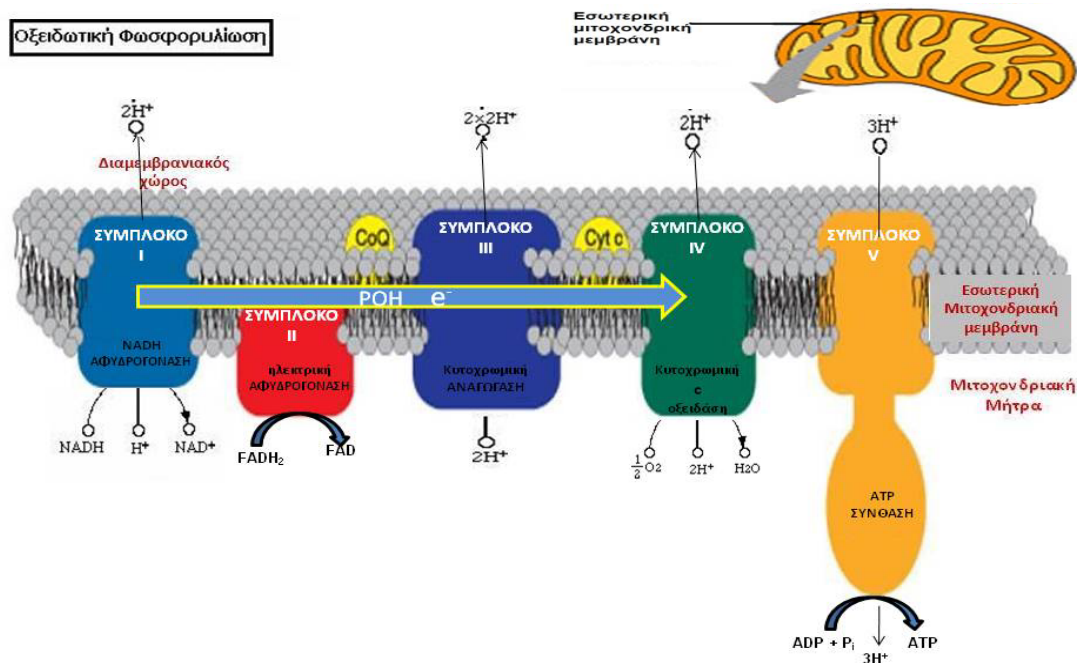
^I NADH : νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)

NAD^+ : νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (οξειδωμένη μορφή)

^{II} FADH_2 : φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)

FAD : φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (οξειδωμένη μορφή)

Η αλυσίδα αυτή ονομάζεται αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και είναι διαμεμβρανική.



Εικόνα 1.3 Τα ένζυμα στην αναπνευστική αλυσίδα της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου

Κάθε συστατικό της αλυσίδας αυτής, μπορεί να βρίσκεται σε τουλάχιστον δυο οξειδωτικές καταστάσεις, στις οποίες μεταπίπτει εναλλάξ καθώς τα ηλεκτρόνια κινούνται κατά μήκος της, προς το οξυγόνο.

Τα ηλεκτρόνια «κατεβαίνουν» την ενεργειακή κλίμακα μεταξύ των αναγωγικών δυναμικών των ζευγών NAD^+/NADH (-0,33V) και $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (+0.82V) προς περισσότερο θετικά, δηλαδή, αναγωγικά δυναμικά.

Η οξείδωση των ανηγμένων ενζύμων, μέσω του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων, ανάγει το οξυγόνο σε νερό και αντλεί τα πρωτόνια στο χώρο μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (στο διαμεμβρανικό χώρο). Η εισροή των πρωτονίων πίσω στη μήτρα του μιτοχονδρίου παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για τη

σύνθεση ATP από την ATP συνθάση (Εικόνα 1.4). Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (φαίνεται στις Εικόνες 1.3 και 1.5) αποτελείται από τέσσερα διακριτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα:

- (i) τη NADH αφυδρογονάση που μεταφέρει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων από το NADH στο ευκίνητο υδρόφοβο συνένζυμο Q (σύνθεση περίπου 2,5 ATP ανά NADH)
- (ii) την ηλεκτρική αφυδρογονάση που οδηγεί τη ροή ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στην ουβικινόνη (UQ ή συνένζυμο Q) μέσω του οξειδοαναγωγικού ζεύγους $FADH_2 - FAD$ (σύνθεση περίπου 1,5 ATP ανά $FADH_2$)
- (iii) την κυτοχρωμική αναγωγή (cytochrome bc_1 complex) που μεταφέρει ηλεκτρόνια από την ουβικινόλη^I (UQH_2) στο ευκίνητο υδροδιαλυτό κυτόχρωμα c και τον τελευταίο ενζυμικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων την
- (iv) κυτοχρωμική c οξειδάση^{II} (CcO) της οικογένειας των τελικών οξειδασών μέσω της οποίας μετακινούνται τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c στο μοριακό O_2 . Συνολικά, 1.15V ανά ηλεκτρόνιο είναι διαθέσιμα για τη διεκπεραίωση των κυτταρικών διαδικασιών.

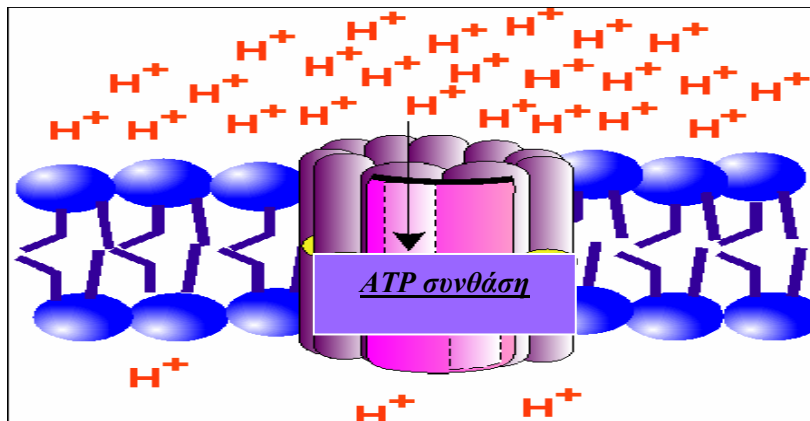
Από τα παραπάνω σύμπλοκα τα (i), (iii) και (iv) αντλούν πρωτόνια από τη μιτοχονδρική μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο. Αυτή η κάθετη στη μεμβράνη κίνηση είναι συζευγμένη με την οριζόντια ενδομεμβρανική κίνηση των ηλεκτρονίων.

Πρόσφατες έρευνες^[2] έχουν δείξει ότι συνολικά στην αναπνευστική αλυσίδα 10 πρωτόνια μεταφέρονται διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης

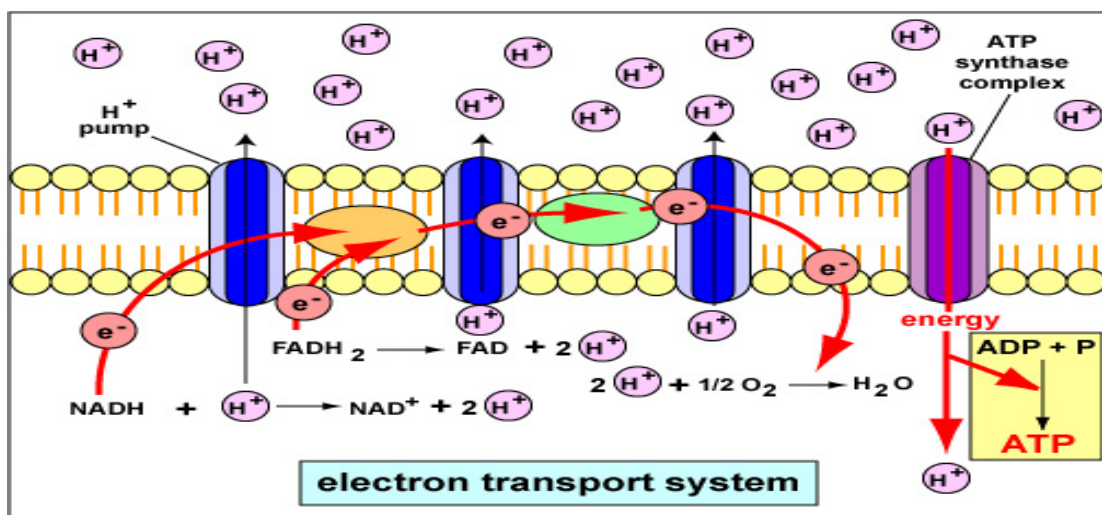
^I ουβικινόνη (UQ) ανάγεται από τα σύμπλοκα I και II σε ουβικινόλη (UQH_2). Στη συνέχεια μεταφέρεται ενδομεμβρανικά στο σύμπλοκο III.

^{II} Η CcO οξειδώνει το κυτόχρωμα c . Αυτή είναι και η πηγή της ονομασίας της.

για κάθε ζευγάρι ηλεκτρονίων που μεταφέρεται από το NADH στο O_2 , και 6 πρωτόνια για κάθε ζευγάρι που μεταφέρεται από το $FADH_2$ στο O_2 , δημιουργώντας μια διαβάθμιση pH, διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδρικής μεμβράνης. Το pH της μιτοχονδριακής μήτρας είναι περίπου 8,0 ενώ το pH του διαμεμβρανικού χώρου είναι περίπου 7,0. Έτσι δημιουργείται ένα διαμεμβρανικό δυναμικό στις δύο πλευρές της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όπου παρατηρείται μεγάλη συσσώρευση θετικών φορτίων στην πλευρά του διαμεμβρανικού χώρου σε σχέση με την πλευρά της μεμβράνης που "βλέπει" το μιτοχονδριακό χυμό (μήτρα). Τα πρωτόνια βρίσκοντας διέξοδο μέσω της ATP συνθάσης επιστρέφουν στη μήτρα του μιτοχονδρίου (**Εικόνα 1.5**). Τόσο τα μιτοχόνδρια, όσο και οι χλωροπλάστες αλλά και τα βακτήρια (βλέπε ενδοσυμβιωτική υπόθεση παρ. 1.1), χρησιμοποιούν τον ίδιο μηχανισμό (χημειώσμωση) που αρχίζει με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας, που συντελούν στη δημιουργία ηλεκτροχημικής διαβάθμισης των πρωτονίων και ολοκληρώνεται με τη σύνθεση του ATP στην ATP συνθάση (**Εικόνα 1.4**). Η ηλεκτροχημική αυτή σύζευξη που προτάθηκε στα 1961 από τον Peter Mitchell είναι γενικά αποδεκτή σήμερα και εξηγεί την παραγωγή ATP με κινητήρια δύναμη τη διαφορά pH που δημιουργείται από την μεταφορά ηλεκτρονίων.



Εικόνα 1.4 ATP συνθάση



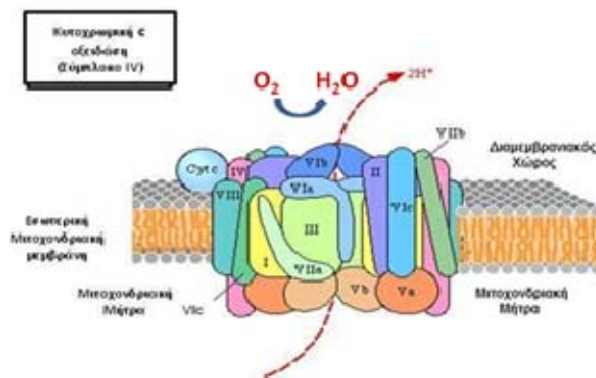
Εικόνα 1.5 Μεταφορά ηλεκτρονίων στην εσωτερική μιτοχονδρική μεμβράνη

Στην αναπνευστική αλυσίδα δημιουργείται ένα σύστημα συζευγμένων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (**Εικόνα 1.3** και **Εικόνα 1.5**), όπου τα ηλεκτρόνια μετακινούνται αυθόρμητα από ζεύγος ουσιών με χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και μικρή συγγένεια με τα ηλεκτρόνια, προς ζεύγος ουσιών με υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και μεγάλη συγγένεια με τα ηλεκτρόνια. Στην πορεία αυτή συμβαίνει μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας, ικανή για τη σύνθεση αρκετών μορίων ATP. Η αποθήκευση ενέργειας, κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το

NADH/NAD⁺ στο O₂/H₂O, αποτελεί περίπου το 40% της συνολικής μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας. Η ενεργειακή αυτή απόδοση είναι σχεδόν διπλάσια από οποιαδήποτε άλλη ανθρώπινη επινόησης μηχανή μεταφοράς ενέργειας^[2].

1.3 Κυτοχρωμική c οξειδάση

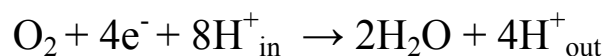
Τα ηλεκτρόνια, όπως προαναφέρθηκε, κινούνται κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων όπως δείχνουν οι **Εικόνες 1.3** και **1.5**. Όταν φτάσουν στο ένζυμο *cyt c*, τελική οξειδάση ή αιμο-χαλκο τελική οξειδάση (**Εικόνα 1.6**), ανάγουν το μοριακό O₂ σε H₂O.



Εικόνα 1.6 Κυτοχρωμική c οξειδάση από θηλαστικό

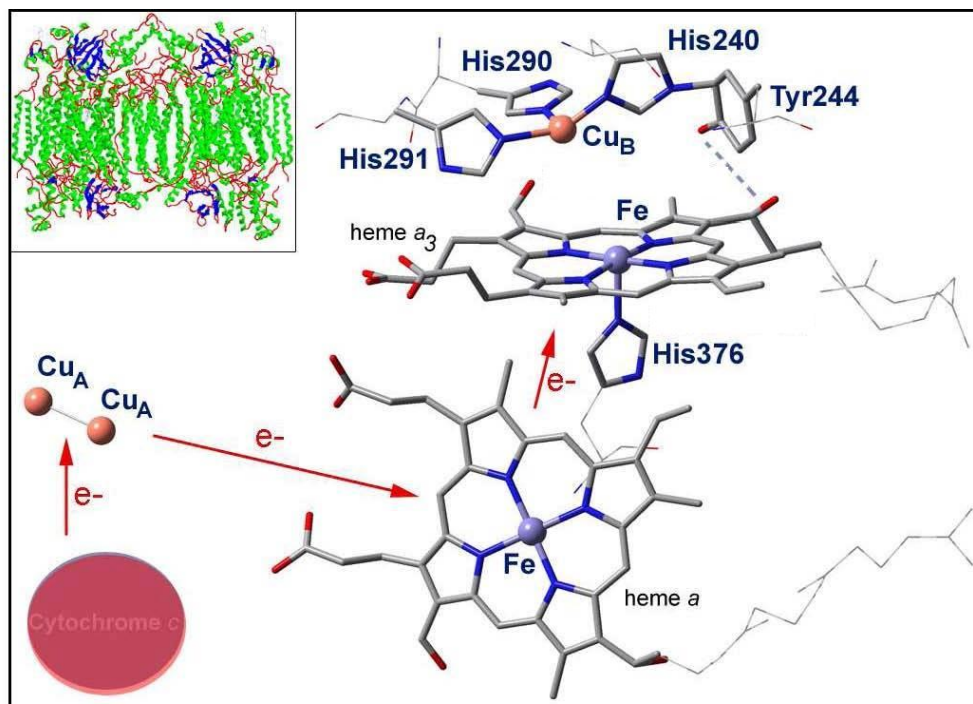
Απομακρύνουν με αυτό τον τρόπο ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας από την αναπνευστική αλυσίδα, με αποτέλεσμα τη συνεχή μεταφορά ηλεκτρονίων και την παραγωγή ελεύθερης ενέργειας. Με το μοριακό O₂, ως τελικό δέκτη των ηλεκτρονίων, η παραγωγή ελεύθερης ενέργειας είναι σημαντική, λόγω του υψηλού αναγωγικού δυναμικού του (0,815V σε pH 7). Οι τελικές οξειδάσες λειτουργούν ως οξειδοαναγωγικές

αντλίες πρωτονίων (**Εικόνα 1.5** και **Εικόνα 1.6**), συνεισφέροντας σημαντικά στη διαμεμβρανική διαβάθμιση της ελεύθερης ενέργειας. Η στοιχειομετρία της πρωτονιακής μετατόπισης πλησιάζει το ένα πρωτόνιο ανά ηλεκτρόνιο που ανάγει το μοριακό O_2 , δηλαδή τα $4H^+$ ανά μόριο O_2 . Η ολική αντίδραση που καταλύουν οι τελικές οξειδάσες μπορεί να δοθεί ως :



Τα H^+_{in} και H^+_{out} συμβολίζουν τα πρωτόνια που διακινούνται κάθετα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων από τη μήτρα (in) διαμέσου των τελικών οξειδασών στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (out). Από αυτά $4H^+$ καταναλώνονται για το σχηματισμό H_2O και $4H^+$ μεταφέρονται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.

Τα ηλεκτρόνια από το *κυτόχρωμα c* μεταφέρονται στο *διμεταλλικό κέντρο Cu_A-Cu_A* και από εκεί μέσω της *αίμης a* στον τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων, το ενεργό κέντρο *$Fe_{a3}-Cu_B$* της (CcO) Κυτοχρωμική *c* οξειδάσης (**Εικόνα 1.7**)^[3]. Το κανάλι παροχής του υποστρώματος O_2 καταλήγει στην ίδια περιοχή.



Εικόνα 1.7

Μεταφορά ηλεκτρονίων πραγματοποιείται από το κυτόχρωμα *c* στο διμερές κέντρο $\text{Cu}_A\text{-Cu}_A$ και από εκεί μέσω της αίμης *a* στο ενεργό κέντρο. Η απόσταση μεταξύ των δύο ιόντων σιδήρου $\text{Fe}_{a_3}\text{-Fe}_{a_3}$ είναι 14 Å. Πάνω αριστερά (ένθετο) φαίνεται η συνολική κρυσταλλική δομή του ενζύμου (βοεία καρδιά a_3). Άνθρακας: γκρι, Υδρογόνο: άσπρο, Άζωτο: μπλε, Οξυγόνο: κόκκινο, Χαλκός: πορτοκαλί, Σίδηρος: ανοιχτό μωβ.

Η κυτοχρωμική *c* οξειδάση γενικά είναι σφαιρική με διάμετρο 34Å¹⁴¹. Είναι διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές της CcO τύπου a_3 από βακτήριο *Paracoccus*¹ *denitrificans*¹⁵⁻⁶¹ και από βοεία καρδιά¹⁷⁻⁸¹. Η CcO από το *P. denitrificans* αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες και εμφανίζεται μονομερές, ενώ η CcO από βοεία καρδιά αποτελείται από δεκατρείς υπομονάδες (διμερές)¹¹. Γενικά η CcO περιέχει τις υπομονάδες I, II και III (Εικόνα 1.6), που παίζουν βασικό ρόλο στη λειτουργία του ενζύμου. Συνολικά περιέχει 3 με 5 υπομονάδες στα βακτήρια και έως 13

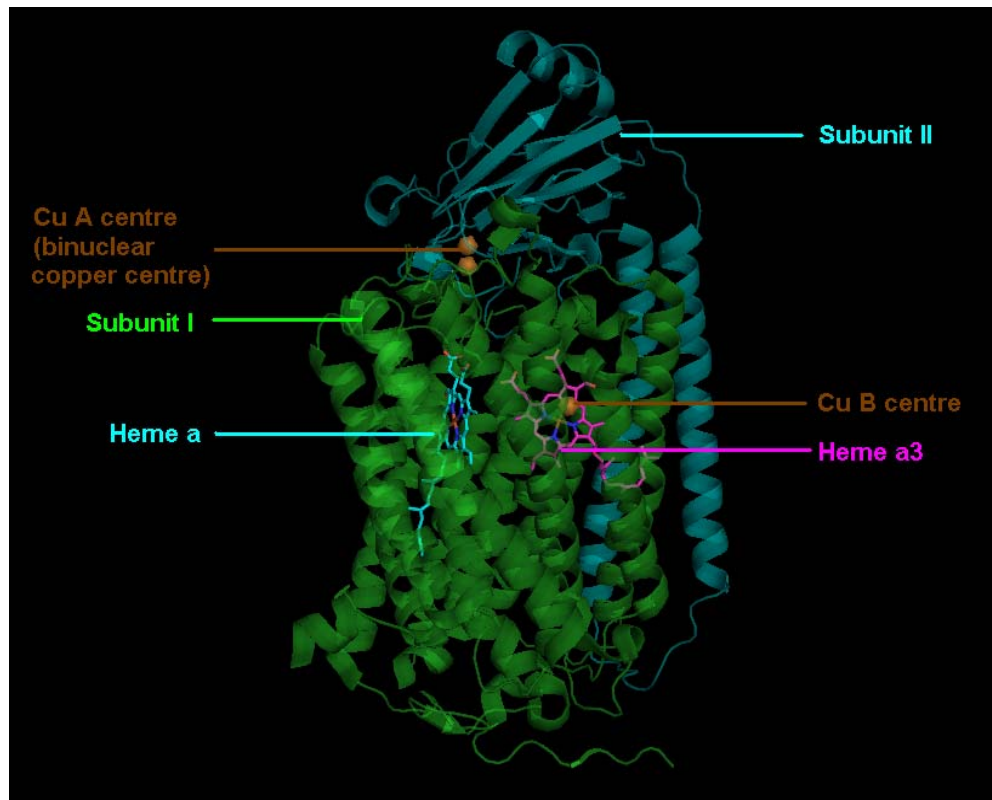
¹ Το βακτήριο *Paracoccus denitrificans* (http://en.wikipedia.org/wiki/Paracoccus_denitrificans) απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Martinus Beijerinck το 1910. Ελαττώνει τα νιτρικά και φωσφορικά άλατα εμποδίζοντας να αναπτυχθεί άλγη. Απαντάται σε βάλτους και λίμνες. Η ύπαρξη του ενισχύει την ενδοσυμβιωτική υπόθεση (βλέπε παρ. 1.1).

¹¹ Κάθε υπομονάδα του ενζύμου (στα θηλαστικά) έχει και την συμμετρική της.

υπομονάδες στα θηλαστικά. Έχει προταθεί ότι οι υπόλοιπες υπομονάδες (πέρα των I, II και III) συντελούν στη δομική διαμόρφωση, σταθερότητα και απομόνωση των I και II^[9], την προστασία από καταστροφικές ρίζες-ενδιάμεσα, τη ρύθμιση της δράσης της οξειδάσης με αλληλεπίδραση με το ATP^[10] και τη διαμόρφωση καναλιών μεταφοράς H^+/e^- . Η υπομονάδα II περιέχει συνήθως τη θέση δέσμευσης – αλληλεπίδρασης με το κυτόχρωμα *c*^[11]. Η υπομονάδα III περιέχει ένα cluster φωσφολιπιδίου που βρίσκεται στην αρχή ενός προτεινόμενου καναλιού μεταφοράς O_2 προς το ενεργό κέντρο $Fe_{\alpha_3}-Cu_B$ ^[9]. Επιπλέον, η υπομονάδα I περιέχει δύο αίμες. Την αίμη α χαμηλού *spin*, με το Fe να έχει αριθμό συναρμογής 6 με δύο ιστιδίνες (His) ως αξονικούς υποκαταστάτες και την αίμη α_3 υψηλού *spin*. Ο Fe_{α_3} έχει αριθμό συναρμογής 5, με πέμπτο υποκαταστάτη μια ιστιδίνη (His). Τρεις ιστιδίνες είναι υποκαταστάτες του χαλκού Cu_B . Η αίμη α_3 μαζί με το σύμπλοκο χαλκού Cu_B συνιστούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Εκεί λαμβάνει χώρα η αναγωγή του μοριακού O_2 σε νερό. Η υπομονάδα II περιέχει το διπυρηνικό κέντρο χαλκού Cu_A-Cu_A , που δέχεται τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα *c* (**Εικόνα 1.8**)¹. Έχει προταθεί ότι το υδροξύλιο της υδροξυ-αιθυλ-φαρνεσυλικής αλυσίδας της αίμης α_3 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την τυροσίνη Tyr244 (Tyr280 για το *P. denitrificans*) και αποτελεί τμήμα ενός πιθανού καναλιού μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ των μεταλλικών κέντρων $Fe-\alpha_3$ και Cu_B ^[7] ή μεταφοράς πρωτονίων στο διπυρηνικό κέντρο $Fe-\alpha_3/Cu_B$ ^[9] (**Εικόνα 1.7**). Η απόσταση $Fe-\alpha_3/Cu_B$ κυμαίνεται μεταξύ 4.5-5.2 Å. Η απόσταση αυτή, κατά μία εκδοχή, μένει η ίδια μεταξύ ανηγμένης και οξειδωμένης

¹ Διαθέσιμη στην ηλεκτρονική διεύθυνση: http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_c_oxidase

μορφής του ενζύμου^[12] ή (κατά μία άλλη) αλλάζει ελάχιστα $\sim 0.1\text{\AA}$ - 0.3\AA ^[13,14].



Εικόνα 1.8

Οι υπομονάδες I και II της κυτοχρωμικής *c* Οξειδάσης. Φαίνεται η θέση του διμεταλλικού κέντρου Fe- α_3 /Cu_B, η αίμη *a* (Υπομονάδα I) καθώς και το διμερές κέντρο αλληλεπίδρασης με το κυτόχρωμα *c*, Cu_A-Cu_A (Υπομονάδα II).

Η κυτοχρωμική *c* οξειδάση συνήθως καταναλώνει τα 9/10^[2] του συνολικού οξυγόνου που μπαίνει στα κύτταρα.

Θεωρητικοί υπολογισμοί (από τη διάχυση στο επίπεδο της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης) προβλέπουν πως τα ένζυμα μπορούν να μεταβιβάσουν ηλεκτρόνια με ρυθμό ~ 1 ηλεκτρόνιο/20ms^[2], κάτι που συμβαίνει και στην πραγματικότητα.

Η *CcO* είναι το τελικό ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας σε μιτοχόνδρια και αρκετά αερόβια βακτήρια. Η κυτοχρωμική οξειδάση

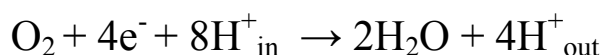
αποτελεί μια αξιοθαύμαστη «μηχανή» που δεσμεύει , ενεργοποιεί και ανάγει έως 260 μόρια O₂ το δευτερόλεπτο!¹³¹

1.4 Προτεινόμενος μηχανισμός ενεργοποίησης του O₂

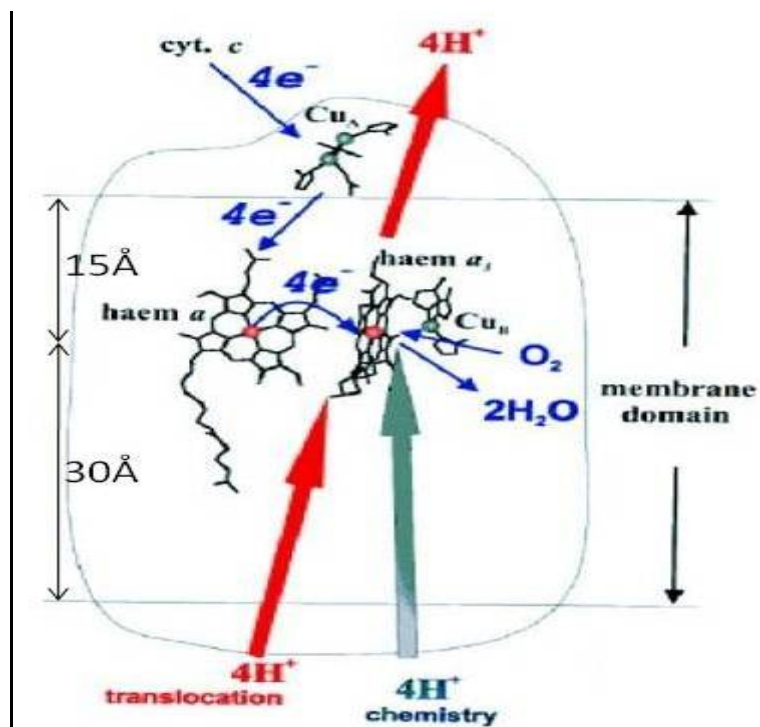
Ο μηχανισμός των ενδιάμεσων στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από την κυτοχρωμική *c* οξειδάση αποτελεί σημαντικό στόχο και καίριο παράγοντα στην εξιχνίαση του μηχανισμού της μεταφοράς πρωτονίων από το ένζυμο.

Για να μελετηθούν πειραματικά τα ενδιάμεσα προϊόντα της αναγωγής του μοριακού O₂ σε νερό χρησιμοποιείται η μέθοδος *flow-flash-probe* που ανέπτυξαν αρχικά οι *Greenwood* και *Gibson*¹⁵¹. Σε αυτή τη μέθοδο έχουμε ελεγχόμενη έναρξη του καταλυτικού κύκλου με τη δέσμευση του μοριακού O₂ στο ένζυμο αμέσως μετά τη φωτόλυση του συμπλόκου του με το CO¹⁶¹ (αναστολέας). Φασματοσκοπίες απορρόφησης και *Resonance Raman* χρησιμοποιούνται για την κινητική μελέτη και το χαρακτηρισμό ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου. Η εκκίνηση του καταλυτικού κύκλου γίνεται από τη μεικτού σθένους (*Mixed Valance-MV*) μορφή. Στη *MV* μορφή το ενεργό κέντρο αιμικού *a*₃ σιδήρου /Cu_B είναι ανοιγμένο (Fe^{II} και Cu^I_B ώστε να μπορεί να δώσει τρία ηλεκτρόνια), ενώ η αίμη *a* και το διπυρηνικό κέντρο Cu_A - Cu_A είναι οξειδωμένα (Cu^{1.5}_A- Cu^{1.5}_A) ώστε να αποτρέψουμε τη ροή ηλεκτρονίων προς το ενεργό κέντρο.

Όπως έχουμε αναφέρει, η ολική αντίδραση που καταλύουν οι τελικές οξειδάσες μπορεί να δοθεί ως :

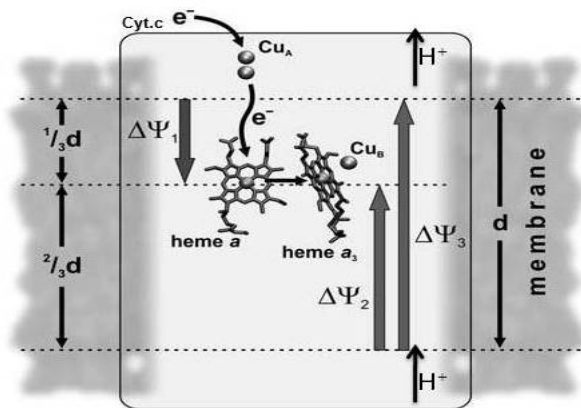


Το διμεταλλικό κέντρο $Fe_{a3}-Cu_B$ δημιουργεί την απαραίτητη διαφορά δυναμικού ώστε να κινηθούν τα ηλεκτρόνια από το χαλκό Cu_A προς την αίμη a ($\Delta\Psi_1$), αλλά και τα πρωτόνια, που λαμβάνουν μέρος στη χημεία του ενζύμου, να κινηθούν από τη μήτρα του μιτοχονδρίου προς το διμεταλλικό κέντρο ($\Delta\Psi_2$). Η διαφορά δυναμικού ($\Delta\Psi_3$) αντλεί τα πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο (Εικόνα 1.11)^[17].



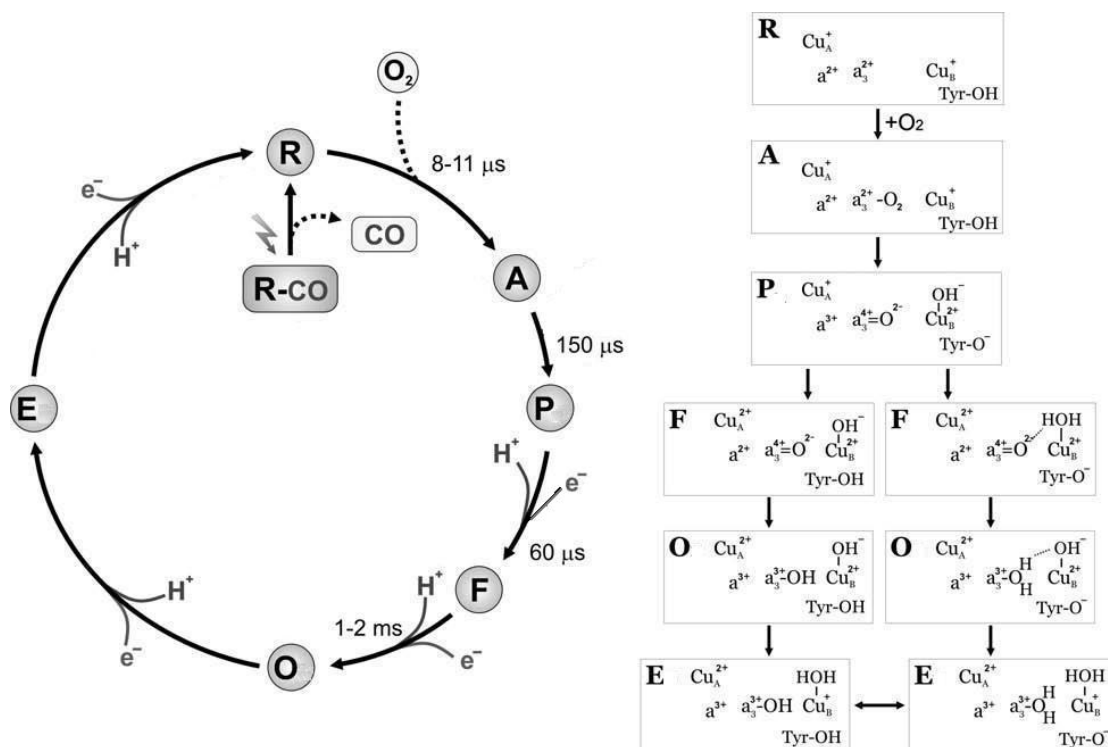
Εικόνα 1.10

Μηχανισμός ενεργοποίησης του O_2 στη CcO. Οκτώ πρωτόνια κινούνται από τη μήτρα του μιτοχονδρίου προς το διμεταλλικό κέντρο $Fe_{a3}-Cu_B$. Τα τέσσερα από αυτά μετέχουν στην χημεία του ενεργού κέντρου, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα καταλήγουν στο διαμεμβρανικό χώρο. Η απόσταση μεταξύ των δύο ιόντων σιδήρου Fe_a-Fe_{a3} είναι 14 \AA . Οι δύο αίμες βρίσκονται σε βάθος 15 \AA από την διαμεμβρανική πλευρά της μεμβράνης. Η απόσταση αυτή αντιστοιχεί στο $1/3$ του πάχους της.



Εικόνα 1.11

Σχετική διεύθυνση των οξειδοαναγωγικών παραγόντων στο ένζυμο. $\Delta\Psi_1$ είναι η διαφορά δυναμικού που ωθεί τα ηλεκτρόνια από το Cu_A στην αίμη a . $\Delta\Psi_2$ είναι η διαφορά δυναμικού που ωθεί το υπόστρωμα (4H^+) στο διμεταλλικό κέντρο. $\Delta\Psi_3$ είναι η διαφορά δυναμικού που αντλεί 4H^+ από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο.



Εικόνα 1.12

Ο καταλυτικός κύκλος της CcO που συμπληρώνεται από τα προτεινόμενα. Η δομή του **F** ενδιάμεσου δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη. Δύο πιθανές καταστάσεις μπορούν να προταθούν. Ο αποδέκτης ενός πρωτονίου κατά τη διάρκεια της μετάβασης **P**→**F** είναι είτε η τυροσίνη είτε το OH^- του Cu_B . Η δυαδικότητα του **F** ενδιάμεσου οδηγεί στις διαφορετικές πιθανές διαμορφώσεις των καταστάσεων **O** και **E**.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός αποτελείται από τα εξής βήματα (Εικόνα 1.12)^[17]:

Ο κύκλος έχει ως αφετηρία R-CO κατάσταση. Εκεί η CcO βρίσκεται στη μορφή μεικτού σθένους (*MV-Mixed Valance*).

Με φωτόλυση του R-CO οδηγούμαστε στο ενδιάμεσο **R**. Στο ενδιάμεσο αυτό το διπυρηνικό κέντρο βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση $Fe_{\alpha 3}(II)-Cu_B(I)$. Όταν το O_2 δεσμευθεί σχηματίζεται το ενδιάμεσο **A**. Η σχάση του δεσμού O-O οδηγεί στο ενδιάμεσο **P**, το οποίο έχει την οξειδωτική κατάσταση $Fe_{\alpha 3}^{(IV)}-Cu_B^{(II)}$ και ενδεχομένως μια ρίζα τυροσίνης^[18]. Με ένα επιπρόσθετο πρωτόνιο στο διπυρηνικό κέντρο και αναγωγή κατά ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο, το ενδιάμεσο μετατρέπεται σε **F**. Μ' ένα επιπλέον μεταφερόμενο ηλεκτρόνιο και ένα παραπάνω πρωτόνιο, σχηματίζεται το ενδιάμεσο **O**. Αυτά τα βήματα (από το **R** έως το **O** ενδιάμεσο) ορίζουν την οξειδωτική φάση. Στη φάση αναγωγής μεταφέρονται δύο ακόμα ηλεκτρόνια και ο κύκλος οδηγείται πίσω στη κατάσταση **R**. Από το ενδιάμεσο **O** με ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο καταλήγουμε στο ενδιάμεσο **E**. Από το ενδιάμεσο **E** με ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο καταλήγουμε στο ενδιάμεσο **R**.

Μια από τις πολλές διενέξεις αφορά στον αριθμό των πρωτονίων που μετατοπίζονται σε κάθε μονοπάτι του κύκλου^[19]. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, είχε ευρέως συμφωνηθεί ότι και τα τέσσερα πρωτόνια μετατοπίζονται κατά την οξειδωτική κατάσταση, δύο ανάμεσα στο **P** και **F**, και αντίστοιχα δύο ανάμεσα στο **F** και **O**^[20]. Πρόσφατα όμως τα παραπάνω συμπεράσματα αμφισβητήθηκαν. Προτείνεται μόνο ένα πρωτόνιο να μεταφέρεται μεταξύ του **F** και του **O**^[21]. Το 4^ο πρωτόνιο θα πρέπει λοιπόν να μετατοπιστεί κατά τη φάση αναγωγής^[22]. Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από το **P** στο **F** ενδιάμεσο, το E278

πρωτονιώνεται δια μέσου το D-καναλιού. Το πρωτόνιο του στη συνέχεια μεταφέρεται στη ενεργό περιοχή και το E278 πρωτονιώνεται ξανά τη στιγμή που ένα πρωτόνιο ελευθερώνεται στο διαμεμβρανικό χώρο^[23].

Έχει προταθεί παράλληλα, ότι ακόμη κι αν μετατοπισθούν τα τρία πρωτόνια στην οξειδωτική φάση, η απαιτούμενη ενέργεια για τη μετατόπιση και των τεσσάρων πρωτονίων είναι διαθέσιμη στη φάση αυτή^[24].

Η χρονική κλίμακα του καταλυτικού κύκλου της CcO έχει ως εξής: Στα 8μs με 11μs έχει δημιουργηθεί το ενδιάμεσο όξυ (568 cm^{-1}), ο Fe της αίμης α_3 έχει δώσει το πρώτο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο (**Εικόνα 1.12**). Περίπου στα 30μs σπάει ο δεσμός O-O οδηγώντας στο P οξο-φερρύλ ενδιάμεσο. Μέχρι τα 80μs περίπου, ανιχνεύουμε F οξο-φερρύλ ενδιάμεσο. Στα (1-3)ms-ανάλογα με το ένζυμο-έχουμε οδηγηθεί στο οξειδωμένο ένζυμο του καταλυτικού κύκλου.^[25]

1.5 Θεωρητική δομική και δονητική μελέτη των οξο-φερρύλ ενδιάμεσων στην κυτταρική αναπνοή

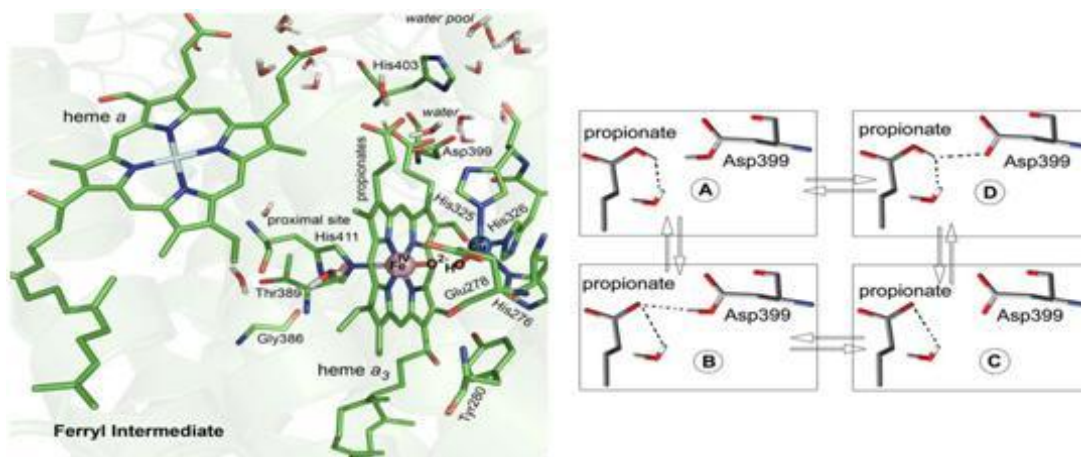
Ο χαρακτηρισμός των ενδιάμεσων και ο προσδιορισμός της δομής τους στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την κατανόηση τόσο του μηχανισμού της ενεργοποίησης του μοριακού O_2 , όσο και αυτής της άντλησης πρωτονίων από το ένζυμο. Η διαδικασία της άντλησης δεν είναι ξεκάθαρη ακόμα^[26,27]. Με φασματοσκοπία συντονισμού Raman έχουν ανιχνευτεί, δύο χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης στους 790 και 804 cm^{-1} στο ίδιο επίπεδο οξείδωσης (κατά $3e^-$) στον καταλυτικό κύκλο της κυτοχρωμικής

ε οξειδάσης. Οι παραπάνω δονήσεις έχουν οξο-ferryl χαρακτήρα $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}/\text{Cu}_B^{\text{II}}$. Ο χαρακτήρας αυτός πιστοποιήθηκε^[28,29] με αντικατάσταση του ^{16}O με ^{18}O , οπότε παρουσιάστηκε μετατόπιση των κορυφών από 790/804 cm^{-1} σε 750/764 cm^{-1} . Υπάρχουν πειραματικές εργασίες που δείχνουν την ύπαρξη μόνο της 804 cm^{-1} κορυφής.^[30] Πως δικαιολογείται η ύπαρξη των χαρακτηριστικών συχνοτήτων 790/804 cm^{-1} στο ίδιο επίπεδο οξειδωσης; Το ερώτημα αυτό αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Πολλές ομάδες προσπαθούν να βρουν την απάντηση^[31]. Θα προσπαθήσουμε και εμείς με την παρούσα εργασία. Επίσης, η κατανόηση του μηχανισμού δράσης της CcO αποτελεί αντικείμενο σημαντικής έρευνας και αντιπαραθέσεων.^[31,32,33,34,35,36] Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει σκοπό να συμβάλει στην κατανόηση-διερεύνηση αυτού του μηχανισμού.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε με μεθόδους Μοριακής Δυναμικής. Χρησιμοποιήθηκε το δυναμικό Amber99 με χρήση του λογισμικού Tinker 4.2^[37]. Αρκετές παράμετροι προσαρμόστηκαν σε DFT δεδομένα^[31] ή λήφθηκαν από το πεδίο δυνάμεων Charmm27. Το δυναμικό του δεσμού ορίστηκε να είναι τύπου Morse. Όλα τα αμινοξέα αφέθηκαν να κινούνται ελεύθερα κατά τις προσομοιώσεις. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση της απόστασης του ατόμου C_γ του E278 και του Δ-μεθυλικού άνθρακα της αίμης α_3 στην κρυσταλλική της μορφή^[31]. Εκεί εφαρμόστηκε σταθερά ελατηρίου 7kcal/mole \AA^2 . Για όλες τις μη δέσμιες αλληλεπιδράσεις εφαρμόστηκε περιοριστική ακτίνα δράσης 12 \AA με 'παράθυρο' εξομάλυνσης μεταξύ 9.6-12 \AA . Οι δομές βελτιστοποιήθηκαν με τη μέθοδο ελαχιστοποίησης της ενέργειας σε σταθερή θερμοκρασία πριν κάθε προσομοίωση βάση της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε στην εργασία των Daskalakis V., Farantos S., Varotsis C., *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Προσομοιώθηκαν 105 τροχιές, με βήμα χρόνου (για την

ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης) 0.15^I fs. Κάθε τροχιά προσομοιώθηκε για συνολικό χρόνο 52ps. Χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή 1ar1^{II} (PDB κώδικας) του *Paracoccus Denitrificans*^{16I}. *Denitrificans*^{16I}. Η δομή αυτή περιέχει περίπου 9000 άτομα.

Βασισμένοι σε ένα προτεινόμενο μοντέλο^{138I} τέσσερις διαφορετικές καταστάσεις πρωτονίωσης (A,B,C,D- **Εικόνα 1.13**) είναι πιθανές για το ζεύγος προπιονικού-Asp399 (αρίθμηση κατά την aa₃ *P. denitrificans*) της 1ar1 δομής (Βλέπε Παράρτημα 1 και βιβλιογραφία [39]). Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η D δομή.



Εικόνα 1.13

Οι τέσσερις καταστάσεις πρωτονίωσης για το ζεύγος προπιονικού-Asp399. Στις δομές A και C όλες οι καρβοξυλικές ομάδες σε ισορροπία είναι πρωτονιωμένες ή αποπρωτονιωμένες αντίστοιχα, ενώ στις B ή D δομές μόνο ένα H⁺ είναι διαθέσιμο να πρωτονιώνει είτε το Asp399 ή την προπιονική ομάδα αντίστοιχα^{III}.

^I Η περίοδος δόνησης του δεσμού Fe-O είναι περίπου 40fs.

^{II} Διαθέσιμη στην διεύθυνση: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1AR1>. Η δομή αυτή περιέχει τις δυο από τις τέσσερις υπομονάδες της CcO.

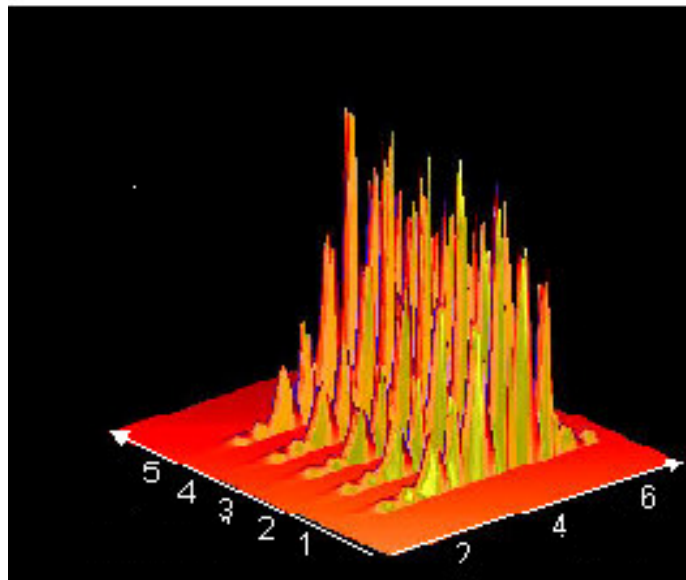
^{III} Άνθρακας: γκρι, Υδρογόνο: άσπρο, Άζωτο: μπλε, Οξυγόνο: κόκκινο, Χαλκός: πορτοκαλί, Σίδηρος: ανοιχτό μωβ.

1.6 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία θα ασχοληθούμε με μια ομάδα ενζύμων τις κυτοχρωμικές *c* οξειδάσες (CcO) οι οποίες-όπως αναφέρθηκε- βρίσκονται στην εσωτερική μιτοχονδρική μεμβράνη. Η μελέτη θα γίνει με τη μέθοδο της Μοριακής Δυναμικής. Πιο συγκεκριμένα θα μας απασχολήσουν τα εξής ερωτήματα:

1. Πώς συμπεριφέρεται το ενεργό κέντρο (αποτελούμενο από 100 περίπου άτομα) της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης (CcO) στην αλλαγή της διηλεκτρικής σταθεράς;
2. Ποιά είναι η δυναμική του ενεργού κέντρου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης (CcO) και ποια είναι τα φασματοσκοπικά του χαρακτηριστικά σε διάφορες θερμοκρασίες;
3. Ποια είναι η δυναμική της πρωτεΐνης και ποιά είναι τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της $\nu(\text{Fe-O})$ σε διάφορες θερμοκρασίες;
4. Πως δικαιολογείται η ύπαρξη των χαρακτηριστικών συχνοτήτων $790/804 \text{ cm}^{-1}$ στο ίδιο επίπεδο οξειδωσης (κατά $3e^-$) στον καταλυτικό κύκλο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης;

2. ΜΟΡΙΑΚΑ ΔΥΝΑΜΙΚΑ



2.1 Εξίσωση του Schrödinger για μοριακά συστήματα

Αν σ' ένα μόριο θεωρήσουμε το δυναμικό του ανεξάρτητο του χρόνου, τότε η εξίσωση του *Schrödinger*^[40] για το μόριο αυτό λαμβάνει τη μορφή:

$$\hat{H}\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = E\Psi(\vec{r}, \vec{R}) \quad (1.1)$$

Όπου :

r είναι οι συντεταγμένες των ηλεκτρονίων.

R είναι οι συντεταγμένες των πυρήνων.

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_N + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{NN} + \hat{V}_{eN} \quad (1.2)$$

είναι ο συνολικός χαμιλτωνιανός τελεστής.

\hat{T}_e είναι ο τελεστής της κινητικής ενέργειας των ηλεκτρονίων.

\hat{T}_N είναι ο τελεστής της κινητικής ενέργειας των πυρήνων.

\hat{V}_{ee} είναι ο τελεστής της δυναμικής ενέργειας των αλληλεπιδράσεων *Coulomb* μεταξύ των ηλεκτρονίων.

\hat{V}_{NN} είναι ο τελεστής της δυναμικής ενέργειας των αλληλεπιδράσεων *Coulomb* μεταξύ των πυρήνων.

\hat{V}_{eN} είναι ο τελεστής της δυναμικής ενέργειας των αλληλεπιδράσεων *Coulomb* μεταξύ ηλεκτρονίων και πυρήνων.

2.2 Προσέγγιση Born – Oppenheimer

Στην προσέγγιση Born – Oppenheimer θεωρούμε την κίνηση των πυρήνων αμελητέα (για μικρή χρονική περίοδο) σε σχέση με εκείνη των ηλεκτρονίων. Αυτό γιατί τα πρωτόνια έχουν 1836 φορές μεγαλύτερη μάζα από τα ηλεκτρόνια. Έτσι μπορούμε να διαχωρίσουμε τον χαμιλτωνειανό τελεστή σε ηλεκτρονικό και πυρηνικό μέρος και να πάρουμε δύο κυματοσυναρτήσεις και δύο εξισώσεις *Schrödinger*, μια για τα ηλεκτρόνια και μια για τους πυρήνες. Η συνολική κυματοσυνάρτηση θα είναι το γινόμενο των δύο κυματοσυναρτήσεων.

Η ηλεκτρονική κυματοσυνάρτηση θα είναι συνάρτηση των θέσεων r των ηλεκτρονίων και των παραμετρικών αποστάσεων θέσης R των πυρήνων σύμφωνα με τη σχέση:

$$\hat{H}_e \Psi_e(\vec{r}; \vec{R}) = E_e(\vec{R}) \Psi_e(\vec{r}; \vec{R}) \quad (1.3)$$

Όπου: $E_e(\vec{R})$ είναι η ενεργός δυναμική συνάρτηση των πυρήνων. Αυτή εξαρτάται από τη θέση των πυρήνων και περιγράφει τη δυναμική ενεργειακή καμπύλη ενός διατομικού μορίου ή τη δυναμική ενεργειακή επιφάνεια¹ ενός μορίου με πάνω από δυο άτομα.

$$\hat{H}_e = \hat{T}_e + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{eN} + \hat{V}_{NN}$$

επειδή $\hat{T}_N = 0$ και \hat{V}_{NN} είναι μια σταθερά. (Βλέπε Εξίσωση 1.2)

Η λύση της εξίσωσης (1.3) σε μια συγκεκριμένη διαπυρηνική απόσταση \vec{R} , μας δίνει τις ηλεκτρονιακές ενέργειες του μορίου.

Η εξίσωση *Schrödinger* για την κίνηση των πυρήνων είναι:

¹ Θα αναφερθούμε εκτενώς στην επόμενη παράγραφο.

$$\hat{H}_N \Psi_N(\vec{R}) = E_N(\vec{R}) \Psi_N(\vec{R}) \quad (1.4)$$

$$\text{όπου } \hat{H}_N = \hat{T}_N + E_e(\vec{R})$$

Η λύση της εξίσωσης (1.4) μας δίνει τις περιστροφικές^I και δονητικές ενέργειες του μορίου.

Συνοψίζοντας, η προσέγγιση Born – Oppenheimer^{II} συνίσταται σε τρία στάδια:

- I. Θεωρούμε ότι η συνολική κυματοσυνάρτηση του μορίου μπορεί να γραφεί ως γινόμενο μιας ηλεκτρονιακής και μιας πυρηνικής κυματοσυνάρτησης:

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \Psi_e(\vec{r}; \vec{R}) \times \Psi_N(\vec{R})$$

- II. Λύνουμε το ηλεκτρονικό πρόβλημα (εξ. 1.3) θεωρώντας τους πυρήνες παγωμένους στις διάφορες θέσεις \vec{R} (δηλαδή το \vec{R} είναι μία παράμετρος) και λαμβάνουμε την ενέργεια $E_e(\vec{R})$
- III. Λύνουμε την πυρηνική εξίσωση Schrödinger (εξ. 1.4) χρησιμοποιώντας το $E_e(\vec{R})$ που υπολογίσαμε στο προηγούμενο στάδιο.

Η επίλυση της εξίσωσης (1.1) για κάποιο μοριακό σύστημα δεδομένης χαμιλτονιανής μπορεί να δώσει κυματοσυναρτήσεις και ιδιοτιμές ενέργειας οι οποίες να το περιγράφουν πλήρως. Ωστόσο, αν και η διατύπωση της χαμιλτονιανής είναι σχετικά εύκολη ακόμη και για ένα σύστημα πολλαπλών πυρήνων και ηλεκτρονίων η ακριβής λύση της εξίσωσης είναι αδύνατη. Πρέπει επομένως να γίνουν προσεγγίσεις προκειμένου να απλοποιηθεί και τελικά να επιλυθεί, προσεγγιστικά μεν, με πρακτική ακρίβεια δε.

Οι υπολογιστικές μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται στην κβαντική μηχανική, διαφοροποιούνται μεταξύ τους ανάλογα με τις προσεγγίσεις

^I Ο τελεστής \hat{T}_N περιέχει δονητική και περιστροφική κινητική ενέργεια.

^{II} Η αρχική δημοσίευση είναι: M. Born and R. Oppenheimer, Zur Quantentheorie der Molekeln, Ann. Phys. (Leipzig), 84 (20), 457 (1927).

όπου εφαρμόζονται κάθε φορά. Συνοπτικά αναφέρουμε τρεις διαφορετικές υπολογιστικές μεθόδους επίλυσης της ηλεκτρονικής εξίσωσης Schrödinger:

1. *Ab initio* μέθοδος. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στη προσέγγιση της κυματοσυνάρτησης του μορίου ως γραμμικού συνδυασμού ατομικών τροχιακών (linear combination of atomic orbitals, LCAO)^[40]. Το σύνολο των κυματοσυναρτήσεων οι οποίες περιγράφουν τα ατομικά αυτά τροχιακά ονομάζεται σύνολο βάσης (basis set) και η μορφή τους επηρεάζει την ακρίβεια της μεθόδου.
2. *Ημι-εμπειρική* μέθοδος (semi-empirical method). Αυτή η μέθοδος δέχεται κάποια παραμετροποίηση προκειμένου να απλοποιηθεί η διαδικασία επίλυσης της κυματοσυνάρτησης. Οι παράμετροι προκύπτουν από εργαστηριακά πειράματα ή αποτελέσματα *ab initio* υπολογισμών σε συστήματα – πρότυπα. Εν συγκρίσει με τις άλλες δύο μεθόδους μπορεί να χειριστεί μεγαλύτερα μοριακά συστήματα.
3. Μέθοδος *θεωρίας συναρτησιακού της ηλεκτρονικής πυκνότητας* (density functional theory method, DFT method). Όπως η *ab initio* μέθοδος, έτσι και η DFT μέθοδος στηρίζεται στην LCAO προσέγγιση. Επιπλέον ο υπολογισμός της ενέργειας του συστήματος δε βασίζεται στην κυματοσυνάρτηση που το περιγράφει αλλά στην ηλεκτρονική πυκνότητα.

2.3 Μοριακές Δυναμικές Ενεργειακές Επιφάνειες (ΔΕΕ)

Για διαφορετικές θέσεις των πυρήνων σύμφωνα με τα παραπάνω υπολογίζεται και διαφορετική δυναμική ενέργεια. Και κατά αυτό τον τρόπο (επιλύοντας την ηλεκτρονική εξίσωση *Schrödinger*) κατασκευάζεται μια επιφάνεια δυναμικής ενέργειας. Γνωρίζουμε πως σταθερή κατάσταση μορίου είναι αυτή όπου εκφράζεται από ελάχιστη τιμή ενέργειας. Η επιφάνεια δυναμικής ενέργειας που χαρτογραφείται υποδεικνύει αυτά τα ελάχιστα, τοπικά ή ολικά, καθώς επίσης τα μέγιστα, τοπικά ή ολικά και τα σαγματικά σημεία – ασταθής ισορροπία (saddle points). Η επιφάνεια δυναμικής ενέργειας βέβαια δεν εξαρτάται μόνο από τις θέσεις των πυρήνων αλλά οι διαστάσεις της εξαρτώνται από τους βαθμούς ελευθερίας του μορίου.

Ένα μόριο που αποτελείται από N άτομα έχει $3N$ βαθμούς ελευθερίας, εκ των οποίων οι τρεις περιγράφουν τη μετατόπιση του κέντρου βάρους του και άλλοι τρεις την περιστροφή του γύρω από τους τρεις καρτεσιανούς άξονες. Συνεπώς, μένουν $3N-6$ βαθμοί ελευθερίας για να περιγράψουν τις ταλαντώσεις (δονήσεις) του μορίου. Στην περίπτωση γραμμικών μορίων αρκούν δύο βαθμοί ελευθερίας για την περιγραφή της περιστροφής και επομένως οι δονητικοί βαθμοί ελευθερίας γίνονται $3N-5$. Οι βασικοί αυτοί τρόποι δόνησης του μορίου ($3N-6$, ή $3N-5$) ονομάζονται κανονικοί τρόποι δόνησης (normal vibrations, ή normal vibrational modes)¹, δεδομένου ότι οποιαδήποτε δόνηση του μορίου μπορεί να περιγραφεί ως γραμμικός συνδυασμός των κανονικών τρόπων δόνησεως.

¹ Στους κανονικούς τρόπους δόνησης, όλα τα άτομα του μορίου δονούνται με την ίδια συχνότητα και περνούν ταυτόχρονα από τις θέσεις ισορροπίας.

Οι παραπάνω τρόποι δόνησης μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες:

- Παραμορφώσεις δεσμών
- Μεταβολές επίπεδων γωνιών
- Μεταβολές δίεδρων γωνιών – Improper
- Μεταβολές δίεδρων γωνιών – Torsion

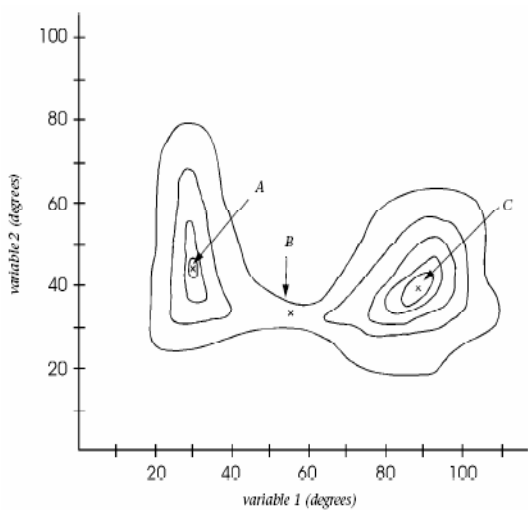
Με κάθε μία από αυτές τις κατηγορίες θα ασχοληθούμε παρακάτω.

Για ένα πολυατομικό μόριο με $3N - 5$ ή $3N - 6$ δονήσεις απαιτούνται $[(3N - 5) + 1]$ ή $[(3N - 6) + 1]$ διαστάσεις για να παρασταθεί η μεταβολή της δυναμικής ενέργειας σε σχέση με όλες τις συντεταγμένες^[41]. Μία τέτοια υπερεπιφάνεια δεν είναι δυνατόν να σχεδιαστεί και αυτό το οποίο γίνεται είναι να παίρνουμε ένα τμήμα της επιφάνειας κάθε φορά, που να αντιστοιχεί σε δύο διαστάσεων μεταβολή της δυναμικής ενέργειας ως προς κάποια συντεταγμένη. Έτσι σχηματίζεται μία δυναμική ενεργειακή καμπύλη για κάθε συντεταγμένη, το άθροισμα των οποίων μας δίνει τη συνολική συμπεριφορά του μορίου κατά τη διέγερση του.

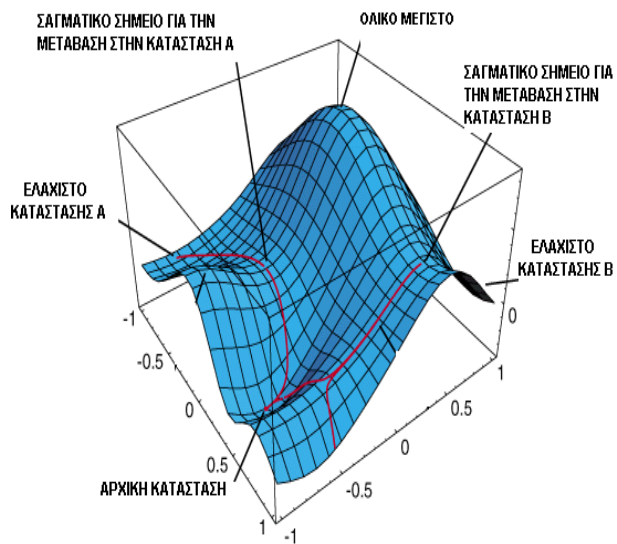
Για δύο ανεξάρτητες μεταβλητές η επιφάνεια δυναμικής ενέργειας είναι τρισδιάστατη.

Στην παρακάτω δύο διαστάσεων **Εικόνα 2.1α** βλέπουμε δύο τοπικά ελάχιστα στις δομές των σημείων A και C και ένα σαγματικό σημείο στη θέση B. Επίσης καταλαβαίνουμε από το σχήμα (λόγο της πυκνότητας των καμπύλων γραμμών) ότι η κατάσταση στο σημείο C είναι πιο σταθερή. Μια τριών διαστάσεων απεικόνιση φαίνεται στην **Εικόνα 2.1β**. Για να μπορέσει το σώμα να μεταβεί στην κατάσταση A ή B πρέπει να αποκτήσει ενέργεια μεγαλύτερη από αυτή του αντίστοιχου σαγματικού

σημείου. Πρέπει δηλαδή, να υπερπηδήσει το αντίστοιχο 'φράγμα δυναμικού' (Barrier).



Εικόνα 2.1α
ΔΕΕ με δύο ανεξάρτητες μεταβλητές
δύο διαστάσεων



Εικόνα 2.1β
ΔΕΕ με δύο ανεξάρτητες μεταβλητές
τριών διαστάσεων

2.4 Διατομικό μόριο

Ας επικεντρωθούμε στην περίπτωση ενός διατομικού μορίου.

Θεωρούμε ότι το μόριο αυτό περιγράφεται από μια (οποιαδήποτε) καμπύλη δυναμικής ενέργειας. Στην περιοχή κοντά στο μήκος ισορροπίας του δεσμού r_e η καμπύλη δυναμικής ενέργεια παρουσιάζει ελάχιστο. Στο σημείο αυτό (σημείο ευσταθούς ισορροπίας) θέτουμε την αρχή των αξόνων. Άρα τώρα το r_e αντιστοιχεί στο $x=0$. Όπου $x=r-r_e$. Αφού αυτό το σημείο είναι ελάχιστο της καμπύλης δυναμικής ενέργειας θα έχουμε:

$$\left(\frac{\partial V}{\partial x}\right)_0 = 0 \text{ και } \left(\frac{\partial^2 V}{\partial x^2}\right)_0 = k > 0 \quad (1)$$

Αν αναπτύξουμε τώρα την συνάρτηση $V(x)$ σε δυναμοσειρά Taylor¹ γύρω από το $x=0$ παίρνουμε:

$$V(x) = V(0) + \left(\frac{\partial V}{\partial x}\right)_0 x + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial x^2}\right)_0 x^2 + \dots$$

Έχουμε $V(0)=0$ γιατί έτσι επιλέξαμε την αρχή των αξόνων, $\left(\frac{\partial V}{\partial x}\right)_0 = 0$

ως σημείο ισορροπίας και $\left(\frac{\partial^2 V}{\partial x^2}\right)_0 = k$. Οπότε η δυναμοσειρά γίνεται:

$$V(x) = \frac{1}{2} kx^2 + \dots$$

¹ Ανάπτυγμα Taylor: $\sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^n(a)}{n!} (x-a)^n = f(a) + \frac{f'(a)}{1!} (x-a) + \frac{f''(a)}{2!} (x-a)^2 + \dots$

Οι ανώτερες δυνάμεις στο ανάπτυγμα μπορούν να αμεληθούν για μικρά x (δηλαδή για μικρές ταλαντώσεις γύρω από το σημείο ισορροπίας) και έτσι επιζεί μόνο ο «παραβολικός όρος» που μας παρέχει μια ικανοποιητική προσέγγιση του αρχικού δυναμικού στη γειτονιά του ελαχίστου.

Τα παραπάνω μας δίνουν με σαφήνεια την σπουδαιότητα του παραβολικού–αρμονικού δυναμικού. Η σπουδαιότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελεί μια πολύ καλή προσέγγιση οποιοδήποτε δυναμικού στη γειτονία ενός σημείου ευσταθούς ισορροπίας του (**Εικόνα 2.2**).

Από φυσικής άποψης το k είναι η σταθερά της δύναμης του δεσμού. Μεγάλο k σημαίνει περισσότερο άκαμπτος δεσμός. Σε αυτή την περίπτωση η καμπύλη δυναμικής ενέργειας (που τώρα ξέρω ότι είναι παραβολή) είναι οξεία κοντά στο ελάχιστό της. Αντιστρόφως, αν η καμπύλη δυναμικής ενέργειας είναι φαρδιά και ρηχή, το k θα είναι μικρό.

Η εξίσωση Schrödinger για τη σχετική κίνηση των δύο ατόμων (του διατομικού μορίου) με μάζες m_1 και m_2 με παραβολική δυναμική ενέργεια είναι:

$$-\frac{\hbar^2}{2m_r} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \frac{1}{2} kx^2 \psi = E \psi$$

όπου m_r είναι η ενεργή μάζα: $m_r = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$. Αν $m_1 = m_2$ τότε $m_r = \frac{m}{2}$.

Τα επιτρεπτά ενεργειακά επίπεδα δονήσεων είναι:

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) \hbar \omega \quad \text{όπου } n=0,1,2,\dots \quad \text{και } \omega = \left(\frac{k}{m_r}\right)^{\frac{1}{2}}$$

Επίσης για τον ορισμό του κυματάριθμου $\tilde{\nu}$ έχουμε:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad \text{όπου } c \text{ η ταχύτητα του φωτός και } \omega = 2\pi\nu = 2\pi c\tilde{\nu}$$

Οι παραπάνω εξισώσεις σε συνδυασμό με την (1) της προηγούμενης σελίδας μας δίνουν:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \left(\frac{1}{m_r} \right)^{\frac{1}{2}} \left[\left(\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} \right)_0 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

Η σχέση αυτή δίνει την εξάρτηση της συχνότητας (κυματάριθμου) από το δυναμικό. Η (2) με τη βοήθεια της (1) μπορεί επίσης να γραφεί:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \left(\frac{k}{m_r} \right)^{\frac{1}{2}}$$

2.5 Εμπειρικά δυναμικά – Πεδία δυνάμεων

Στη Μοριακή Μηχανική, η ολική ενέργεια του συστήματος που μελετάμε δίνεται ως το άθροισμα επιμέρους αλληλεπιδράσεων. Οι αλληλεπιδράσεις εκφράζονται με αρμονικές (ή περισσότερο πολύπλοκες) δυνάμεις μεταξύ δέσμιων ατόμων και με δυνάμεις Van der Waals και ηλεκτροστατικές μεταξύ των μη δέσμιων ατόμων. Μαθηματικές συναρτήσεις των ατομικών συντεταγμένων ή άλλων δομικών παραμέτρων, χρησιμοποιούνται για την αναλυτική περιγραφή αυτών των αλληλεπιδράσεων.

Κάθε τέτοια περιγραφή, κάθε σύνολο δηλαδή εξισώσεων και αντίστοιχων παραμέτρων, αποτελεί και ένα πεδίο δυνάμεων (force field). Η παραμετροποίηση αυτών των συναρτήσεων γίνεται με βάση πειραματικές παρατηρήσεις σε πραγματικά μόρια ή ab-initio υπολογισμούς.

Η ολική ενέργεια του συστήματος δίνεται από τον τύπο:

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

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

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

και περιγράφει αλληλεπιδράσεις μεταξύ μη δέσμιων ατόμων (non-bonded interactions). Συνήθως οι τελευταίες δεν υπολογίζονται για κάθε ζεύγος μη δέσμιων ατόμων παρά μόνο για όσα τα χαρακτηρίζει

απόσταση μεταξύ των ατόμων μικρότερη από μία μέγιστη. Η μέγιστη αυτή απόσταση ονομάζεται απόσταση αποκοπής (*cut off distance*). Παρακάτω αναφέρονται οι πιο συνηθισμένες μορφές των σχέσεων που περιγράφουν τις προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις .

2.5.1 Παραμορφώσεις δεσμών

2.5.1.1 Αρμονικό δυναμικό

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

$$V_{bonds} = \sum_{bonds} k_r (r - r_e)^2$$

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

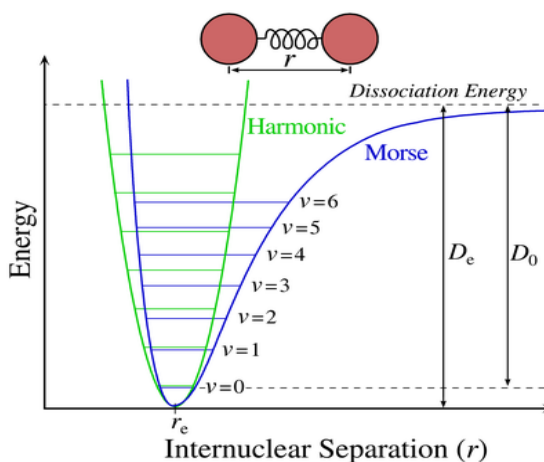
Αν και γνωρίζουμε πως η συνάρτηση του Morse περιγράφει καλύτερα το δυναμικό ενός μοριακού δεσμού αυτή δε χρησιμοποιείται πάντα καθώς η παραπάνω αρμονική συνάρτηση προσεγγίζει καλά την πρώτη στο σημείο ισορροπίας και υπολογίζεται πολύ πιο γρήγορα.

2.5.1.2 Δυναμικό Morse

Η συνάρτηση του Δυναμικού Morse είναι της μορφής:

$$V(r) = D_e(1 - e^{-a(r-r_e)})^2$$

Εδώ το r είναι η απόσταση ανάμεσα στα άτομα, r_e η απόσταση ισορροπίας του δεσμού, D_e η ενέργεια διάσπασης του μορίου. Το a ελέγχει το «πλάτος» του δυναμικού.



Εικόνα 2.2
Αρμονικό και Morse δυναμικό

Η πειραματική ενέργεια διάσπασης του δεσμού D_0 , μπορεί να υπολογιστεί αφαιρώντας την ενέργεια μηδενικού σημείου zero point από το βάθος του πηγαδιού. Η σταθερά της δύναμης (force constant) του δεσμού μπορεί να βρεθεί παίρνοντας τη δεύτερη παράγωγο της συνάρτησης της δυναμικής ενέργειας (Βλέπε παράγραφο 2.4). Έτσι βρίσκουμε ότι η παράμετρος, a , είναι

$$a = \sqrt{k_e/2D_e}$$

όπου k_e είναι η σταθερά της δύναμης στο κατώτατο σημείο του πηγαδιού. Παρατηρώντας την **Εικόνα 2.2** βλέπουμε ότι (σε αντίθεση με αρμονικό δυναμικό) όσο ανεβαίνουμε ενεργειακές στάθμες, τόσο τα επίπεδα πλησιάζουν μεταξύ τους. Η ιδιότητα αυτή του δυναμικού Morse ταιριάζει με την ανααρμονικότητα που συναντάμε στα πραγματικά μόρια.

2.5.2 Μεταβολές επίπεδων γωνιών

Το άνοιγμα ή κλείσιμο γωνιών (angle bending) -όπως αυτές προκύπτουν ως κορυφές σχηματιζόμενες στο επίπεδο από τρία άτομα- από τη θέση ισορροπίας μεταβάλλουν την ενέργεια ενός μορίου. Το δυναμικό το οποίο χρησιμοποιείται για να περιγραφεί μια τέτοια μεταβολή είναι αρμονικής μορφής και έχει ως ακολούθως:

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

Παράμετρος δυναμικού πεδίου εδώ είναι η k_{θ} . Περιγράφει τη δυσκολία με την οποία μεταβάλλονται αυτές οι γωνίες ενώ έχει διαφορετική τιμή για κάθε τριάδα ατόμων. Με θ_0 περιγράφεται η γωνία ισορροπίας.

2.5.3 Μεταβολές διεδρων γωνιών

Διεδρη γωνία ονομάζεται η γωνία όπου σχηματίζουν δύο τεμνόμενα επίπεδα. Μεταβολή σε μια διεδρη γωνία ενός μορίου (μετέχουν τέσσερα άτομα) συνεπάγεται μεταβολή και στην ενέργεια του. Έχουμε δύο ειδών μεταβολές διεδρων γωνιών.

- I. Αν στο σχηματισμό της διεδρης γωνίας που μεταβάλλεται υπάρχει άτομο το οποίο ενώνεται με τρία άλλα άτομα, τότε το δυναμικό που αντιστοιχεί στη μεταβολή αυτή το χαρακτηρίζουμε ως *improper* και το περιγράφουμε με την εξίσωση:

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

Παράμετρος δυναμικού πεδίου εδώ είναι η k_ω . Περιγράφει τη δυσκολία με την οποία μεταβάλλονται αυτές οι γωνίες ενώ έχει διαφορετική τιμή για κάθε τετράδα ατόμων. Με ω_0 περιγράφεται η γωνία ισορροπίας.

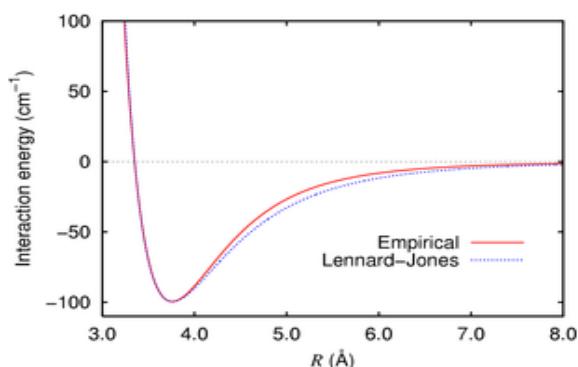
II. Αν στο σχηματισμό της δίδερης γωνίας που μεταβάλλεται κάθε άτομο ενώνεται το πολύ με άλλα δύο, τότε το δυναμικό που αντιστοιχεί στη μεταβολή αυτή το χαρακτηρίζουμε ως *torsion* και το περιγράφουμε με την εξίσωση.

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

Η παράμετρος δυναμικού πεδίου V_n καθορίζει την ευκολία με την οποία μεταβάλλεται η δίδερη γωνία και είναι διαφορετική για διαφορετική τετράδα ατόμων. Τέλος το n καθορίζει την περιοδικότητα της καμπύλης η οποία προκύπτει από την παραπάνω σχέση.

2.5.4 Αλληλεπιδράσεις wan der Waals

Τα ουδέτερα άτομα και μόρια αλληλεπιδρούν με δύο διαφορετικές δυνάμεις. Τη δύναμη μεγάλης απόστασης η οποία είναι ελκτική και τη μικρής απόστασης η οποία είναι απωστική δύναμη.



Εικόνα 2.3
Lennard Jones δυναμικό

Τα δύο αυτά είδη δυνάμεων μαζί χαρακτηρίζονται ως δυνάμεις wan der Waals. Οι δυνάμεις αυτές δημιουργούνται όταν δύο άτομα βρεθούν σε απόσταση 3 έως 5 Å μεταξύ τους. Παρ' ότι είναι ασθενέστερες των ηλεκτροστατικών δυνάμεων και των δεσμών υδρογόνου (τα είδη αυτών των δυνάμεων θα τα δούμε παρακάτω), δεν είναι λιγότερο σημαντικές για τα βιολογικά συστήματα. Ο δεσμός wan der Waals προκύπτει εξ αιτίας του ότι η κατανομή του ηλεκτρικού φορτίου γύρω από τα άτομα αλλάζει με το χρόνο. Σε μια δεδομένη στιγμή η κατανομή του φορτίου δεν είναι απολύτως συμμετρική. Αυτή η ασύμμετρη κατανομή ηλεκτρικών φορτίων γύρω από ένα άτομο, ενθαρρύνει μια παρόμοια ασυμμετρία στην κατανομή ηλεκτρονίων στο ίδιο το άτομο αλλά (επαγωγικά) και στα γειτονικά του άτομα. Όταν έχουμε αλληλεπίδραση φορτίου-ατόμου (φορτίο με επαγόμενο δίπολο) τότε η αλληλεπίδραση είναι της μορφής σ/r^4 . Το σ είναι μια σταθερά. Όταν έχουμε αλληλεπίδραση μεταξύ δυο πολωμένων ατόμων (δίπολο-δίπολο) τότε η αλληλεπίδραση είναι της μορφής σ/r^6 . Η συνεπαγόμενη έλξη μεταξύ ενός ζεύγους ατόμων αυξάνει καθώς αυτά πλησιάζουν, μέχρι να φθάσουν την απόσταση wan der Waals. Σε αποστάσεις μικρότερες από αυτήν αναπτύσσονται πολύ ισχυρές απωστικές δυνάμεις. Η απωστική δύναμη είναι το αποτέλεσμα των αλληλεπικαλυπτόμενων τροχιακών των ηλεκτρονίων, που αναφέρονται ως άπωση Pauli (ή απαγορευτική αρχή του Pauli). Το δυναμικό Lennard-Jones (επίσης καλούμενο ως δυναμικό L-J ή 6-12 δυναμικό) είναι ένα απλό μαθηματικό πρότυπο που αντιπροσωπεύει αυτή την συμπεριφορά.

Το δυναμικό L-J είναι της μορφής:

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

Όπου ϵ είναι το βάθος του δυναμικού στο πηγάδι και σ είναι η (πεπερασμένη) απόσταση στην οποία το διαμοριακό δυναμικό είναι μηδέν.

Αυτές οι παράμετροι μπορούν να προσαρμοστούν για να αναπαραγάγουν τα πειραματικά δεδομένα ή να τις συνάγουμε από τα αποτελέσματα υπολογισμών ακριβείας της κβαντικής χημείας. Ο όρος $\left(\frac{1}{r}\right)^{12}$ περιγράφει την άπωση και ο όρος $\left(\frac{1}{r}\right)^6$ περιγράφει την έλξη.

Το δυναμικό L-J είναι προσεγγιστικό. Η μορφή του απωστικού όρου δεν έχει καμία θεωρητική αιτιολόγηση. Η δύναμη άπωσης θα έπρεπε να εξαρτηθεί εκθετικά από την απόσταση, [δυναμικό Buckingham

$$U(r_{ij}) = A \exp\left(-\frac{r_{ij}}{\rho}\right) - \frac{C}{r_{ij}^6}]$$

αλλά ο όρος άπωσης του τύπου L- J είναι

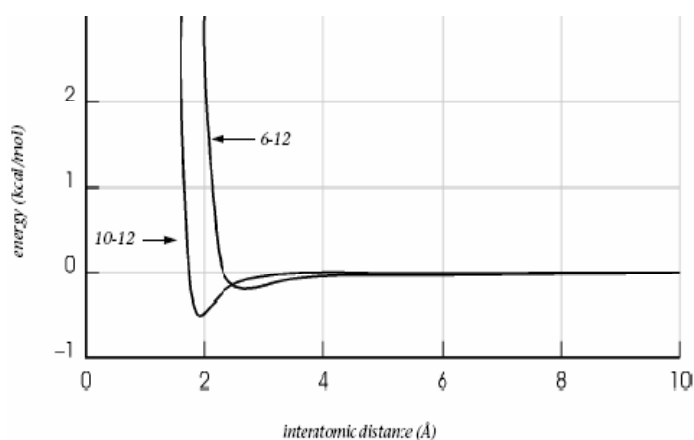
καταλληλότερος εξαιτίας της ευκολίας του υπολογισμού του r^{12} ως τετράγωνο του r^6 . Στη γραφική παράσταση (**Εικόνα 2.3**) φαίνεται το δυναμικό Lennard-Jones για το διμερές του Αργού. Παρατηρείται μικρή απόκλιση από το ακριβές εμπειρικό δυναμικό, λόγω της ανακριβούς περιγραφής της που οφείλεται στον όρο $\left(\frac{1}{r}\right)^{12}$.

Επιπλέον, ορισμένα δυναμικά πεδία χρησιμοποιούν για μεγαλύτερη ακρίβεια ένα αντίστοιχο 10-12 δυναμικό για να περιγράψουν την αλληλεπίδραση μεταξύ ατόμων όπου συμμετέχουν σε **δεσμό υδρογόνου**. Όπως υποδηλώνει το όνομα "δεσμός υδρογόνου", ένα μέλος του δεσμού περιλαμβάνει ένα άτομο υδρογόνου. Το άτομο του υδρογόνου συνδέεται με ένα από τα στοιχεία οξυγόνο O , άζωτο N ή φθόριο F , που είναι όλα

τους ισχυρά ηλεκτραρνητικά στοιχεία. Αυτά τα στοιχεία είναι γνωστά ως οι δότες του δεσμού υδρογόνου. Το ηλεκτραρνητικό στοιχείο (*O,N,F*) προσελκύει το ηλεκτρονικό νέφος του υδρογόνου στην περιοχή του και αφήνει το άτομο με θετικό μερικό φορτίο. Λόγω του μικρού μεγέθους του υδρογόνου σε σχέση με άλλα άτομα και μόρια, το προκύπτον φορτίο, αν και μόνο μερικό, εν τούτοις αντιπροσωπεύει μια σημαντική πυκνότητα φορτίου. Ένας δεσμός υδρογόνου προκύπτει όταν αυτή η ισχυρή θετική κατανομή φορτίου προσελκύει ένα ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων ενός άλλου ατόμου, που γίνεται ο δέκτης του δεσμού υδρογόνου. Ο δέκτης είναι επίσης άτομο οξυγόνου ή αζώτου. Τυπικά μήκη δεσμών υδρογόνου φαίνονται στον πίνακα 2.1 .

Ο δεσμός υδρογόνου είναι ένα ιδιαίτερο είδος διαμοριακής δύναμης. Συγκεκριμένα συνδέει μόρια όπως εκείνα του νερού στον πάγο. Τα άτομα του υδρογόνου ενός μορίου νερού που βρίσκονται εκατέρωθεν εκείνου του οξυγόνου έλκονται από άτομα οξυγόνου δύο γειτονικών μορίων με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πλέον τρισδιάστατες μοριακές ενώσεις. Αυτή ακριβώς η έλξη είναι εκείνη που κάνει στερεό το νερό, δηλαδή πάγο. Σε αυτή την περίπτωση έχουμε ένα δυναμικό της μορφής:

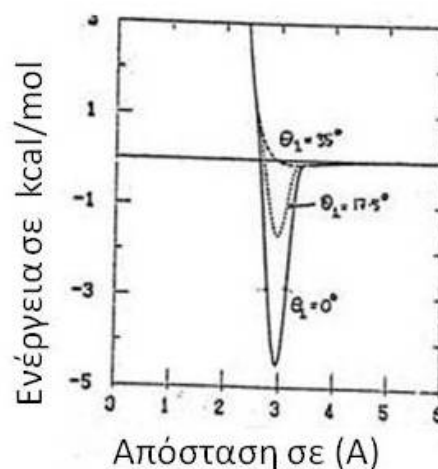
$$V(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^{10} \right]$$



Εικόνα 2.4

Οι δύο συναρτήσεις (6-12 και 10-12) τείνουν να ταυτιστούν για μεγάλες αποστάσεις

Η ενεργειακή συμμετοχή των υδρογονικών δεσμών είναι υψηλή γιατί παρ' ότι τα συμμετέχοντα μερικά ηλεκτροστατικά φορτία είναι μικρά, τα αλληλεπιδρώντα άτομα είναι κοντά γιατί (όπως προαναφέραμε) τα άτομα υδρογόνου είναι μερικά απογυμνωμένα από το ηλεκτρονικό τους φορτίο. Στο διπλανό σχήμα φαίνεται (Εικόνα 2.5) η σχέση ενέργειας απόστασης και γωνίας μεταξύ τριών εμπλεκόμενων ατόμων στον δεσμό υδρογόνου.



Εικόνα 2.5
Σχέση ενέργειας απόστασης και γωνίας μεταξύ τριών εμπλεκόμενων ατόμων στον δεσμό υδρογόνου.

Παρατηρούμε ότι όσο τα άτομα προσεγγίζουν την ευθεία τόσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός. Σε αυτή την περίπτωση το πρωτόνιο είναι ακριβώς στη μέση μεταξύ των δύο ατόμων.

Η άπωση μεταξύ των ηλεκτρονίων του ενός ατόμου με τα ηλεκτρόνια του άλλου γίνεται ελάχιστη.

Πίνακας 2.1 Τυπικά μήκη δεσμών υδρογόνου ^[42]	
Δεσμός	Μήκος σε (Å)
O-H...O	2,70
O-H...O ⁻	2,63
O-H...N	2,88
N-H...O	3,04
N ⁺ -H...O	2,93
N-H...N	3,10

2.5.5 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

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

$$V_{ij} = -332.0 \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \quad (6)$$

όπου q_i, q_j τα φορτία των ατόμων i, j σε μονάδες ηλεκτρονικού φορτίου, r_{ij} η απόσταση των ατόμων i, j σε Å και D η διηλεκτρική σταθερά του μέσου. Η σταθερά 332.0 έχει εκλεγεί έτσι ώστε η ενέργεια να

υπολογίζεται σε $\frac{\text{kcal}}{\text{mole}}$. Η χρήση της σχέσης αυτής συνεπάγεται γνώση της διηλεκτρικής σταθεράς D . Πρέπει ν' αναφέρουμε ότι υπάρχουν αμφιβολίες για το ποια τιμή του D πρέπει να χρησιμοποιηθεί. Ένα πρόσθετο πρόβλημα είναι η εύρεση της κατανομής του φορτίου στο μόριο που εξετάζεται (για μικρά μόρια μπορεί να γίνει με κβαντομηχανικούς υπολογισμούς).

Παρακάτω θα δείξουμε τον τρόπο υπολογισμού της σταθεράς 332.0

$$e = 1,602 \times 10^{-19} \text{ c}$$

$$\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \frac{\text{c}^2}{\text{Jm}} \quad (\text{Διηλεκτρική σταθερά του κενού})$$

$$\frac{\text{joule}}{\text{kcal}} = 4184$$

$$N = 6,023 \times 10^{23} \quad (\text{Αριθμός Avogadro})$$

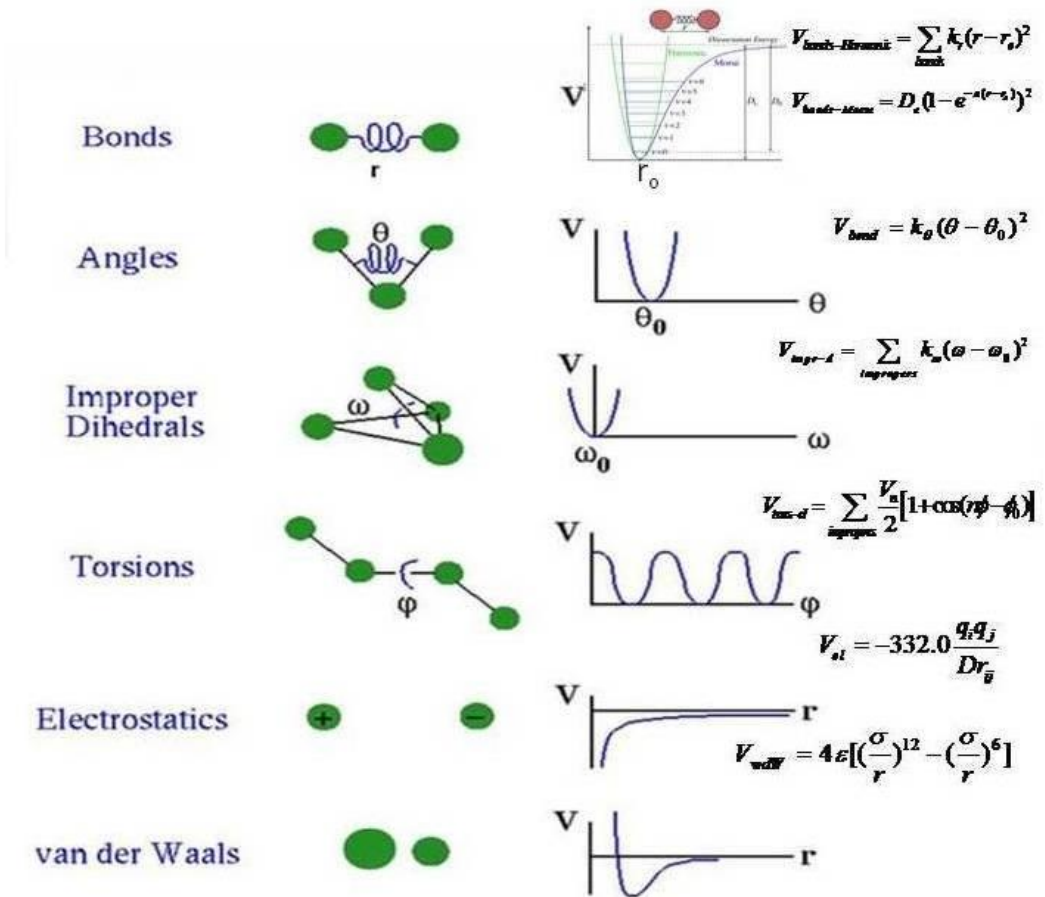
$$D = 4\pi\epsilon\epsilon_0 \quad \text{σε} \quad \frac{\text{c}^2}{\text{Jm}} \quad \text{ή} \quad \frac{\text{c}^2}{\text{Nm}^2}$$

r σε Å

$$V_{el} = factor \frac{q_i q_j}{Dr} \left(\frac{kcal}{mole} \right)$$

$$\text{Όπου: } factor = \frac{e^2 \times N \times 10^{10}}{4\pi \times \epsilon_0 \times 4184} = \frac{1,602^2 \times 6,022 \times 10^{23} \times 10^{10}}{4\pi \times 8,854 \times 10^{-12} \times 4184} = 332,0448462$$

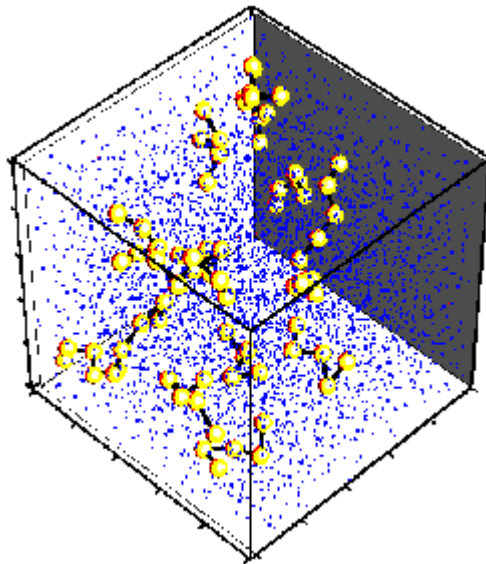
Οι αλληλεπιδράσεις σε μια αντιπροσωπευτική συνάρτηση δυναμικής ενέργειας



Εικόνα 2.6

Οι αλληλεπιδράσεις σε μια αντιπροσωπευτική συνάρτηση δυναμικής ενέργειας

3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος της μοριακής δυναμικής (molecular dynamics) είναι μια τεχνική προσομοίωσης η οποία στηρίζεται στην επίλυση των κλασικών εξισώσεων κίνησης για ένα σύστημα N σωματιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω ενός δυναμικού V , της μορφής που περιγράψαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Αποτελεί μια πολύ καλή προσέγγιση για τη μελέτη πληθώρας συστημάτων χωρίς την ανάγκη θεώρησης κβαντικών φαινομένων. Εργαζόμενοι σε συνθήκες σταθερής ενέργειας, αποτελεί μια ντετερμινιστική μέθοδο, δηλαδή για τις ίδιες αρχικές συνθήκες δίνει πάντα τα ίδια αποτελέσματα.

Για να είναι επαρκής η περιγραφή του υπό εξέταση συστήματος με κλασική μηχανική πρέπει οι μέσες διαμοριακές αποστάσεις να είναι

σαφέστατα μεγαλύτερες του κύματος de Broglie $\Lambda = \sqrt{\frac{h^2}{2\pi mk_B T}}$, όπου $E = k_B T$. Σε αντίθετη περίπτωση (π.χ. He) τα κβαντικά φαινόμενα είναι σημαντικά. Γενικά, σημαντικά κβαντικά φαινόμενα συναντάμε σε μικρά και γρήγορα κινούμενα σωματίδια.

3.1 Αρχικές συνθήκες

Ξεκινώντας τη μελέτη ενός συστήματος ορίζουμε τις αρχικές συνθήκες.

Αυτές είναι οι εξής:

- I. Οι ποσότητες θα μένουν σταθερές κατά τη διάρκεια της μελέτης του συστήματος μας π.χ. ενέργεια, όγκος, θερμοκρασία, αριθμός ατόμων κλπ. Με άλλα λόγια ορίζουμε με ποιο από τα στατιστικά μηχανικά σύνολα (*Ensembles*) θα δουλέψουμε^[43-44]. Στην παρούσα εργασία δουλέψαμε με κανονικό σύνολο (όγκος, θερμοκρασία, αριθμός ατόμων σταθερά).
- II. Αρχικές συντεταγμένες του συστήματος. Δίνουμε την ακριβή θέση των δομικών λίθων (ατόμων, ιόντων κλπ) του συστήματος μας στον τρισδιάστατο χώρο.
- III. Οι αρχικές ταχύτητες των δομικών λίθων (ατόμων). Αυτές προκύπτουν από την αρχική θερμοκρασία του συστήματος. Για κάθε βαθμό ελευθερίας η κινητική ενέργεια είναι $(1/2)kT$ (k είναι η σταθερά του Boltzmann). Το κάθε άτομο έχει τρεις βαθμούς ελευθερίας (τρεις κινητικούς) άρα $(3/2)kT$ ενέργεια. Αν θεωρήσουμε ότι αυτή η ενέργεια είναι μόνο κινητική (θέση ισορροπία του συστήματος), τότε για την ταχύτητα του κάθε ατόμου θα έχουμε: $u=(3kT/m)^{1/2}$, όπου m η μάζα του ατόμου.
- IV. Το 'βήμα-χρόνου' (time step) που θα χρησιμοποιήσουμε στην ολοκλήρωση. Θα δούμε παρακάτω τον τρόπο επιλογής του.

3.2 Εξισώσεις κίνησης

Η ταχύτητα \vec{u} ενός ατόμου i εξαρτάται από τις δυνάμεις που δέχεται από κάθε άλλο άτομο του συστήματος, όπως περιγράφεται από την εξίσωση του Newton : $F_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2}$.

Η ταχύτητα \vec{u} του κάθε ατόμου συνεισφέρει στην ολική κινητική ενέργεια του συστήματος. Ως γνωστό η ταχύτητα του ατόμου εξαρτάται από τη θερμοκρασία του συστήματος. Βασικό *συστατικό* της μοριακής δυναμικής είναι ο υπολογισμός της δύναμης για κάθε άτομο και από αυτή την πληροφορία, της θέσης του κάθε ατόμου μετά από μια καθορισμένη χρονική περίοδο συνήθως της τάξης των femtoseconds - fs. Η δύναμη που ασκείται σε κάθε άτομο μπορεί να υπολογιστεί από τη μεταβολή της ενέργειας του βάσει της σχέσης:

$$F_i = -\nabla V = \frac{\partial \vec{p}}{\partial t} \text{ και } p_i = m \frac{\partial \vec{r}_i}{\partial t}$$

Οι παραπάνω εξισώσεις μπορούν να εξαχθούν και από τον φορμαλισμό Lagrange. Εξάλλου η Λαγκρανζιανή προσέγγιση είναι ισοδύναμη με τη Νευτώνεια (Βλέπε Παράρτημα 2).

Βάση ορισμού η συνάρτησα *Lagrange* δίνεται από τη σχέση:

$$L(q, \dot{q}, t) = K - V$$

Όπου q είναι οι γενικευμένες συντεταγμένες που περιγράφουν μια μικροκατάσταση του συστήματος, και \dot{q} παριστά τις παραγώγους τους ως

προς το χρόνο t . K και V η κινητική και η δυναμική ενέργεια αντίστοιχα. Οι εξίσωση κίνησης περιγράφεται από τις σχέσεις:

$$\text{Euler-Lagrange εξισώσεις : } \frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{q}_i} \right) - \left(\frac{\partial L}{\partial q_i} \right) = 0 \quad (1)$$

Στην περίπτωση συστήματος N ατόμων με διανύσματα θέσεως r_i από $i=1$ έως N με κινητική ενέργεια K και δυναμική V θα έχουμε:

$$K = \sum_{i=1}^N \sum \frac{p_i^2}{2m_i} \quad \text{και} \quad V = \sum_i \sum_{j>i} V_2(r_i, r_j) + \sum_i \sum_{j>i} \sum_{k>j>i} V_3(r_i, r_j, r_k) + \dots$$

Οπότε η σχέση (1) παίρνει τη μορφή:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i \quad (2)$$

Όπου m_i είναι η μάζα του ατόμου i και F_i είναι η συνολική δύναμη του ατόμου i που προέρχεται από την αλληλεπίδραση αυτού με τα υπόλοιπα άτομα. Έχουμε:

$$F_i = -\nabla_{r_i} L = -\nabla_{r_i} V$$

Η ορμή μπορεί να οριστεί από τη σχέση:

$$p_i = \frac{\partial L(q, \dot{q}, t)}{\partial \dot{q}_i}$$

Από τη συνάρτηση Lagrange παίρνουμε τη συνάρτηση Hamilton (Χαμιλτονιανής) από τη σχέση:

$$H(q, p, t) = \sum_i \dot{q}_i p_i - L(q, \dot{q}, t)$$

Αν η L δεν έχει άμεση εξάρτηση από το χρόνο t , τότε η χαμιλτονιανή H εκφράζει την ολική ενέργεια του συστήματος (είναι η σταθερά κινήσεως). Οπότε έχουμε:

$$H(p, q) = K(p) + V(q)$$

Οι εξισώσεις Hamilton γράφονται:

$$F_i = -\nabla V = \frac{\partial \vec{p}}{\partial t} \text{ και } p_i = m \frac{\partial \vec{r}_i}{\partial t} \quad (3)$$

Η αρχή του Hamilton λέει ότι: *‘ Η τροχιά την οποία ακολουθεί ένα σώμα είναι αυτή η οποία ενέχει την ελάχιστη δράση. ‘* Η αρχή αυτή οδηγεί στην Νευτώνεια φυσική¹.

Η γνώση των δυνάμεων και των μαζών των ατόμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δώσουν τις θέσεις \vec{r}_i , των ατόμων, για μια σειρά από πολύ μικρά *‘βήματα χρόνου’*. Τα βήματα αυτά - όπως προαναφέραμε - είναι της τάξης των fs. Έτσι παίρνουμε μια σειρά από διαδοχικά στιγμιότυπα της μοριακής δομής τα οποία ονομάζουμε τροχιά (trajectory). Για την εύρεση των τροχιών \vec{r}_i των ατόμων (σένα σύστημα N σωματιδίων), απαιτείται η επίλυση του πεπλεγμένου συστήματος $3N$ διαφορικών εξισώσεων δευτέρας τάξης (Εξ. 2), ή ενός ισοδύναμου συστήματος $6N$ διαφορικών εξισώσεων πρώτης τάξης (Εξ. 3). Παρατηρούμε ότι οι διαφορικές εξισώσεις κινήσεως είναι αντιστρεπτές στο χρόνο, δηλαδή ότι με αλλαγή του πρόσημου σε όλες τις ταχύτητες και τις ορμές των σωματιδίων, αυτά θα διαγράψουν τις τροχιές κατά την αντίθετη φορά. Μια αναλυτική επίλυση αυτού του συστήματος είναι

¹ Η απόδειξη βρίσκεται στο παράρτημα 3.

αδύνατη. Μόνο μια αριθμητική επίλυση μέσω H/Y είναι εφικτή. Φυσικά και η τελευταία θα πρέπει να παρουσιάζει αντιστρεψιμότητα ως προς το χρόνο.

Στην πράξη, σε μια αριθμητική επίλυση μέσω H/Y, οι τροχιές δεν λαμβάνονται άμεσα από την εξίσωση του Newton. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Υπολογίζονται οι δυνάμεις F_i που δέχεται το κάθε άτομο. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται από την ενέργεια βάση της σχέσης:

$$F_i = -\nabla V(r_i)$$

2. Υπολογίζονται οι ατομικές επιταχύνσεις a_i από τις μάζες m_i και τις δυνάμεις F_i :

$$a_i = \frac{F_i}{m_i}$$

3. Υπολογίζονται οι ταχύτητες v_i από την εξίσωση:

$$a_i = \frac{d v_i}{d t}$$

4. Τελικά υπολογίζονται οι θέσεις r_i από τις ταχύτητες v_i βάσει της σχέσης:

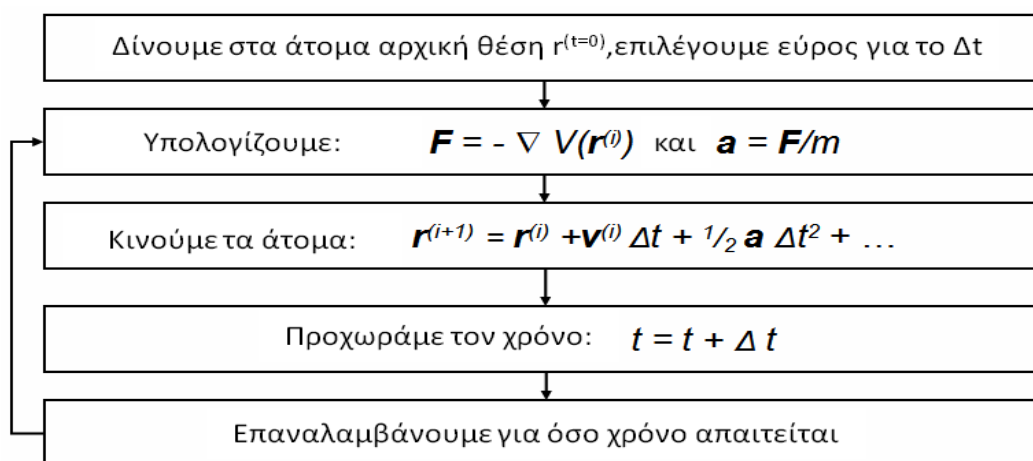
$$v_i = \frac{d r_i}{d t}$$

Η τροχιά μεταξύ δύο καταστάσεων μπορεί να χωριστεί σε μια σειρά από 'υπό- καταστάσεις' που απέχουν χρονικά κατά ένα 'βήμα - χρόνου', dt .

Γενικά το dt επιλέγεται έτσι ώστε να είναι μικρότερο από το χρόνο που χρειάζεται ένα (μικρό) μόριο για να διανύσει απόσταση ίση με τη μέση

διάσταση του^[44]. Για μεγάλα συστήματα το Δt επιλέγεται έτσι ώστε ο χρησιμοποιούμενος αλγόριθμος ολοκλήρωσης να μην αποκλίνει. Έτσι εξασφαλίζεται και η διατήρηση της ενέργειας.

Για συγκεκριμένη (αρχική) θερμοκρασία¹, η αρχική θέση του ατόμου τη χρονική στιγμή t χρησιμοποιούνται για να προβλεφθεί η θέση του τη στιγμή $t+\Delta t$. Η θέση τη χρονική στιγμή $t+\Delta t$ χρησιμοποιείται για να προβλέψουμε τη θέση τη χρονική στιγμή $t+2\Delta t$ κ.λ.π. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται και στον παρακάτω πίνακα:



Πίνακας 1

Στη Μοριακή δυναμική το σημείο όπου τερματίζεται η διαδικασία δεν είναι άλλο από αυτό που πρακτικά μπορεί να καλυφθεί. Με τα σημερινά δεδομένα καλύπτουμε χρόνους της τάξεως των nanoseconds – ns. Τέτοιοι χρόνοι συχνά δεν είναι αρκετοί για να περιγράψουμε ικανοποιητικά μεταβολές μεγάλων συστημάτων.

¹ Από όπου μπορεί να υπολογιστεί και η αρχική ταχύτητα.

Αλγόριθμος Verlet

Η ολοκλήρωση Verlet είναι μια μέθοδος για τον υπολογισμό των τροχιών σωματιδίων στη Μοριακή δυναμική προσομοίωση. Προσφέρει μεγαλύτερη σταθερότητα από την πολύ απλούστερη ολοκλήρωση Euler. Εκτός αυτού υπερέχει και σε άλλες ιδιότητες, οι οποίες είναι σημαντικές για φυσικά συστήματα, όπως αντιστρεψιμότητα του χρόνου και ιδιότητες διαίρεσης χώρου. Η σταθερότητα της τεχνικής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το σταθερό ρυθμό ανανέωσης, ή από τη δυνατότητα του υπολογισμού των θέσεων (με μεγάλη ακρίβεια) σ' ένα μικρό dt στο παρελθόν. Η μέθοδος αναπτύχθηκε από το Γάλλο Φυσικό Loup Verlet το 1967.

Ο αλγόριθμος

Στην αρχή ίσως φαίνεται φυσικό να υπολογίζει κάποιος τροχιές χρησιμοποιώντας ολοκλήρωση Euler, η οποία ορίζεται από :

$$x(t_0 + \Delta t) = x(t_0) + v(t_0)\Delta t$$

$$v(t_0 + \Delta t) = v(t_0) + a(t_0)\Delta t$$

Όπου t_0 είναι ο τρέχων χρόνος και Δt είναι το βήμα-χρόνου. Η αρχική ταχύτητα είτε θεωρείται μηδενική, είτε υπολογίζεται από τη θερμοκρασία του συστήματος. Όμως αυτό το είδος των ολοκληρώσεων έχει πολλά προβλήματα, όπως συζητήσαμε στην παράγραφο της ολοκλήρωσης Euler. Ο αλγόριθμος Verlet μειώνει το επίπεδο των λαθών που εισάγονται από την ολοκλήρωση υπολογίζοντας τη θέση στον

επόμενο βήμα-χρόνου από τις θέσεις των προηγούμενων και του παρόντος βήματος, χωρίς να χρησιμοποιεί την ταχύτητα.

$$x(t_0 + \Delta t) = x(t_0) + (x(t_0) - x(t_0 - \Delta t)) + a\Delta t^2 = 2x(t_0) - x(t_0 - \Delta t) + a\Delta t^2$$

Η ταχύτητα σε κάθε βήμα δεν υπολογίζεται μέχρι να έρθει το επόμενο βήμα.

$$v(t_0) = \frac{x(t_0 + \Delta t) - x(t_0 - \Delta t)}{2\Delta t}$$

Αυτό μπορεί να δημιουργήσει τεχνικές απαιτήσεις στη Μοριακή Δυναμική, γιατί η κινητική ενέργεια και η στιγμιαία Θερμοκρασία στο χρόνο t_0 δεν μπορούν να υπολογιστούν μέχρι να γίνει γνωστή η θέση στο χρόνο $t_0 + \Delta t$.

Οι Verlet εξισώσεις μπορούν επίσης να τροποποιηθούν για να δημιουργήσουν ένα πολύ απλό damping effect (για παράδειγμα, να αναπαραστήσουν την τριβή του αέρα σε παιχνίδια H/Y) :

$$x(t_0 + \Delta t) = (2 - f)x(t_0) - (1 - f)x(t_0 - \Delta t) + a\Delta t^2.$$

Όπου f είναι ένας αριθμός που αντιπροσωπεύει το κλάσμα της ταχύτητας που χάνεται στο βήμα (0-1).

Ταχύτητα Verlet

Ένας σχετικός αλγόριθμος είναι εκείνος της ταχύτητας Verlet. Αυτός χρησιμοποιεί μια παρόμοια προσέγγιση αλλά ενσωματώνει ρητά την ταχύτητα:

$$x(t + \Delta t) = x(t) + v(t) \Delta t + \frac{1}{2}a(t)(\Delta t)^2$$

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{a(t) + a(t + \Delta t)}{2} \Delta t$$

Δημιουργία αλγορίθμου

Η ολοκλήρωση Verlet μπορεί να εξαχθεί από το ανάπτυγμα Taylor μίας τροχιάς. Ας υποθέσουμε ότι $x(t)$ είναι η τροχιά ενός σωματιδίου στο χρόνο t . Τότε το ανάπτυγμα Taylor¹ γύρω από το χρόνο t_0 δίνει:

$$x(t_0 + \Delta t) = x(t_0) + \Delta t x'(t_0) + \frac{1}{2} \Delta t^2 x''(t_0) + \frac{1}{6} \Delta t^3 x'''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

και

$$x(t_0 - \Delta t) = x(t_0) - \Delta t x'(t_0) + \frac{1}{2} \Delta t^2 x''(t_0) - \frac{1}{6} \Delta t^3 x'''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

Προσθέτοντας τις δύο παραπάνω εξισώσεις κατά μέλη παίρνουμε:

¹ Ανάπτυγμα Taylor: $\sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^{(n)}(a)}{n!} (x-a)^n = f(a) + \frac{f'(a)}{1!} (x-a) + \frac{f''(a)}{2!} (x-a)^2 + \dots$

$$x(t_0 + \Delta t) + x(t_0 - \Delta t) = 2x(t_0) + \Delta t^2 x''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

ή

$$x(t_0 + \Delta t) = 2x(t_0) - x(t_0 - \Delta t) + \Delta t^2 x''(t_0) + O(\Delta t^4)$$

Όπου ο όρος $O(\Delta t^4)$ αντιπροσωπεύει τέταρτης ή μεγαλύτερης τάξης όρους, στο ανάπτυγμα Taylor. Αυτό έχει το πλεονέκτημα ότι χάνεται ο όρος τρίτης τάξης του αναπτύγματος Taylor και έτσι η ολοκλήρωση Verlet δίνει ικανοποιητική ακρίβεια.

Επίσης, αφαιρώντας τις δύο σειρές Taylor κατά μέλη, παίρνουμε την ταχύτητα:

$$v(t_0) = \frac{x(t_0 + \Delta t) - x(t_0 - \Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^2).$$

Έτσι ο υπολογισμός της ταχύτητας είναι λιγότερο ακριβής (δύο φορές), από τον υπολογισμό της τροχιάς. Αυτό το σφάλμα, όμως, δε συσσωρεύεται γιατί η ταχύτητα επαναυπολογίζεται από τις πιο ακριβείς τροχιές για κάθε βήμα-χρόνου (time step).

3.3 Τελικές συνθήκες

Στη μοριακή δυναμική, το εξαγόμενο από τον Η/Υ μπορεί να είναι (όπως στην περίπτωση αυτής της εργασίας) το μήκος ενός χημικού δεσμού σε συνάρτηση με το χρόνο. Στην παράγραφο αυτή θα ανιχνεύσουμε τον τρόπο με τον οποίο από τη χρονοσειρά (χρόνος – απόσταση) μεταβαίνουμε στο χώρο των συχνοτήτων (συχνότητα cm^{-1} -ένταση Intensity). Ως γνωστό αυτό το πετυχαίνουμε με τον μετασχηματισμό Fourier. Εδώ θα ασχοληθούμε με τον ‘γρήγορο μετασχηματισμό Fourier’, FFT (Fast Fourier Transform). Στο επόμενο βήμα θα δούμε πως από τη συχνότητα μπορούμε να υπολογίσουμε την ενέργεια.

Από το χρόνο στη συχνότητα

Κάθε περιοδική συνάρτηση $f(t)$, t είναι ο χρόνος, μπορεί να προσεγγιστεί σένα διάστημα από $-T$ έως T (T είναι η περίοδος της συνάρτησης) από μια σειρά Fourier. Το ανάπτυγμα των σειρών Fourier της $f(t)$, ορίζεται ως:

$$f(t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} c_n e^{-in\pi t/T} \quad (1)$$

όπου ο συντελεστής c_n δίνεται από την σχέση:

$$c(n) = \frac{1}{2T} \int_{-T}^T f(t) e^{in\pi t/T} dt \quad (2)$$

Στην περίπτωση πραγματικής συνάρτησης η (1) γίνεται:

$$f(t) = a_0 + \sum_{n=-\infty}^{\infty} a_n \cos(n\pi t/T) + b_n \sin(n\pi t/T)$$

όπου:

$$a_n = \frac{1}{2T} \int_{-T}^T f(t) \cos\left(\frac{n\pi t}{T}\right) dt$$

και

$$b_n = \frac{1}{2T} \int_{-T}^T f(t) \sin\left(\frac{n\pi t}{T}\right) dt$$

Για να πάμε από το *ανάπτυγμα Fourier* στο *μετασχηματισμό Fourier* πρέπει να κάνουμε την αντικατάσταση:

$$k = 2\pi/T [= d\omega], \quad \text{όπου } \omega \text{ είναι η συχνότητα.}$$

Στις εξισώσεις (1) και (2) και αφήνοντας το διάστημα, T , στο οποίο παίρνουμε τα αναπτύγματα να πάει στο άπειρο. Έτσι το k γίνεται πολύ μικρό και δικαιολογούμαστε να αντικαταστήσουμε το άθροισμα στην εξίσωση (1) με το ολοκλήρωμα:

$$f(t) = \frac{1}{C} \int_{-\infty}^{+\infty} c(k) e^{ikt} dt$$

και

$$c(k) = \frac{1}{C} \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{ikt} dt$$

όπου c είναι η κανονικοποιημένη σταθερά:

$$C = \sqrt{2\pi}$$

Απεικόνιση της χρονοσειράς στο επίπεδο

Έστω ότι έχουμε μια χρονοσειρά με N γραμμές. Από αυτές ο FFT χρησιμοποιεί 2^n γραμμές (n φυσικός αριθμός) ώστε να ισχύουν οι δύο ακόλουθες ανισώσεις ταυτόχρονα: $2^n < N$ και $2^{n+1} > N$.

Η μία σειρά απέχει από την άλλη βήμα-χρόνου (time step):

$t_s = \alpha$ (α θετικός πραγματικός αριθμός, συνήθως της τάξης των fs).

Το FFT θα τρέχει για συνολικό χρόνο: $t_0 = 2^n \alpha \Phi$. Φ είναι ο αριθμός των βημάτων-χρόνου μετά τα οποία το πρόγραμμα καταγράφει μια γραμμή στη χρονοσειρά.

Γίνεται χρήση της σταθεράς:

$$d_{\text{omega}} = \frac{2\pi\hbar}{t_0}$$

Η παραπάνω σταθερά έχει διαστάσεις ενέργειας. Αν την πολλαπλασιάσουμε με K , όπου $K = 349,7554$ μετατρέπουμε την ενέργεια σε cm^{-1} . Αναφέραμε ότι το FFT χρησιμοποιεί 2^n γραμμές. Ορίζουμε i τέτοιο ώστε $i = 1, 2, 3, \dots, 2^n$.

Το γράφημα στο χώρο των συχνοτήτων δημιουργείται ως εξής:

Υπολογισμός σημείων του άξονα x.

Τα σημεία του οριζόντιου άξονα ω υπολογίζονται από τη σχέση:

$\omega_i = i * d_{\text{omega}}$. Τα σημεία αυτά έχουν μονάδες cm^{-1} (κυματάριθμους).

Αν το d_{omega} είναι μεγάλο, τότε έχουμε μεγάλη απόσταση μεταξύ των σημείων του άξονα x , άρα μικρή διακριτική ικανότητα.

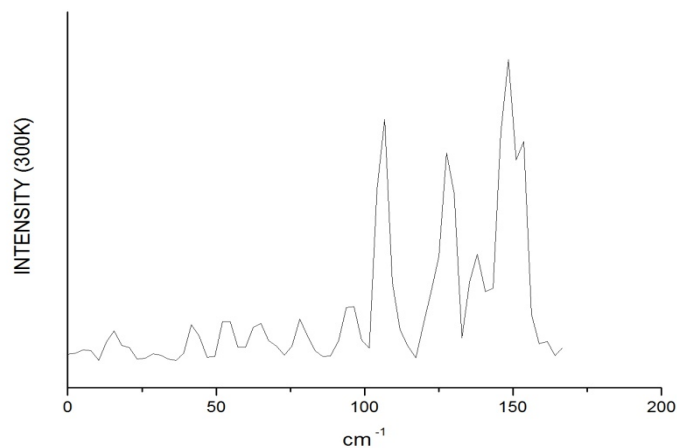
Υπολογισμός σημείων του άξονα y.

Τα σημεία του οριζόντιου άξονα y υπολογίζονται από το άθροισμα:

$$y_k = \sum_{n=0}^{2^n-1} y_n e^{\frac{-2\pi i}{2^n}nk} \quad k=0,1,2,\dots,2^n-1.$$

$y_0, y_1, y_2, \dots, y_{2^n-1}$ είναι τα μήκη που το FFT παίρνει από τη χρονοσειρά. 2^n είναι το πλήθος των γραμμών που χρησιμοποιεί το FFT.

Ένα παράδειγμα φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα 1 - Φάσμα μετά από μετασχηματισμό Fourier

Από τη συχνότητα στην ενεργεία

Όταν ξέρουμε τη συχνότητα δόμησης ενός διατομικού μορίου μπορούμε να υπολογίσουμε την ενέργειά του. Στην περίπτωση του αρμονικού ταλαντωτή (βλέπε παράγραφο 2.4) υπολογίζεται η ενέργεια μέσω του

τύπου:
$$E_v = (n+1)\hbar\omega \text{ όπου } n=0,1,2,\dots \text{ και } \omega = \left(\frac{k}{m_r}\right)^{\frac{1}{2}}$$

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω τύπο το διατομικό μόριο έχει ισαπέχοντα δονητικά επίπεδα.

Στην περίπτωση που θέλουμε μεγαλύτερη ακρίβεια στους υπολογισμούς μας, χρησιμοποιούμε δυναμικό Morse (βλέπε παράγραφο 2.5.1). Γι' αυτό το πηγάδι δυναμικού τα ενεργειακά επίπεδα δίνονται από τον τύπο:

$$\bar{E} = \bar{\omega}_e(v+1/2) - \bar{\omega}_e x_e(v+1/2)^2$$

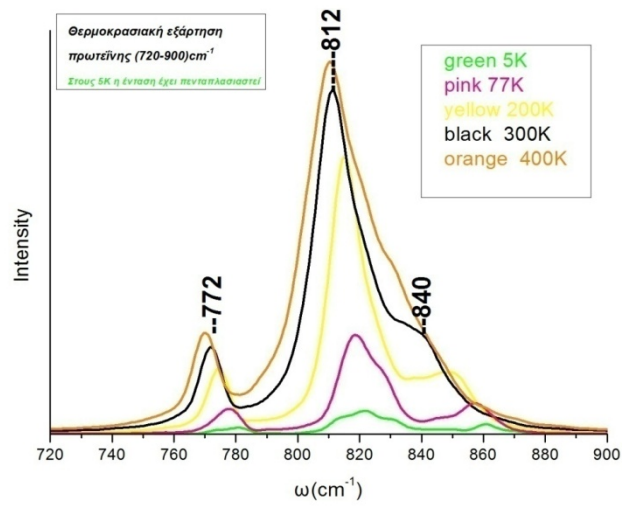
όπου $\bar{\omega}_e$ είναι κατ' αντιστοιχία με τον αρμονικό ταλαντωτή και το $\bar{\omega}_e x_e(v+1/2)^2$

οδηγεί στη διαφορά των δονητικών επιπέδων του Morse δυναμικού σε σχέση με αυτό του αρμονικού ταλαντωτή.

Στην περίπτωση πολυατομικών μορίων, οι δονήσεις είναι περισσότερο πολύπλοκες και περιγράφονται από ένα σύστημα συζευγμένων μη αρμονικών ταλαντώσεων. Ένα μόριο με N άτομα θα έχει $3N-6$ ανεξάρτητες δονήσεις (ή $3N-5$ αν είναι γραμμικό – βλέπε παράγραφο 2.3). Το δονητικό φάσμα ενός πολυατομικού μορίου είναι η σύνθεση

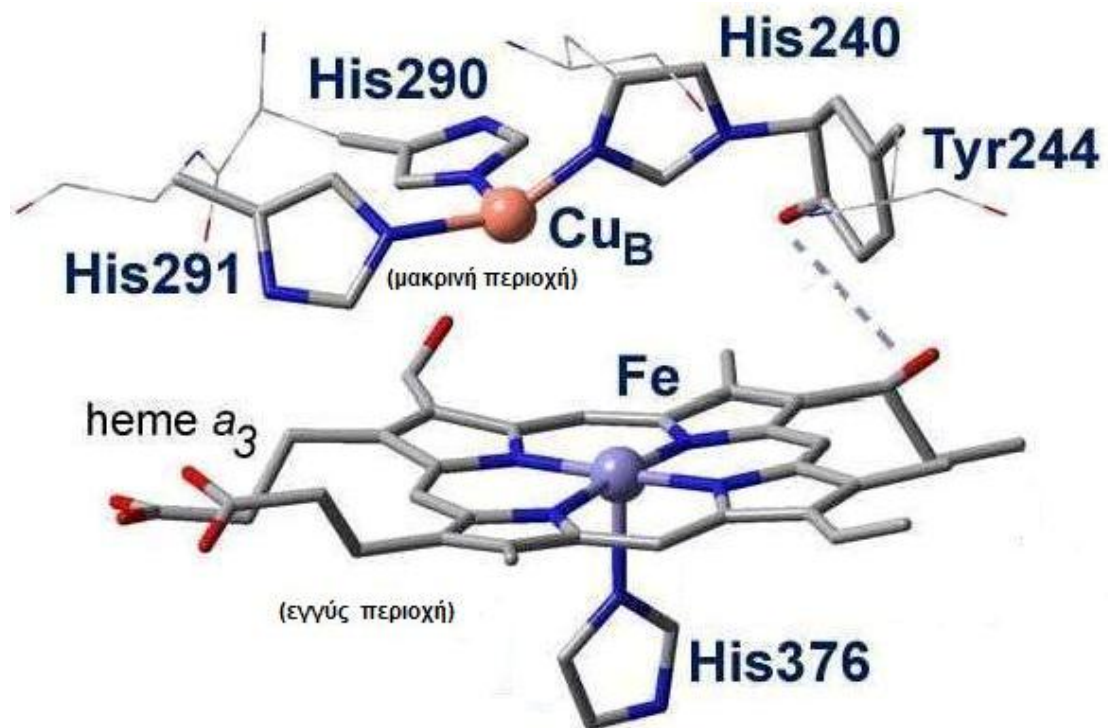
όλων των εσωτερικών κινήσεών του. Γι' αυτό το λόγο είναι συχνά δύσκολο να ερμηνευτούν τα φάσματα των πολυατομικών-μορίων.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



4.1 ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ

Το ενεργό κέντρο της CcO είναι μια διπυρηνική κοιλότητα αποτελούμενη από μία αίμη υψηλής διαμόρφωσης *spin* και ένα σύμπλοκο χαλκού Cu_B(**Εικόνα 4.1**).



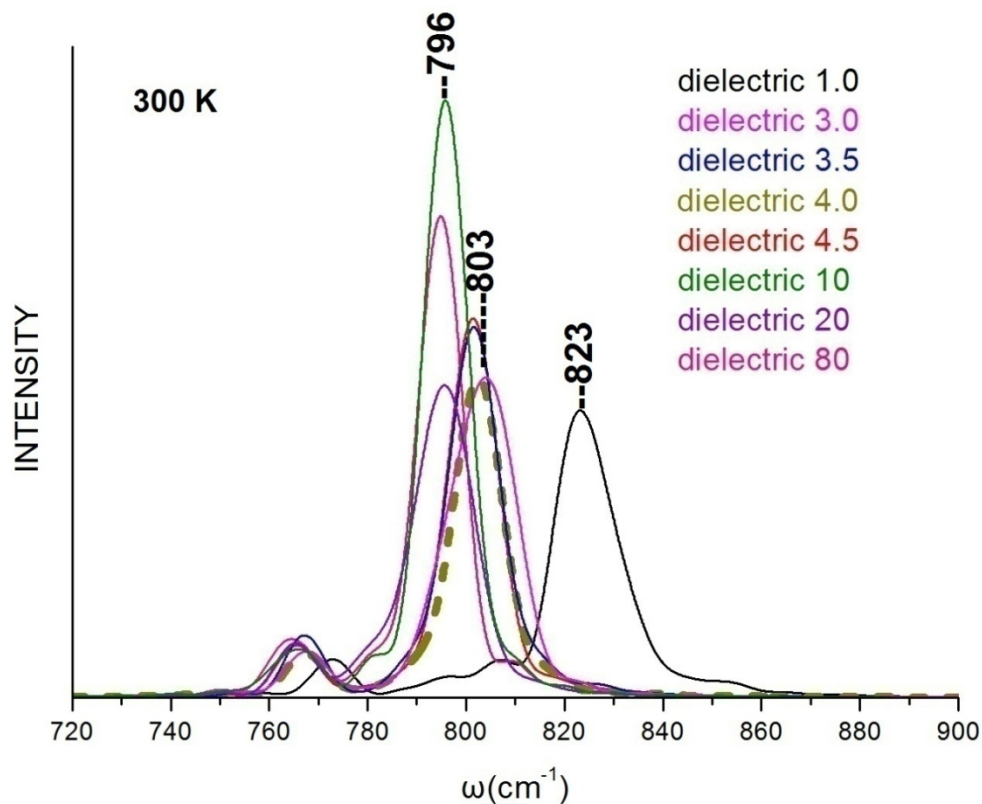
Εικόνα 4.1 Μοντέλο ενεργού κέντρου CcO. Οι ιστιδίνες έχουν αντικατασταθεί με ιμιδαζόλια.

4.1.1 ΔΙΗΛΕΚΤΙΚΗ ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ

Στην παράγραφο 2.5.5 (Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις) είδαμε την εξάρτηση του μοριακού δυναμικού από τη διηλεκτρική σταθερά $D=4\pi\epsilon\epsilon_0^1$.

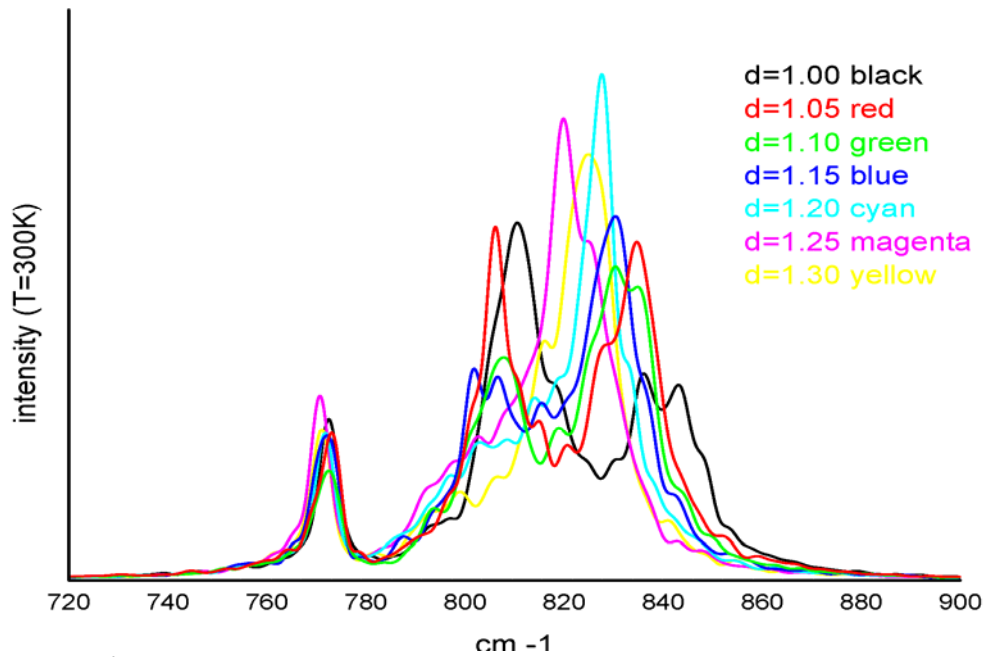
Μελετήσαμε τη συμπεριφορά του ενεργού κέντρου της CcO σε οκτώ τιμές του διηλεκτρικού, ξεκινώντας από την τιμή 1.0 (προσομοίωση κενού) προχωρώντας στην τιμή 4.0 (προσομοίωση εσωτερικού πρωτεϊνών) έως την τιμή ογδόντα (καθαρό νερό). Παρατηρώντας την **Εικόνα 4.2** βλέπουμε ότι υπάρχει μετατόπιση προς τα αριστερά και τελικά σύγκληση, πράγμα προβλέψιμο, αφού η αύξηση του διηλεκτρικού οδηγεί στην ελάττωση του δυναμικού Coulomb έως τον πρακτικό μηδενισμό του ($D=80$). Επίσης, παρατηρούμε (κατά κανόνα) αύξηση της έντασης με την αύξηση του διηλεκτρικού. Το δυναμικό Coulomb επηρεάζει άμεσα τη δόνηση (Fe-O). Η ελάττωση του ελαττώνει την ισχύ της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ατόμων. Έτσι, συναντάμε μεγαλύτερο πληθυσμό στην ίδια κατάσταση. Επίσης φαίνεται καθαρά ότι από $D=3$ έως $D=80$ η επίδραση στο $\nu(Fe-O)$ είναι σχεδόν η ίδια. Με την αύξηση της διηλεκτρικής σταθεράς D έχουμε μετατόπιση του φάσματος προς τα αριστερά (μικρότερες συχνότητες). Αυτό μπορεί να οφείλετε στο ότι, ελάττωση του (ελκτικού) δυναμικού Coulomb οδηγεί σένα πιο ρηχό και φαρδύ 'πηγάδι' δυναμικού. Η τιμή διηλεκτρικής σταθεράς που χρησιμοποιείται συνηθέστερα για την προσομοίωση εσωτερικού πρωτεϊνών είναι $D=4.0$. Για αυτή την τιμή τα αποτελέσματα μας δίνουν κορυφή στους 803cm^{-1} πολύ κοντά στην πειραματική τιμή (804cm^{-1}).

¹ ϵ_0 είναι η διηλεκτρική σταθερά του κενού και ϵ του μέσου διάδοσης της αλληλεπίδρασης.

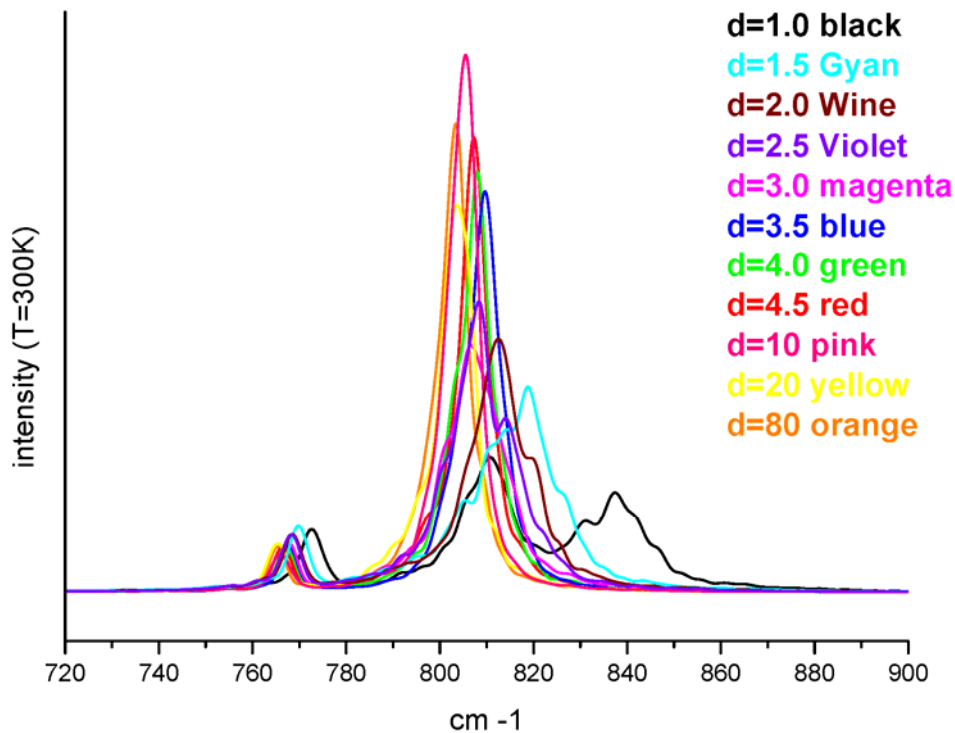


Εικόνα 4.2 Διηλεκτρική εξάρτηση ενεργού κέντρου της CcO. Υπάρχει μετατόπιση προς τα αριστερά και τελικά σύγκλιση. Η αύξηση του διηλεκτρικού οδηγεί στην ελάττωση του δυναμικού Coulomb έως τον πρακτικό μηδενισμό του ($D=80$). Το ω δηλώνει την συχνότητα δόνησης, ενώ η σχετική ένταση (INTENSITY) δηλώνει τον πληθυσμό ενός τρόπου δόνησης. Το ίδιο ισχύει για όλα τα γραφήματα αυτού του κεφαλαίου.

Παρατηρώντας το φάσμα για την διηλεκτρική εξάρτηση του ενεργού κέντρου της CcO (**Εικόνα 4.2**), εύλογα δημιουργείτε το ερώτημα αν η σύγκλιση ξεκινά για τιμή μικρότερη από την $D=3$. Οπότε επεκτείναμε την μελέτη μας για τιμές μεταξύ των ένα και τρία [$1 < D < 3$] καταλήγοντας στα αποτελέσματα της **Εικόνας 4.3**. Τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι η δόνηση $Fe^{IV}=O$ της CcO δεν επηρεάζεται για τιμές της διηλεκτρικής σταθεράς μικρότερες του 1,5. Για τιμές μεγαλύτερες του 1,5 έχουμε σύγκλιση σε μια σταθερή τιμή.



Εικόνα 4.3^α Η διηλεκτρική εξάρτηση ενεργού κέντρου της CcO για τιμές μεταξύ 1.00 και 1.30.

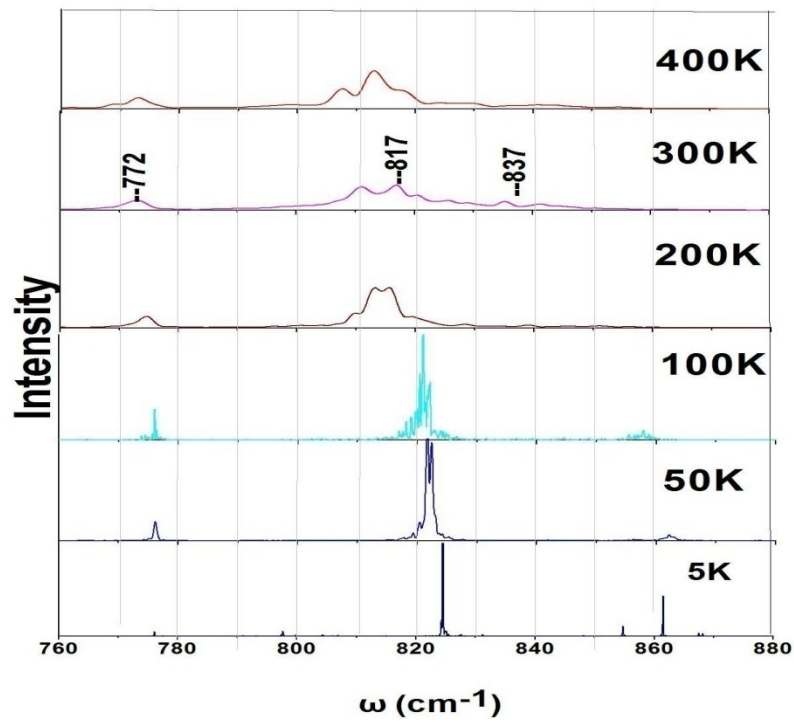


Εικόνα 4.3^β Διηλεκτρική εξάρτηση ενεργού κέντρου της CcO. Η τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς από την οποία ξεκινά η σύγκλιση είναι η τιμή 1,5.

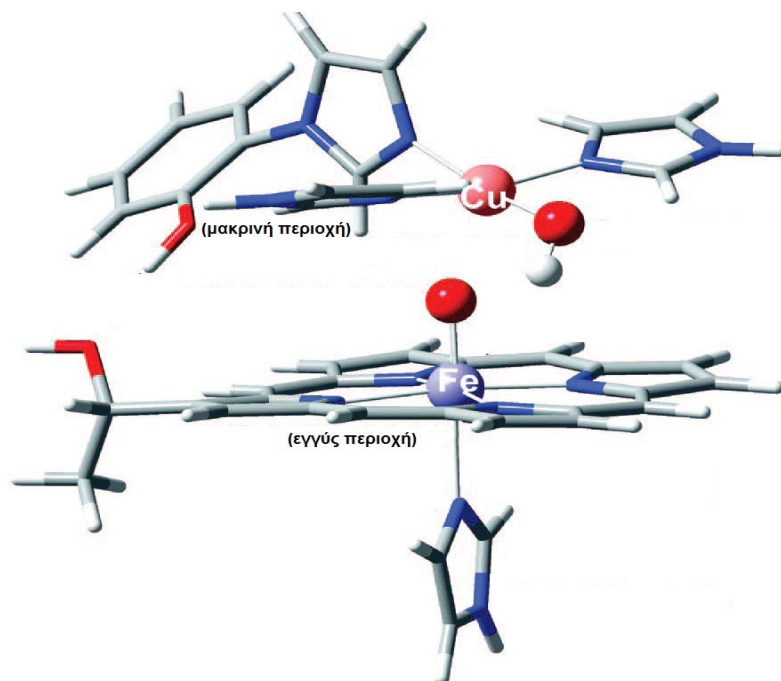
4.1.2 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΗ ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ

Μελετήσαμε τη συμπεριφορά του ενεργού κέντρου της CcO σε έξι διαφορετικές θερμοκρασίες, όπως δείχνει η **Εικόνα 4.4**. Προκειμένου να καλύψουμε ολόκληρο το φάσμα θερμοκρασιών (στα πλαίσια του οποίου δεν παρατηρείται αποδιάταξη -denaturation-της πρωτεΐνης) ξεκινήσαμε από τους 5K και καταλήξαμε στους 400K. Η μελέτη μας επεκτάθηκε έως τους 400K και λόγω του ότι έτσι ίσως καταφέραμε να επιταχύνουμε και να ανιχνεύσουμε την πραγματοποίηση μια πιθανής διαδικασίας, η οποία (για το ίδιο χρονικό διάστημα) δεν εμφανίζεται στους 300K. Με φασματοσκοπία συντονισμού Raman έχουν ανιχνευτεί, δύο χαρακτηριστικές δονήσεις στα 790 και 804 cm^{-1} (σε θερμοκρασία δωματίου) στον καταλυτικό κύκλο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης^[28-29]. Οι παραπάνω δονήσεις έχουν oxo-ferryl χαρακτήρα $\text{Fe}^{\text{iv}}=\text{O} / \text{Cu}_B^{\text{II}}$. Ο χαρακτήρας αυτός πιστοποιήθηκε^[28-29] με αντικατάσταση του ^{16}O με ^{18}O , οπότε παρουσιάστηκε μετατόπιση των κορυφών από 790/804 cm^{-1} σε 750/764 cm^{-1} . Οι δυο χαρακτηριστικές συχνότητες μπορεί να αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικούς τρόπους δόνησης της ίδιας δομής^[31]. Υπάρχουν πειραματικές εργασίες που δείχνουν την ύπαρξη μόνο της 804 cm^{-1} κορυφής^[30]. Στην παρούσα εργασία τις κορυφές των 790/804 cm^{-1} (θερμοκρασία 300K) τις παρατηρούμε σένα εύρος 810-825 κυματάριθμων. Επίσης παρατηρούμε δύο ακόμα κορυφές. Μια στους 772 κυματάριθμους και μία στους 840 περίπου κυματάριθμους (**Εικόνα 4.4**). Οι παραπάνω δονήσεις αναλύθηκαν^I στα πλαίσια της αρμονικής προσέγγισης.

^I Η ανάλυση με αρμονικές συχνότητες γίνεται με διαγονοποίηση του 3Nx3N πίνακα Hessian. Ο Hessian περιέχει τις β' παραγώγους του Δυναμικού. Οι ιδιοτιμές του πίνακα αντιστοιχούν στις συχνότητες δόνησης ενώ τα ιδιοδιανύσματα δείχνουν τους τρόπους ταλάντωσης. Για τις αρμονικές συχνότητες η μελέτη είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας.



Εικόνα 4.4 Θερμοκρασιακή εξάρτηση φασμάτων απορρόφησης ενεργού κέντρου CcO.



Εικόνα 4.5 Μοντέλο οξο-ferryl ενδιάμεσου του καταλυτικού κύκλου της CcO. Οι ιστιδίνες έχουν αντικατασταθεί με μιδαζόλια.

Η δόνηση στους 815 cm^{-1} περίπου είναι η χαρακτηριστική δόνηση $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Η δεύτερη κορυφή στους 772 cm^{-1} αποδίδεται σε δόνηση στην εγγύς περιοχή της αίμης α_3^{311} (**Εικόνα 4.5**). Πιο συγκεκριμένα η δόνηση αυτή αποδίδεται στην επίδραση στο Fe από την επίπεδη παραμόρφωση (αναπνοή) του ιμιδαζολίου της εγγύς περιοχής. Η τρίτη κορυφή στους 840 cm^{-1} (300K) αποδίδεται σε δόνηση στη μακρινή περιοχή. Η δόνηση αυτή $\text{Fe}=\text{O}$ περιλαμβάνει έντονη επίδραση από την ταλάντωση Cu_B-OH .

Όπως αναμενόταν, η αύξηση της θερμοκρασίας μετατοπίζει τις κορυφές προς τα αριστερά. Αυτό οφείλεται στην αναρμονικότητα του δυναμικού (Morse) που χρησιμοποιήσαμε.

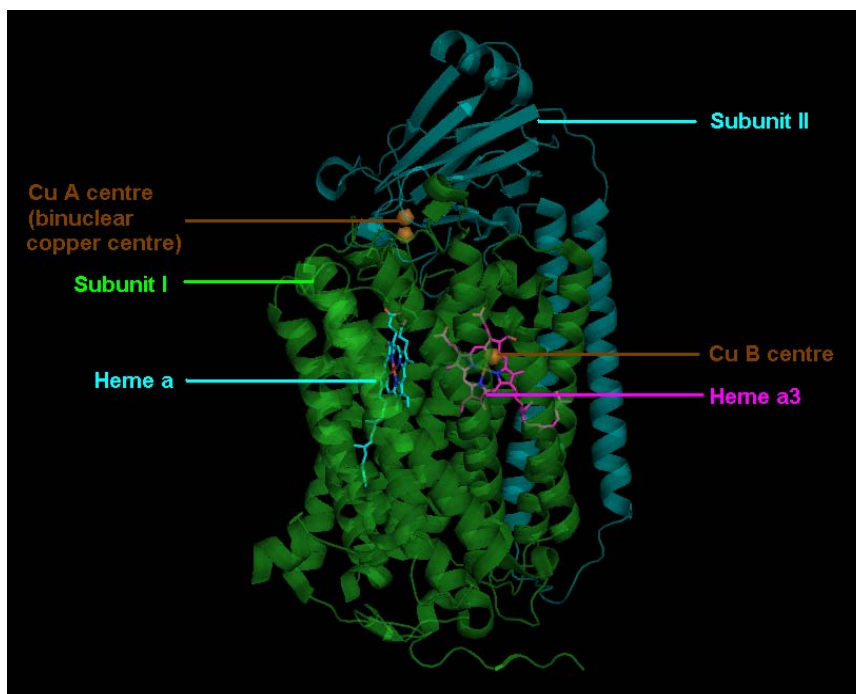
Επίσης η μελέτη μας δείχνει ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση του πλάτους της κορυφής και αύξηση της έντασης. Η αύξηση της έντασης δε φαίνεται στην **Εικόνα 4.4** λόγω της εξομάλυνση (smoothing) που εφαρμόστηκε. Η κορυφές στην περιοχή των 840 και 810 cm^{-1} , ενώνονται σε μία στους 300 και 400K . Αυτό οφείλεται στη χαμηλή ανάλυση σε συνδυασμό με την αύξηση του πλάτους των κορυφών. Η αύξηση του πλάτους της κορυφής οφείλεται στην αύξηση των καταστάσεων (στις οποίες μπορεί να βρεθεί το μόριο) που ακολουθεί την αύξηση της θερμοκρασίας. Η αύξηση της έντασης (αριθμού μορίων που βρίσκονται σε μια συγκεκριμένη κατάσταση) αιτιολογείται από το νόμο της κατανομής Maxwell-Boltzmann:

$$N_n = N_0 e^{-nh\nu/kT}$$

όπου n είναι η ενεργειακή στάθμη, h είναι η σταθερά του Planck, ν η συχνότητα, k η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία και N ο πληθυσμός.

4.2 ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Όπως έχουμε αναφέρει και στο 1^ο κεφάλαιο, η κρυσταλλική δομή που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας ήταν από το βακτήριο *Paracoccus denitrificans* (Εικόνα 4.6). Η υπομονάδα I περιέχει δύο αίμες. Την αίμη α χαμηλού spin, με το Fe να έχει αριθμό συναρμογής 6 με δύο ιστιδίνες (His) ως αξονικούς υποκαταστάτες και την αίμη α_3 υψηλού spin. Ο Fe_{α_3} έχει αριθμό συναρμογής 5, με πέμπτο υποκαταστάτη μια ιστιδίνη (His). Τρεις ιστιδίνες είναι υποκαταστάτες του χαλκού Cu_B . Η αίμη α_3 μαζί με το σύμπλοκο χαλκού Cu_B συνιστούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Εκεί λαμβάνει χώρα η αναγωγή του μοριακού O_2 σε νερό. Η υπομονάδα II περιέχει το διπυρηνικό κέντρο χαλκού Cu_A-Cu_A , που δέχεται τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα *c*.

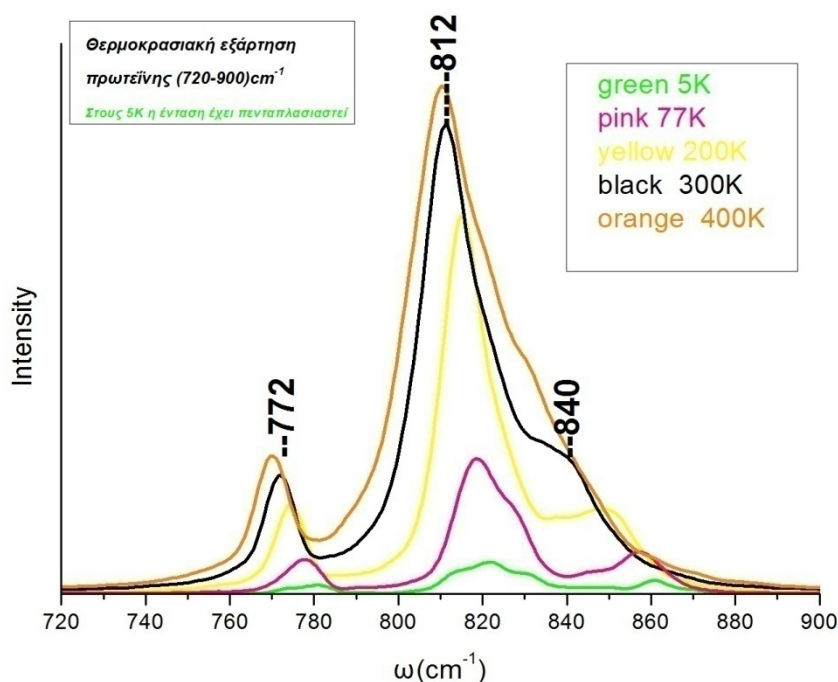


Εικόνα 4.6

Οι υπομονάδες I και II της κυτοχρωμικής *c* Οξειδάσης. Φαίνεται η θέση του διμεταλλικού κέντρου $Fe-\alpha_3/Cu_B$, η αίμη α (Υπομονάδα I) καθώς και το διμερές κέντρο αλληλεπίδρασης με το κυτόχρωμα *c*, Cu_A-Cu_A (Υπομονάδα II).

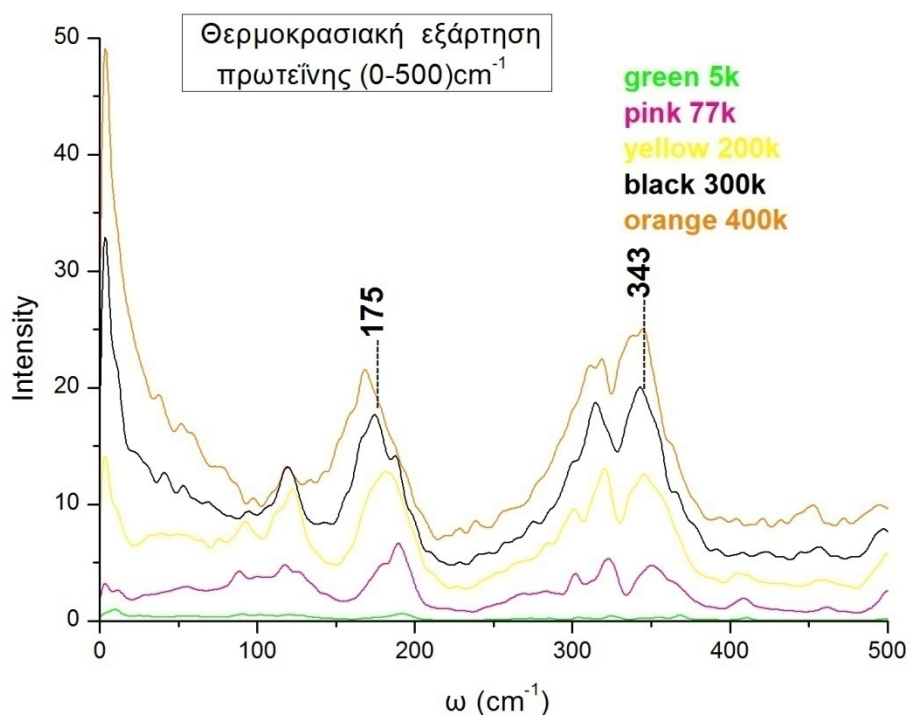
4.2.1 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΗ ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (720 – 900 cm^{-1})

Η πρωτεΐνη παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά στην αλλαγή της θερμοκρασίας με αυτή του ενεργού της κέντρου (Εικόνα 4.7). Παρατηρούμε ξανά (στην περιοχή συχνοτήτων 720-900 cm^{-1}) τις τρεις κορυφές, οι οποίες μετατοπίζονται προς τα αριστερά με την αύξηση της θερμοκρασίας, και τις οποίες αιτιολογούμε με τον ίδιο τρόπο. Και εδώ στα 300 και 400K οι δύο κορυφές (στην περιοχή των 840 και 810 cm^{-1}) ενώνονται σε μια.



Εικόνα 4.7 Η δόνηση στους 812 cm^{-1} είναι η χαρακτηριστική δόνηση $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Η δεύτερη κορυφή στους 772 cm^{-1} αποδίδεται σε δόνηση στην εγγύς περιοχή της αίμης α_3 (Εικόνα 4.3). Πιο συγκεκριμένα στη δόνηση αυτή $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ επιδρά η επίπεδη παραμόρφωση (αναπνοή) του ιμιδαζολίου της εγγύς περιοχής. Η τρίτη κορυφή στους 840 cm^{-1} (300K) αποδίδεται σε δόνηση $\nu(\text{Fe}-\text{O})$ με επίδραση από την μακρινή περιοχή. Η δόνηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση από την ταλάντωση $\text{Cu}_\text{B}-\text{OH}$.

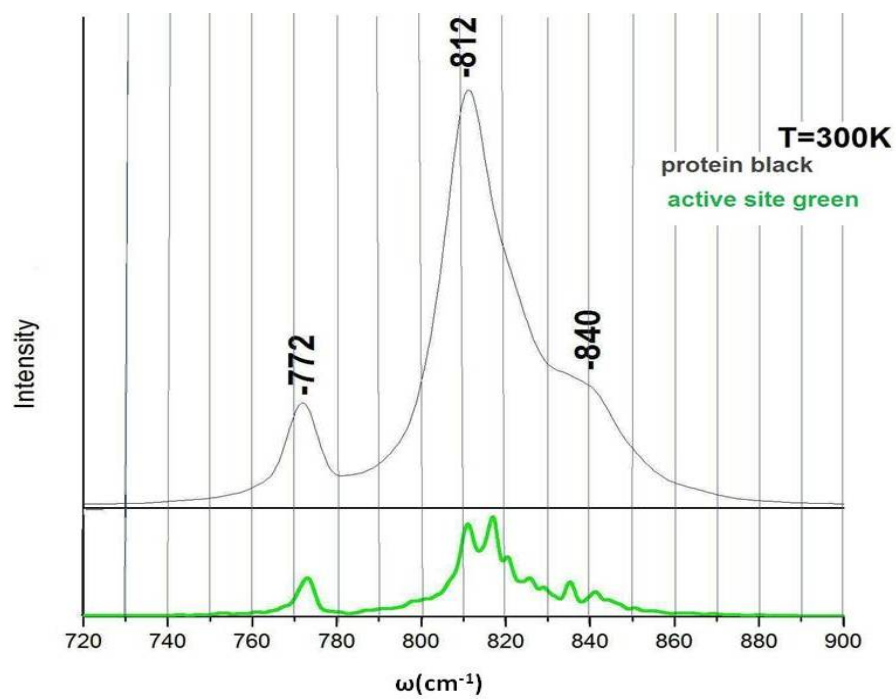
4.2.2 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΗ ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (0 – 500 cm⁻¹)



Εικόνα 4.8 Θερμοκρασιακή εξάρτηση πρωτεΐνης 0 -500 cm⁻¹

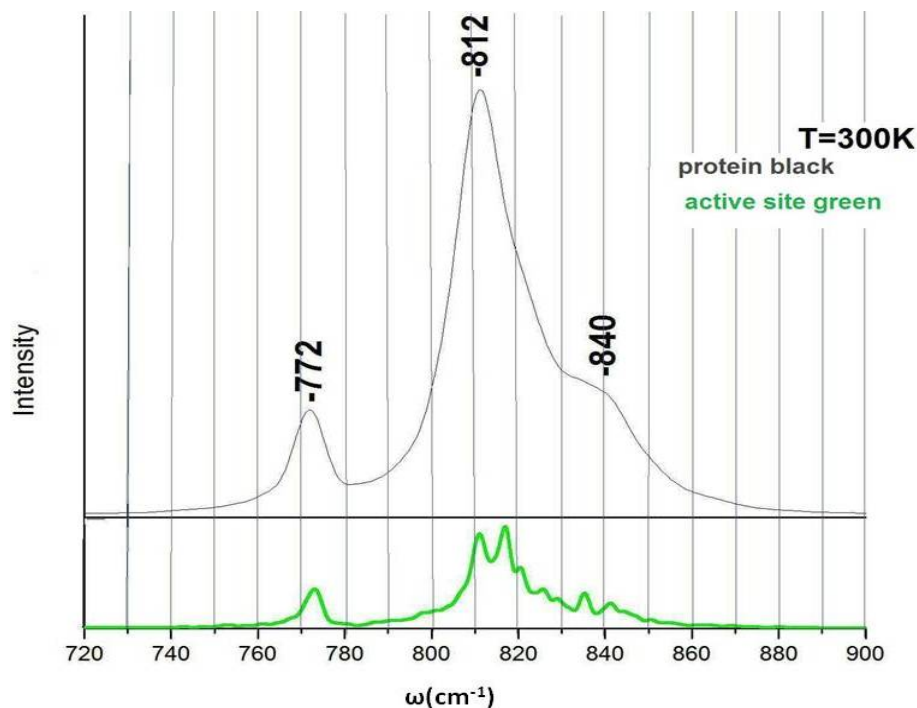
Στην περιοχή 0-500 cm⁻¹, παρατηρούμε δύο ακόμα κορυφές (**Εικόνα 4.8**). Η μία είναι στα 175 cm⁻¹ περίπου. Η ανάλυση με αρμονική προσέγγιση δείχνει ότι η κορυφή αυτή οφείλεται στην δόνηση κάμψης του αζώτου-που βρίσκεται στο επίπεδο της αίμης-με το δεσμό Fe=O^[45] (**Εικόνα 4.5**). Η δεύτερη κορυφή (340 cm⁻¹ περίπου) φαίνεται να οφείλεται στην δόνηση κάμψης (bending) του αζώτου του αξονικού ιμιδαζολίου (εγγύς περιοχή) με το δεσμό Fe=O^[46,47,48].

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα ερευνητική εργασία είναι τα εξής:

1. Μελετήθηκε η συμπεριφορά του ενεργού κέντρου της CcO στην αλλαγή της διηλεκτρικής σταθεράς. Η παρατηρούμενη διαφορά στις εντάσεις (**Εικόνα 4.2**) κατά μία εκδοχή^[31], μπορεί να οφείλετε στις διαφορετικές πρωτονιακές καταστάσεις κοντά στο ενεργό κέντρο. Επεκτείνοντας την μελέτη μας για τιμές μεταξύ των ένα και τρία [$1 < D < 3$] καταλήξαμε στα αποτελέσματα της **Εικόνας 4.3**. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η δόνηση $Fe^{iv}=O$ της CcO δεν επηρεάζεται για τιμές της διηλεκτρικής σταθεράς μικρότερες του 1,5. Για τιμές μεγαλύτερες του 1,5 έχουμε σύγκλιση σε μια σταθερή τιμή. Θα μπορούσε να προταθεί ότι η πρωτονίωση/αποπρωτονίωση των αμινοξέων, αλλά και η ύπαρξη πιθανών καναλιών κινήσεως πρωτονίων στη περιοχή κοντά στο ενεργό κέντρο επιδρούν στο ηλεκτροστατικό δυναμικό της περιοχής.
2. Παρατηρώντας το φάσμα της διηλεκτρικής εξάρτησης (**Εικόνα 4.2**) βλέπουμε μετατόπιση της χαρακτηριστικής κορυφής από τους 823 cm^{-1} στους 796 cm^{-1} . Από αυτό συμπεραίνουμε ότι το ηλεκτροστατικό δυναμικό του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης είναι ένας σημαντικός παράγοντας επίδρασης στη δόνηση $\nu(FeO)$. Το οριακό σημείο αυτής της επίδρασης φαίνεται να είναι η τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς 1,5.



Εικόνα 5.1 Το φάσμα της πρωτεΐνης (μαύρο χρώμα) είναι παρόμοιο με αυτό του ενεργού κέντρου (πράσινο χρώμα).

3. Μελετήθηκε η δυναμική της πρωτεΐνης και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της $\nu(\text{Fe-O})$ σε διάφορες θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα και εδώ - όπως και στο ενεργό κέντρο - έδειξαν μια μετατόπιση του φάσματος προς τα αριστερά (**Εικόνα 4.7– 4.8**) με παράλληλη αύξηση της έντασης. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης (**Εικόνα 4.7**) είναι όμοια με αυτά του ενεργού κέντρου της (**Εικόνα 4.4**). Οι κορυφές και στις δύο περιπτώσεις είναι σε πλήρη αντιστοιχία (**Εικόνα 5.1**). Οι δονήσεις του ενεργού κέντρου, που με λεπτομέρεια έχουν μελετηθεί σε αυτή τη διατριβή, δείχνουν να διατηρούνται και μέσα στο εκτεταμένο πρωτεϊνικό περιβάλλον. Οι διαταραχές από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Coulomb, Wan der Vaals, δεσμοί υδρογόνου)

των γειτονικών αμινοξέων διαταράσσουν τις συχνότητες απορρόφησης της oxo-ferryl ομάδας. Γι' αυτό παρατηρούμε διεύρυνση των φασματικών γραμμών και μετατόπιση (μερικών κυματάριθμων) των φασματικών κορυφών. Επομένως, ένα βασικό συμπέρασμα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι ότι το φάσμα του ενεργού κέντρου μπορεί να δώσει μια καλή περιγραφή του συνολικού φάσματος της πρωτεΐνης.

4. Τα αποτελέσματα (Εικόνες 4.4, 4.7) δείχνουν ομοιότητα των φασματικών καμπύλων σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών που χρησιμοποιήσαμε. Πλήρη ομοιότητα των φασματοσκοπικών καμπυλών φαίνεται στους 300 και 400K. Δεν παρατηρούμε αλλαγές που να επηρεάζουν δραματικά την δόνηση $\nu(\text{Fe-O})$. Έτσι καταλήγουμε το αξιοσημείωτο συμπέρασμα ότι η κυτοχρωμική c οξειδάση είναι μια ιδιαίτερα ανθεκτική πρωτεΐνη στην αλλαγή της θερμοκρασίας.
5. Στη μελέτη μας εμφανίστηκαν πέντε κορυφές τις οποίες αποδίδουμε σε δονήσεις ως εξής:

Απόδοση κορυφών	
Περιοχή συχνότητων (cm^{-1})	Αιτιολόγηση
175	Δόνηση κάμψης: $\text{N}\alpha_3\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$
343	Δόνηση κάμψης: $\text{N}\mu\mu_6\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$
772	Επιρροή από επίπεδη παραμόρφωση αζονικού Ιμιδαζολίου
812	Δόνηση τάσης: $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$
840	Επίδραση από δόνηση $\text{Cu}_B\text{-OH}$

6. Μια και φαινόμενα πρωτονίωσης συμβαίνουν κατά την μετάβαση από το **P** στο **F** ενδιάμεσο (Βλέπε Παράγραφο 1.4), οι πειραματικά παρατηρούμενες δονήσεις στους $790/804\text{ cm}^{-1}$ θα μπορούσαν να οφείλονται σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις της πρωτεϊνικής μήτρας κοντά στο ενεργό κέντρο. Οι διαφορετικές αυτές διαμορφώσεις πιθανός δημιουργούνται από συμβάντα πρωτονίωσης (πρωτονίωση/αποπρωτονίωση αμινοξέων). Η τιμή 1,5 της διηλεκτρικής σταθεράς φαίνεται είναι το μεταίχμιο μεταξύ των δύο διαμορφώσεων (**Εικόνα 4.3^B**). Η ερευνητική ομάδα των Daskalakis V.,Farantos S.,Varotsis C., *J. Am. Chem. Soc.* 2008, προτείνει ότι η εγγύς ιστιδίνη (η κάθετη στο επίπεδο της αίμης α_3 ,His-411¹) είναι βασικός παράγοντας επιρροής στις δονήσεις της περιοχής.

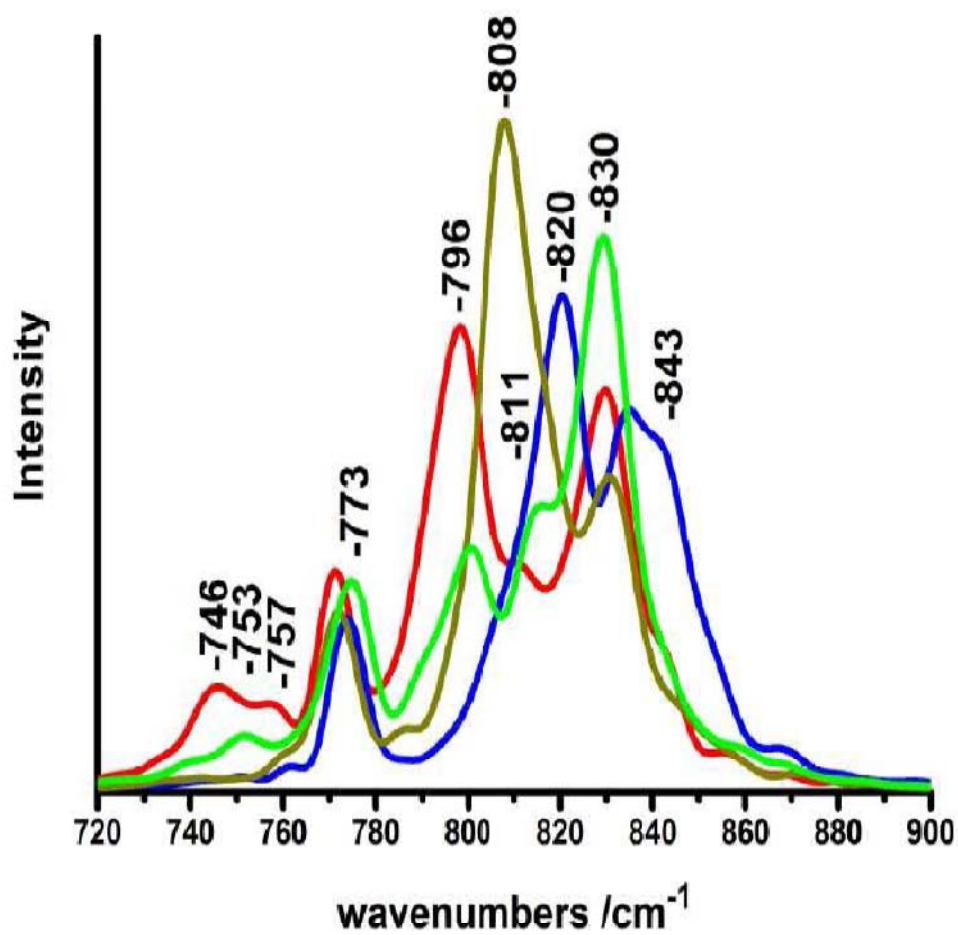
¹ Αρίθμηση με βάση τη δομή του *Paracoccus denitrificans*.

Παράρτημα 1

Καταστάσεις πρωτονίωσης προπιονικού-Asp399

Βασισμένοι σε ένα προτεινόμενο μοντέλο^[38] τέσσερις διαφορετικές καταστάσεις πρωτονίωσης (A, B, C, D) είναι πιθανές για το ζεύγος προπιονικού-Asp399 (αρίθμηση κατά την αα₃ *P. denitrificans*) της 1ar1 δομής. Οι δομές A και C (σε αντίθεση με τις B και D) μπλοκάρουν το Q-κανάλι κίνησης πρωτονίων. Η B δεν έχει επιλεγεί λόγω μιας ασταθούς ισορροπίας μεταξύ των density of states (Βλέπε το γράφημα που ακολουθεί^[39]). Στη D δομή που επιλέξαμε για την παρούσα εργασία (όπως και σε όλες τις δομές του γραφήματος) το γλουταμινικό-Glu-278 είναι πρωτονιωμένο.

$\nu(\text{Fe-}^{16}\text{O})$ A B C D / Glu278-H⁺



Παράρτημα 2

Η Λαγκρανζιανή προσέγγιση είναι ισοδύναμη με την Νευτώνεια

Στα παρακάτω την παράγωγο ως προς το χρόνο τη συμβολίζουμε με
κουκίδα πάνω από την ποσότητα που παραγωγίζουμε και

$$\nabla = \vec{i} \frac{\partial}{\partial x} + \vec{j} \frac{\partial}{\partial y} + \vec{k} \frac{\partial}{\partial z}$$

Ας υποθέσουμε ότι έχουμε ένα τρισδιάστατο χώρο και τη
Λαγκρανζιανή:

$$L=K-V \quad \text{ή}$$

$$L(\vec{x}, \dot{\vec{x}}) = \frac{1}{2} m \dot{\vec{x}}^2 - V(x)$$

τότε η εξίσωση Euler-Lagrange είναι:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{x}_i} \right) - \frac{\partial L}{\partial x_i} = 0 \quad \text{όπου } i=1,2,3.$$

Έχουμε όμως ότι:

$$\frac{\partial L}{\partial x_i} = - \frac{\partial V}{\partial x_i}$$

Επίσης :

$$\frac{\partial L}{\partial \dot{x}_i} = \left(\frac{1}{2} m \dot{x}^2 \right) = m \dot{x}_i$$

οπότε:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{x}_i} \right) = m \ddot{x}_i$$

Άρα η εξίσωση Euler-Lagrange μπορεί να γραφεί:

$$m \ddot{x}_i + \nabla V = 0 \quad (1)$$

Η δύναμη ως συνάρτηση του δυναμικού δίνεται από τη σχέση:

$$\vec{F} = -\nabla V(x)$$

οπότε η (1) δίνει:

$$\vec{F} = m \ddot{\vec{x}} \quad (2)$$

η οποία είναι η Νευτώνεια εξίσωση για σώμα σταθερής μάζας.

Αν συμβολίσουμε u την ταχύτητα τότε:

$$\ddot{\vec{x}} = \frac{d\vec{u}}{dt} \quad \text{και} \quad m \ddot{\vec{x}} = \frac{d\vec{p}}{dt}$$

όπου p η ορμή σώματος σταθερής μάζας.

Τελικά από την (2) παίρνουμε την εξίσωση:

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt}$$

η οποία είναι ο δεύτερος νόμος του Νεύτωνα στη γενική του μορφή.
Από τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι η Λαγκρανζιανή προσέγγιση είναι
ισοδύναμη με τη Νευτώνεια .

Παράρτημα 3

Η Αρχή του Hamilton

Η αρχή του Hamilton μας βεβαιώνει ότι *‘η τροχιά την οποία ακολουθεί
ένα σωματίδιο είναι αυτή η οποία ενέχει την ελάχιστη δράση’*. Η δράση S
μπορεί να εκφραστεί ως ολοκλήρωμα μιας άλλης συνάρτησης, της
Λαγκρανζιανής, L , η οποία εξαρτάται από τη θέση (x) και την ταχύτητα
(\dot{x}) του σωματιδίου ως εξής:

$$S = \int_{t_1}^{t_2} L(x, \dot{x}) dt$$

Η Λαγκρανζιανή L εκφράζεται ως διαφορά κινητικής και δυναμικής
ενέργειας :

$$L(x, \dot{x}) = K - V = \frac{1}{2} m \dot{x}^2 - V(x) \quad (1)$$

Πρέπει να δείξουμε ότι η τροχιά η οποία αντιστοιχεί σε ελάχιστη δράση
είναι αυτή την οποία θα ακολουθούσε το σωματίδιο αν σε κάθε σημείο
υπάκουε την εξίσωση κίνησης του Νεύτωνα.

Υποθέτουμε ότι τα (x) και (\dot{x}) μεταβάλλονται ελαφρώς σε κάθε σημείο
της τροχιάς (εκτός από τα άκρα τα οποία είναι σταθερά). Η

Λαγκρανζιανή μεταβάλλεται κατά δL άρα για το ολοκλήρωμα της δράσης έχουμε:

$$\delta S = \int_{t_1}^{t_2} \delta L(x, \dot{x}) dt.$$

Επειδή η L εξαρτάται από τα (x) και (\dot{x}) , η μεταβολή των ποσοτήτων αυτών οδηγεί σε μεταβολή του L ως εξής:

$$\delta L = \left(\frac{\partial L}{\partial x} \right) \delta x + \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{x}} \right) \delta \dot{x}.$$

Ολοκληρώνοντας κατά μέρη παίρνουμε:

$$\delta S = \int_{t_1}^{t_2} \frac{\partial L}{\partial x} \delta x dt + \int_{t_1}^{t_2} \frac{\partial L}{\partial \dot{x}} \frac{d\delta x}{dt} dt = \int_{t_1}^{t_2} \frac{\partial L}{\partial x} \delta x dt + \left\{ \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{x}} \right) \delta x \Big|_{t_1}^{t_2} - \int_{t_1}^{t_2} \left[\frac{d}{dt} \frac{\partial L}{\partial \dot{x}} \right] \delta x dt \right\}$$

Επειδή τα ακραία σημεία της τροχιάς είναι σταθερά, το δx είναι μηδέν στα άκρα, άρα ο μεσαίος όρος είναι μηδέν. Επομένως:

$$\delta S = \int_{t_1}^{t_2} \left\{ \frac{\partial L}{\partial x} - \left(\frac{d}{dt} \right) \left(\frac{\partial L}{\partial \dot{x}} \right) \right\} \delta x dt$$

Σύμφωνα με την αρχή του Hamilton, η δράση της πραγματικής τροχιάς είναι ελάχιστη. Άρα μια μικρή μεταβολή της τροχιάς αντιστοιχεί σε $\delta S=0$, την συνθήκη η οποία ισχύει στα ακρότατα(μέγιστο και ελάχιστο). Το $\delta S=0$ επιτυγχάνεται μόνο όταν η υπό ολοκλήρωση ποσότητα μηδενίζεται. Καταλήγουμε λοιπόν στις:

$$\text{εξισώσεις κίνησης Euler - Lagrange : } \left(\frac{\partial L}{\partial x}\right) - \left(\frac{d}{dt}\right)\left(\frac{\partial L}{\partial \dot{x}}\right) = 0$$

Η οποία πρέπει να ικανοποιείται σε κάθε σημείο της αληθούς τροχιάς.
Αν συνδυάσουμε την παραπάνω εξίσωση με την εξίσωση (1), έχουμε:

$$\left(\frac{\partial L}{\partial x}\right) = -\frac{dV}{dx} = F, \quad \left(\frac{d}{dt}\right)\left(\frac{\partial L}{\partial \dot{x}}\right) = \left(\frac{d}{dt}\right)m\dot{x} = m\ddot{x}.$$

Άρα: $F - m\ddot{x} = 0$, η οποία είναι η εξίσωση του Νεύτωνα. Δηλαδή η αρχή του Hamilton είναι ισοδύναμη με την εξίσωση του Νεύτωνα.

Παράρτημα 4

Παράμετροι πεδίου δυναμικής ενέργειας^[31]

```
#####  
#####  
##                                                                 ##  
##           TINKER  ---  Software Tools for Molecular Design      ##  
##                                                                 ##  
##                               Version 4.2  June 2004              ##  
##                                                                 ##  
##           Copyright (c)  Jay William Ponder  1990-2004         ##  
##                               All Rights Reserved                  ##  
##                                                                 ##  
#####  
#####
```

Force Field Selection

parameters amber99.prm

BONDTYPE MORSE

INTEGRATE VERLET

CUTOFF 12.0

TAPER 0.80

atom 2012	41	CPA	"heme alpha-C"	6	12.010	3
atom 2013	42	CPB	"heme beta-C"	6	12.010	3
atom 2014	43	CPM	"heme meso-C"	6	12.010	3
atom 2015	50	NPH	"heme pyrrole N"	7	14.010	3
atom 2016	60	FE	"heme a3 iron"	26	55.850	6
atom 2017	70	OF	"Ferryl oxygen"	8	16.000	1
atom 2018	1	CT	"Allyphatic C"	6	12.010	4
atom 2019	80	CU	"CcO copper"	29	62.930	3
atom 2020	75	OCU	"Copper oxygen"	8	16.000	2
atom 2021	45	HO2	"H-O-Cu"	1	1.008	1
atom 2023	86	MG	"MG"	12	24.305	0
atom 2024	87	CAL	"Ca"	20	40.080	0
atom 2025	88	CE1	"Alkene attached to one H"	6	12.010	3

atom	2026	89	CE2	"Alkene attached to two H"	6	12.010	3
atom	2027	90	CT3	"end of alliphatic"	6	12.010	4
atom	3000	39	HCP	"CPM hydrogen"	1	1.008	1
atom	3010	15	NA2	"NA Histidine"	7	14.010	3
atom	3020	16	NB2	"NB Histidine"	7	14.010	3
atom	3030	7	CW2	"CW Histidine"	6	12.010	3
atom	3040	5	CC2	"CC Histidine"	6	12.010	3
atom	3050	8	CR2	"CR Histidine"	6	12.010	3
atom	3060	35	H12	"CT3 Hydrogen"	1	1.008	1
atom	3070	35	H15	"hydrogen attached to CT"	1	1.000	1
atom	3080	35	H14	"hydrogen attached to CE1"	1	1.008	1
atom	3090	35	H13	"hydrogen attached to CE2"	1	1.008	1
atom	3100	31	HOp	"Propionate hydrogen"	1	1.008	1
atom	3110	31	HOa	"Asp hydrogen"	1	1.008	1
atom	3120	2	C2b	"-COOH carbon"	6	12.010	3
atom	3130	25	O2H	"-COOH -OH"	8	16.000	2
atom	3140	25	O2b	"-COOH =O"	8	16.000	1
atom	3150	60	FEA	"heme a iron"	26	55.850	6
atom	3160	85	CUA	"CuA-CuA"	29	62.930	1

Bond	42	41	299.80	1.452
Bond	42	42	340.70	1.368
Bond	42	39	367.60	1.086
Bond	41	50	377.20	1.380
Bond	41	43	360.00	1.397
Bond	50	60	270.20	2.046
Bond	43	39	367.60	1.089
Bond	6	6	510.00	1.375
Bond	6	15	400.00	1.391
Bond	42	1	230.00	1.506
Bond	80	16	070.00	2.146
Bond	80	75	070.00	1.902
Bond	45	75	545.00	0.975
Bond	60	70	315.50	1.662
Bond	60	16	050.50	2.291
Bond	15	60	050.50	2.291

Bond	15	80	070.00	2.146
Bond	85	85	090.00	2.510
Bond	88	88	440.00	1.340
Bond	88	89	500.00	1.342
Bond	88	1	375.00	1.502
Bond	89	89	510.00	1.330
Bond	88	42	450.00	1.380
Bond	88	35	360.50	1.100
Bond	89	35	365.00	1.100
Bond	2	42	450.00	1.380
Bond	2	35	330.00	1.100
Bond	90	42	230.00	1.490
Bond	35	90	322.00	1.111
Bond	25	31	545.00	0.960
Bond	88	90	383.00	1.504
Bond	1	90	222.50	1.5280
Bond	39	5	367.00	1.080

Angle	41	42	42	030.80	107.0
Angle	41	42	39	012.70	124.7
Angle	42	42	39	012.70	128.3
Angle	42	41	50	122.00	109.6
Angle	42	41	43	061.60	125.0
Angle	50	41	43	088.00	125.4
Angle	41	50	41	130.0	106.9
Angle	41	50	60	096.15	126.4
Angle	50	41	42	122.00	109.6
Angle	42	42	41	030.80	106.9
Angle	41	43	41	052.00	125.9
Angle	41	43	39	012.70	117.0
Angle	43	41	50	088.00	125.3
Angle	43	41	42	061.60	125.1
Angle	41	50	60	096.15	126.5
Angle	50	60	50	014.39	090.1
Angle	50	60	50	014.39	179.0
Angle	50	60	16	050.00	087.1
Angle	50	60	70	005.00	092.7
Angle	16	60	70	005.00	179.8

Angle	15	60	70	005.00	179.8
Angle	60	50	41	096.15	126.5
Angle	60	16	6	030.00	128.1
Angle	60	16	8	030.00	128.1
Angle	16	6	6	130.00	109.9
Angle	6	6	39	022.00	128.8
Angle	6	6	15	130.00	105.4
Angle	15	6	39	030.00	122.3
Angle	6	15	8	070.00	107.8
Angle	6	15	29	030.00	126.3
Angle	41	42	1	065.00	128.9
Angle	42	42	1	065.00	124.8
Angle	42	1	1	070.00	114.5
Angle	42	1	22	060.00	108.8
Angle	42	1	35	050.00	107.2
Angle	16	80	16	010.00	116.7
Angle	16	80	75	015.00	089.4
Angle	16	80	75	015.00	087.3
Angle	16	80	75	015.00	169.3
Angle	80	16	6	015.00	124.3
Angle	80	16	8	015.00	128.6
Angle	6	15	3	130.00	126.5
Angle	8	15	3	130.00	126.4
Angle	15	3	3	067.70	120.0
Angle	80	75	45	020.00	108.2
Angle	7	15	60	030.00	128.1
Angle	8	15	60	030.00	128.1
Angle	5	15	80	050.00	124.9
Angle	8	15	80	050.00	124.9
Angle	7	15	80	050.00	124.9
Angle	15	60	15	050.00	180.0
Angle	15	60	50	050.00	087.1
Angle	15	80	15	010.00	156.6
Angle	8	88	1	048.00	123.5
Angle	88	1	1	032.00	112.2
Angle	89	88	1	048.00	126.0
Angle	89	88	1	047.00	125.2
Angle	35	88	88	052.00	119.5

Angle	35	88	89	042.00	118.0
Angle	35	88	1	040.00	116.0
Angle	35	88	1	022.00	117.0
Angle	35	89	88	045.00	120.5
Angle	35	89	89	055.50	120.5
Angle	35	89	35	019.00	119.0
Angle	89	88	42	70.00	180.0
Angle	42	88	35	50.00	120.0
Angle	24	2	42	80.00	121.0
Angle	24	2	35	50.00	121.7
Angle	42	2	35	50.00	120.0
Angle	2	42	42	70.00	126.8
Angle	2	42	41	70.00	126.7
Angle	88	42	42	70.00	126.8
Angle	88	42	41	70.00	126.8
Angle	88	1	35	42.00	111.5
Angle	1	88	88	48.00	123.5
Angle	1	88	1	35.00	112.0
Angle	90	42	41	65.00	126.7
Angle	90	42	42	65.00	126.8
Angle	35	90	42	50.00	109.5
Angle	35	90	35	35.50	108.4
Angle	88	1	88	48.00	133.9
Angle	88	1	88	48.00	133.9
Angle	2	25	31	65.00	108.0
Angle	15	80	75	15.00	089.4
Angle	15	80	75	15.00	087.3
Angle	15	80	75	15.00	169.3
Angle	7	15	3	130.0	126.5
Angle	88	90	35	042.0	115.5
Angle	90	88	90	060.0	120.0
Angle	88	88	90	048.0	123.5
Angle	1	88	90	058.4	113.5
Angle	25	2	35	050.0	121.7
Angle	25	2	42	080.0	121.0
Angle	42	1	90	070.0	113.0000
Angle	22	1	90	075.7	110.1000
Angle	90	1	35	034.6	110.1000

Angle	1	90	35	034.6	110.1000	
Angle	39	5	15	050.0	120.00	
Angle	39	5	7	050.0	120.00	
Torsion	42	42	41	50	0.000	000.0 2
Torsion	42	42	41	43	1.800	180.0 2
Torsion	39	42	41	50	0.000	000.0 2
Torsion	39	42	41	43	1.200	180.0 2
Torsion	41	42	42	41	1.800	180.0 2
Torsion	41	42	42	39	1.200	180.0 2
Torsion	39	42	42	41	1.200	180.0 2
Torsion	39	42	42	39	1.200	180.0 2
Torsion	42	41	50	41	0.000	000.0 2
Torsion	42	41	50	60	0.000	000.0 2
Torsion	43	41	50	41	0.000	000.0 2
Torsion	43	41	50	60	0.000	000.0 2
Torsion	42	41	43	41	1.800	180.0 2
Torsion	42	41	43	39	1.200	180.0 2
Torsion	50	41	43	41	0.000	000.0 2
Torsion	50	41	43	39	0.000	000.0 2
Torsion	41	50	41	42	0.000	000.0 2
Torsion	41	50	41	43	0.000	000.0 2
Torsion	60	50	41	42	0.000	000.0 2
Torsion	60	50	41	43	0.000	000.0 2
Torsion	41	50	60	50	0.000	000.0 2
Torsion	41	50	60	16	0.000	000.0 2
Torsion	41	50	60	70	0.000	000.0 2
Torsion	50	41	42	42	0.000	000.0 2
Torsion	50	41	42	39	0.000	000.0 2
Torsion	43	41	42	42	1.800	180.0 2
Torsion	43	41	42	39	1.200	180.0 2
Torsion	41	43	41	50	0.000	000.0 2
Torsion	41	43	41	42	1.800	180.0 2
Torsion	39	43	41	50	0.000	000.0 2
Torsion	39	43	41	42	1.200	180.0 2
Torsion	50	60	50	41	0.000	000.0 2
Torsion	16	60	50	41	0.000	000.0 2
Torsion	70	60	50	41	0.000	000.0 2

Torsion	50	60	16	6	0.047	000.0	4
Torsion	50	60	16	8	0.047	000.0	4
Torsion	70	60	16	6			
Torsion	70	60	16	8			
Torsion	60	16	6	6			
Torsion	60	16	6	39			
Torsion	8	16	6	6			
Torsion	60	16	8	15			
Torsion	60	16	8	40			
Torsion	16	6	6	15			
Torsion	16	6	6	39	1.200	180.0	2
Torsion	39	6	6	15	1.200	180.0	2
Torsion	39	6	6	39			
Torsion	6	6	15	8			
Torsion	6	6	15	29			
Torsion	39	6	15	8	1.200	180.0	2
Torsion	39	6	15	29			
Torsion	6	15	8	16			
Torsion	6	15	8	40	1.200	180.0	2
Torsion	43	41	42	1	0.000	000.0	6
Torsion	50	41	42	1	0.000	000.0	6
Torsion	41	42	42	1	0.000	000.0	6
Torsion	39	42	42	1	1.200	180.0	2
Torsion	41	42	1	1	0.000	000.0	6
Torsion	41	42	1	22	0.000	000.0	6
Torsion	41	42	1	35	0.000	000.0	6
Torsion	42	42	1	1	0.000	000.0	6
Torsion	42	42	1	22	0.000	000.0	6
Torsion	42	42	1	35	0.000	000.0	6
Torsion	42	1	1	35	0.195	000.0	3
Torsion	42	1	22	31	0.140	000.0	3
Torsion	16	80	16	6	5.000	180.0	3
Torsion	16	80	16	8	5.000	180.0	3
Torsion	75	80	16	6	0.000	180.0	3
Torsion	75	80	16	8	0.000	180.0	3
Torsion	16	80	75	45	0.000	000.0	2
Torsion	80	16	6	6			
Torsion	80	16	6	39			

Torsion	80	16	8	15			
Torsion	80	16	8	40			
Torsion	6	6	15	3			
Torsion	39	6	15	3			
Torsion	3	15	8	16			
Torsion	3	15	8	40			
Torsion	6	15	3	3	12.00	180.0	2
Torsion	8	15	3	3	12.00	180.0	2
Torsion	15	3	3	3			
Torsion	15	3	3	39			
Torsion	3	3	3	39			
Torsion	15	3	3	22			
Torsion	39	3	3	3			
Torsion	39	3	3	39			
Torsion	39	3	3	22			
Torsion	39	6	6	39			
Torsion	5	7	15	60			
Torsion	39	7	15	60			
Torsion	15	8	15	60			
Torsion	40	8	15	60			
Torsion	7	15	60	15			
Torsion	8	15	60	15			
Torsion	8	15	60	50	0.047	000.0	4
Torsion	1	5	15	80			
Torsion	7	5	15	80			
Torsion	80	15	8	15			
Torsion	80	15	8	40			
Torsion	5	15	80	15	0.000	180.0	3
Torsion	5	7	15	80			
Torsion	39	7	15	80			
Torsion	15	8	15	80			
Torsion	40	8	15	80			
Torsion	7	15	80	15	0.000	180.0	3
Torsion	42	1	1	2	0.195	000.0	3
Torsion	1	42	42	1	0.000	000.0	6
Torsion	42	1	1	1	0.195	000.0	3
Torsion	41	50	60	15	0.000	000.0	2
Torsion	7	15	60	50	0.047	000.0	4

Torsion	8	15	80	15	0.000	180.0	3
Torsion	7	15	60	70			
Torsion	8	15	60	70			
Torsion	88	88	1	35	0.030	000.0	3
Torsion	89	88	1	1	0.500	000.0	3
Torsion	89	88	1	35	0.120	000.0	3
Torsion	35	88	1	35	0.870	000.0	3
Torsion	35	88	1	1	0.120	000.0	3
Torsion	35	88	1	35	0.870	000.0	3
Torsion	35	89	88	90	5.200	180.0	2
Torsion	35	88	89	90	5.200	180.0	2
Torsion	1	88	88	1	5.200	180.0	2
Torsion	1	89	89	1	4.900	180.0	2
Torsion	42	88	89	35	5.000	180.0	2
Torsion	35	88	89	35	5.000	180.0	2
Torsion	89	88	42	42	3.000	180.0	2
Torsion	89	88	42	41	3.000	180.0	2
Torsion	35	88	42	42	3.000	180.0	2
Torsion	35	88	42	41	3.000	180.0	2
Torsion	24	2	42	42	3.000	180.0	2
Torsion	24	2	42	41	3.000	180.0	2
Torsion	35	2	42	42	3.000	180.0	2
Torsion	35	2	42	41	3.000	180.0	2
Torsion	1	42	42	2	0.000	000.0	6
Torsion	41	42	42	2	0.000	000.0	6
Torsion	1	42	42	88	0.000	000.0	6
Torsion	41	42	42	88	0.000	000.0	6
Torsion	2	42	41	43	1.200	180.0	2
Torsion	2	42	41	50	0.000	000.0	6
Torsion	88	42	41	43	1.200	180.0	2
Torsion	88	42	41	50	0.000	000.0	6
Torsion	1	1	1	88	0.195	000.0	3
Torsion	35	1	1	88	0.195	000.0	3
Torsion	1	1	88	88	0.500	000.0	3
Torsion	35	88	88	1	5.200	180.0	2
Torsion	88	88	1	1	0.500	000.0	3
Torsion	1	88	1	1			
Torsion	1	88	1	35			

Torsion	88	1	1	88	0.195	000.0	3
Torsion	88	1	1	35	0.195	000.0	3
Torsion	35	42	90	41	0.000	000.0	6
Torsion	35	90	42	41	0.000	000.0	6
Torsion	35	90	42	42	0.000	000.0	6
Torsion	43	41	42	90	1.200	180.0	2
Torsion	50	41	42	90	0.000	000.0	2
Torsion	90	42	42	41	1.200	180.0	2
Torsion	90	42	42	1	0.000	000.0	6
Torsion	90	42	42	39	0.000	000.0	6
Torsion	90	42	42	88	0.000	000.0	6
Torsion	39	42	42	2	0.000	000.0	6
Torsion	39	42	42	88	0.000	000.0	6
Torsion	42	42	88	35	3.000	180.0	2
Torsion	41	42	88	35	3.000	180.0	2
Torsion	42	42	88	89	3.000	180.0	2
Torsion	41	42	88	89	3.000	180.0	2
Torsion	1	88	1	88			
Torsion	88	88	1	88			
Torsion	1	2	25	31			
Torsion	25	2	25	31			
Torsion	5	15	80	75	0.000	180.0	3
Torsion	8	15	80	75	0.000	000.0	2
Torsion	7	15	80	75	0.000	000.0	2
Torsion	15	80	75	45	0.000	000.0	2
Torsion	5	7	15	3			
Torsion	7	15	3	3	12.00	180.0	2
Torsion	15	8	15	3			
Torsion	33	3	3	15			
Torsion	39	7	15	3			
Torsion	25	2	42	42	3.000000	180.000000	2
Torsion	25	2	42	41	3.000000	180.000000	2
Torsion	90	88	1	1	0.030000	180.000000	3
Torsion	90	88	1	35	0.120000	0.000000	3
Torsion	1	88	90	35	0.030000	0.000000	3
Torsion	1	88	88	90	5.200000	180.000000	2
Torsion	35	88	88	90	5.200000	180.000000	2
Torsion	88	88	90	35	0.030000	0.000000	3

Torsion	90	88	90	35	0.030000	0.000000	3
Torsion	42	42	1	90	0.000000	0.000000	6
Torsion	41	42	1	90	0.000000	0.000000	6
Torsion	90	1	22	31	1.330000	0.000000	1
Torsion	42	1	90	35	0.200000	0.000000	3
Torsion	22	1	90	35	0.200000	0.000000	3
Torsion	35	1	90	35	0.200000	0.000000	3
Torsion	39	5	15	8	5.600000	180.0000	4
Torsion	39	5	15	80	5.600000	180.0000	4
Torsion	39	5	7	15	21.50000	180.0000	4
Torsion	39	5	7	39	21.50000	180.0000	4
Torsion	39	5	15	29	5.600000	180.0000	4

imptors	16	6	8	60	29.4	000.0
imptors	42	41	50	41	20.8	000.0
imptors	1	1	1	42	90.0	000.0
imptors	35	41	41	43	29.4	000.0
imptors	50	41	41	60	137.4	000.0
imptors	50	41	42	42	40.6	000.0
imptors	50	41	43	41	18.3	000.0
imptors	50	43	42	41	32.7	000.0
imptors	39	41	41	43	29.4	000.0
imptors	39	42	2	2	20.0	000.0
imptors	35	42	2	2	20.0	000.0
imptors	35	35	2	2	20.0	180.0
imptors	39	39	2	2	20.0	180.0
imptors	42	41	42	2	90.0	000.0
imptors	42	35	1	2	90.0	000.0
imptors	90	41	42	42	90.0	000.0
imptors	1	41	42	42	90.0	000.0

charge	2012	+0.310
charge	2013	-0.210
charge	2014	-0.382
charge	2015	-0.627
charge	2016	+1.437
charge	2017	-0.547

charge 2018	-0.120
charge 2019	+1.271
charge 2020	-0.908
charge 2021	+0.382
charge 2027	-0.100
charge 3000	+0.207
charge 2023	+1.250
charge 2024	+1.250
charge 2025	-0.110
charge 2026	-0.110
charge 3010	-0.452
charge 3020	-0.485
charge 3030	-0.082
charge 3040	-0.128
charge 3050	+0.134
charge 3060	+0.033
charge 3070	+0.060
charge 3080	+0.110
charge 3090	+0.055
charge 3100	+0.428
charge 3110	+0.428
charge 3120	+0.909
charge 3130	-0.655
charge 3140	-0.582
charge 3150	+1.270
charge 3160	+0.952

vdw	70	1.70000	0.1200
vdw	45	0.50000	0.0150
vdw	75	1.70000	0.1200
vdw	22	1.60000	0.2055
vdw	41	1.80000	0.0900
vdw	42	1.80000	0.0900
vdw	43	1.80000	0.0900
vdw	50	1.85000	0.2000
vdw	88	2.09000	0.0680
vdw	89	2.08000	0.0640

vdw	90		2.06000	0.0800
vdw	1		2.27500	0.0200
vdw	87		1.71000	0.1200
vdw	86		1.18500	0.0150
vdw	60		2.91200	0.0130
vdw	80		2.49500	0.0050
vdw	85		2.49500	0.0050

RESTRAIN-DISTANCE 92 93 7.0 3.50 5.20

#TIP3P water molecules

atom	2028	91	OH2	"O Water (TIP3P)"	8	15.999
	2					
atom	2029	92	H2O	"H Water (TIP3P)"	1	1.008
	1					
vdw	91			3.150656111		0.152072595
vdw	92			1.468000000		-0.007800000
bond	91	92		529.6000000		0.957200000
angle	92	91	92	34.05		104.52
ureybrad	92	91	92	38.25		1.5139
charge	2028			-0.834		
charge	2029			0.417		

Βιβλιογραφία

- [1] Βιολογία Κυττάρου, 4^η έκδοση,
Λ.Χ.Μαργαρίτης,Β.Κ.Γαλανόπουλος,Κ.Ε.Κεραμάσης,Ε.Σ.Μαρίνος,Ι.Σ.Παπασιδέρη,
Δ.Ι.Σταβοπόδης,Ι.Π.Τρουγκάκος, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, **2003**, 446.
- [2] Βιολογία Κυττάρου, 4^η έκδοση,
Λ.Χ.Μαργαρίτης,Β.Κ.Γαλανόπουλος,Κ.Ε.Κεραμάσης,Ε.Σ.Μαρίνος,Ι.Σ.Παπασιδέρη,
Δ.Ι.Σταβοπόδης,Ι.Π.Τρουγκάκος, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, **2003**, 454-456.
- [3] Διδακτορική διατριβή, Β. Δασκαλάκης, **2006**, Βιβλιοθήκη Πανεπ. Κρήτης.
- [4] Βιοχημεία, 3η έκδοση, Lubert Stryer, 1ος τόμος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις
Κρήτης, **1997**, σελ.428.
- [5] Iwata, S.; Ostermeier,C.;Ludwig,B;Michel,H.*Nature* **1995**,376,660-669.
- [6] Ostermaier, C.; Harrenga, A.; Ermer, U.; Michel,H.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Biochemistry* **1997**, 94, 10547-10553.
- [7] Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.;
Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yoshikawa, S. *Science* **1995**, 269, 1069-1074.
- [8] Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Tsukihara, T.J. *Bioenerg. Biomembr.* **1998**,30,
7-14.
- [9] Garcia-Horsman, J. A.; Berry, E.; Shapleigh, J. P.; Alben, J. O.; Gennis, R. B.
Biochemistry **1994**, 33, 3113-3119.
- [10] Frank, V.; Kadenbach, B. *Febs Lett.* **1996**, 382, 121-124.
- [11] Saraste, M. *Q. Rev. Biophys.* **1990**, 23, 331-366
- [12] Harrenga A and Michel H. *J Biol Chem* ,**1999**,274,33296–33299.
- [13] Tsukihara T, Shimokata K, Katayama Y, Shimada H, Muramoto K, Aoyama
H,Mochizuki M, Shinzawa-Itoh K, Yamashita E, Yao M, Ishimura Y, and Yoshikawa
S.*Proc Natl Acad Sci USA* **2003**,100,15304–15309.

[14] Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yamashita E, Inoue N, Yao M, Fei MJ, Libeu CP, Mizushima T, Yamaguchi H, Tomizaki T, and Tsukihara T. *Science*, **1998**,280,1723–1729.

[15] Greenwood, C.; Gibson, Q. H. *J.Biol. Chem.* **1967**, 242, 1782-1787.

[16] Woodruff WH, Einarsdottir O, Dyer RB, Bagley KA, Palmer G, Atherton SJ, Goldbeck RA, Dawes TD, and Kliger DS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**,88,2588-2592.

[17] Belevich, I.; Verkhovsky, M. *Antioxid Redox Signal.* **2007**, Oct 20; : 17949262

[\(P,S,E,B,D\)](#)

[18] Siegbahn E.M.; Blomberg M.R.A.; Blomberg M.L.; *J Phys. Chem,B* **2003**,107,10946–10955.

[19] Gennis, R.B *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998, 95, 12747-12749.

[20] Wikström, M. *Nature* **1989**, 338, 776-778.

[21] Michel, H. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1998**, 95, 12819-12824.

[22] Ruitenber, M.; Kannt, A.; Bamberg, E; Fendler, K.; Michel, H. *Nature* **2002**, 417, 99-102.

[23] Bellevich I., Verkhovsky M.I., Wikström M.K. *Nature* **2006**, 440, 829-832.

[24] Verkhovsky, M. I.; Jasaitis, A.; Verkhovskaya, M.L.; Morgan, J. E. ; Wikström, M. *Nature* 1999, 400, 480-483.

[25] Varotsis C.A.; Babcock G.T.J. *Am. Chem. Soc.* 1995,117,11260-11269.

[26] J. Xu and G. A. Voth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**,102, 6795-6800.

[27] Soulimane, T.; Buse, G.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Huber, R.; Than, M. E. *EMBO J.* **2000**, 19, 1766-1776.

[28] C.Varotsis and G.T.Babcock, *Biochemistry* **1990**,29,7357-7362.

[29] T. Ogura, S.Hirota,D.A.Proshlyakov,K.Shinzawa-Itoh,S.Yoshikawa and T.Kitagawa, *J.Am.Chem. Soc.***1996**, 118, 5443-5449

[30] S. Han, S. Takahashi and D. L. Rousseau, *J. Biol. Chem.* **2000** 275, 1910-1919.

-
- [31] Daskalakis V., Farantos S., Varotsis C., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12201-12550.
- [32] a. Varotsis, C.; Woodruff, W. H.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6439-6440; b. Varotsis, C.; Woodruff, W. H.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1297-1297.
- [33] Varotsis, C., and Babcock, G. T. *Biochemistry* **1990**, *32*, 7357-7362.
- [34] Varotsis, C.; Woodruff, W. H., and Babcock, G. T. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11131-11136.
- [35] Ogura, T.; Takahashi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14721-14723.
- [36] Han, S.; Ching, Y.-C., and Rousseau, D. L. *Nature* **1990**, *348*, 89-90.
- [37] J.W. Ponder (2004) *Tinker 4.2*, Washington University.
- [38] K. Koutsoupakis, T. Soulimane and C. Varotsis, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2438-2444.
- [39] Daskalakis V., Farantos S.C., Varotis C., *AIP Conf. Proc.* **2007**, 963(2), 31-34.
- [40] Ο ΧΗΜΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ, J.N.MURELL, S.F.A.KETTLE, J.KN.TEDDER, Μετάφραση: Σταύρος Κ. Φαράντος ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ **1999**.
- [41] ΧΗΜΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ: Οι βασικές έννοιες, Σταύρος Κ. Φαράντος, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης και Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ, Ι.Τ.Ε. (<http://tccc.iesl.forth.gr/education/local.html>), **2007**, 12-19.
- [42] Βιοχημεία *Lubert Stryer*, Stanford University. 3^η έκδοση Μετάφραση: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ, ΗΡΑΚΛΕΙΟ **1997**, 8.
- [43] ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ, Σταύρος Κ. Φαράντος, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης και Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ, Ι.Τ.Ε. (<http://tccc.iesl.forth.gr/education/local/Thermodynamics/book/node70.html>), **2007**, 9.
- [44] ΕΠΙ ΘΕΜΑΤΩΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΗΝΑΜΙΚΗΣ (MD) & MONTE CARLO (MC) ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ Ιωάννης Σάμος. Τμήμα Χημείας Παν/μιου Αθηνών, **1998-99**.
- [45] Oda K., Ogura T., Appelman E., Yoshikawa S. *FEBS Letters* **2004**, *570*, 161-165.

[46] Proshlyakov D. A., Pressler M. A., Babcock G.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 8020-8025.

[47] Pinakoulaki E., Pfitzner U., Ludwig B., Varotsis, C. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 18761-18766.

[48] Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T. *Biochemistry* **1996**, 35, 8580–8586.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα 2007-2008 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Χημείας Σταύρου Φαράντου, τον οποίο ευχαριστώ *θερμά* για την πολύτιμη επιστημονική του καθοδήγηση, ψυχολογική στήριξη και συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της εργασίας. Ο έπαινος του - όπου υπήρξε - βοήθησε να ξεπεραστεί η αμφιθυμία που συνοδεύει κάθε συγγραφή.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της επιστημονικής επιτροπής, τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Βαρώτση και τον αναπληρωτή Καθηγητή Γιώργο Φρουδάκη.

Ευχαριστώ τον dr. Βαγγέλη Δασκαλάκη (του εργαστηρίου Βιοφυσικής Χημείας) για τη συνεισφορά του στην πραγματοποίηση των αριθμητικών πειραμάτων, την πολύτιμη τεχνική βοήθεια και την υποστήριξη από το ξεκίνημα έως το τέλος αυτής της εργασίας.

Ευχαριστίες απευθύνονται ακόμα στα μέλη του εργαστηρίου μου και συγκεκριμένα στον υποψήφιο dr. Μανόλη Κλώντζα, τον υποψήφιο dr. Γιώργο Δημητρακάκη, τον dr. Massimiliano Porrini, dr. Γιώργο Φανουργάκη, dr. Jaime Suarez, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κωνσταντίνο Βογιατζή και Κωνσταντίνο Φιορέτο, για τη συνεργασία και συναδελφικότητα τους.

Επίσης ευχαριστώ τους dr. Σταμάτη Σταματιάδη και dr. Μανόλη Τυλιανάκη (του τμήματος Επιστήμης Υλικών) για τη βοήθεια τους σε τεχνικά θέματα.

Ευχαριστώ τον Μάνο Γιατρωμανολάκη (του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ – I.T.E.) για τη διαχείριση στο "πλέγμα υπολογιστικών συστημάτων- Grid".