INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIIȚE A MOLDOVEI

REFERAT ŞTIINȚIFIC la tema tezei de doctorat

"Aspecte fizico-chimice și simulări de dinamică moleculară ale procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier"

SPECIALITATEA 144.01 – CHIMIE-FIZICĂ

ANGHEL LILIA, drd. anul IV, f/r

<u>TEMA:</u> "DEDUCEREA UNOR INFORMAȚII STRUCTURALE APELÂND LA TEHNICI COMPUTAȚIONALE PENTRU PREZICEREA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE ALE SECVENȚELOR PROTEICE DE LACTOFERINĂ"

Conducător științific DUCA GHEORGHE, acad., dr. hab., prof. univ.

CHIŞINĂU, 2014

CUPRINS REFERAT

1.	LACTOFERINA	3
1.1.	Structura lactoferinei	3
1.2.	Studiu de aliniament multiplu al secvențelor de lactoferină	5
1.3.	Calcule pKa	8
1.4.	Calculul potențialului electrostatic de suprafață	11
2.	BAZELE TEORETICE ALE DINAMICII MOLECULARE	14
2.1.	Simularea moleculară	14
2.2.	Mecanica moleculară	14
2.3.	Metoda dinamicii moleculare	15
2.4.	Câmpul de forțe	16
3.	EXPERIMENTELE DE SIMULARE A DINAMICII MOLECULARE	17
3.1.	Procedura generală de simulare	17
3.2.	Simulări de dinamică moleculară a lactoferinei	17
4.	ANALIZA SIMULĂRILOR DE DINAMICĂ MOLECULARĂ	20
4.1.	Evaluarea stabilității lactoferinei în diferite conformații	20
5.	CONCLUZII	23
6.	BIBLIOGRAFIE	25

1. LACTOFERINA

1.1.Structura lactoferinei

Lactoferina este o glicoproteină monomer cu masa moleculară în jur de 80 kDa, responsabilă pentru legarea ionilor de Fe^{3+} în fluidele fiziologice. Această proteină a fost izolată pentru prima data din laptele bovin [1], iar cercetările ulterioare au arătat că lactoferina prezintă o afinitate înaltă față de ionii de fier. Mai târziu această proteină a fost recunoscută ca membru al familiei transferinelor, adică a proteinelor capabile să lege și să transfere ionii de Fe^{3+} [2].

Lactoferina a fost identificată în secrețiile glandelor exocrine precum și plasma sangvină.

S-a concluzionat că pricipala sursă de lactoferină plasmatică sunt granulațiile specifice neutrofilelor [3,4]. Deși lactoferina a fost categorizată ca o glicoproteină cu o afinitate înaltă față de ionii de fier trivalent, studiile au arătat că același situs activ al proteinei este capabil de a lega ioni ai altor metale. Astfel, s-a ajuns la concluzia că situsul activ al proteinei dispune de o flexibilitate suficientă pentru a modifica numărul de coordinație [5].

Lactoferina constă dintr-un singur lanț polipetidic alcătuit din 600-700 aminoacizi organizați în structuri de tip α -helix și foaie β -pliată. Lanțul polipetidic al lactoferinei este pliat în doi lobi elisoidali (N și C) conectați printr-un helix (Figura 1A). Fiecare lob dispune de un situs activ în care ionul de fier este fixat de reziduurile a patru aminoacizi: acidul aspartic, două tirozine și o histidină (Figura 1C). Fiecare moleculă de lactoferină poate lega doi atomi de fier trivalent, iar în funcție de nivelul de saturație cu fier se pot distinge trei forme ale lactoferinei: apolactoferina (forma fără fier), lactoferina monoferică și lactoferina diferică (hololactoferina). Specificitatea procesului de legare a ionilor de Fe³⁺ se datorează participării ionilor de carbonat. Anionul trebuie sa fie fixat de situsul activ al proteinei pentru a inițializa procesul de legare a ionilor metalului. Tabelul 1 prezintă dimensiunea legăturilor chimice dintre ionii de fier și liganzii din sfera de coordinare. Datele au fost obținute din analiza fișierului de structură al lactoferinei umane (1B0L.pdb) determinată experimental cu ajutorul tehnicilor de difracție de raze-X.

Reacția este reversibilă și dependentă de pH-ul mediului de reacție, lobul N al proteinei eliberează fierul la pH 5.0 iar lobul C reține fierul până la pH 3.0 [6]. Studiile experimentale au arătat că substratul lactoferinei își schimbă conformația în timpul reacției. Astfel, hololactoferina va adopta conformația închisă, pe când apolactoferina va avea conformația deschisă.



Figure 1. A: Reprezentarea grafică a apolactoferinei (1LHF.pdb). B: Hololactoferina (1B0L.pdb). Reprezentarea sferei de coordonare a ionului de fier în lobul N al lactoferinei de către reziduurile aminoacizilor.

Legătura	lobul N	lobul C
Fe-O:Asp60 (Asp395)	2.146	2.008
Fe-O:Tyr92 (Tyr435)	2.035	2.004
Fe-O:Tyr192 (Tyr 528)	1.817	1.848
Fe-N:His253 (His597)	2.087	2.194
Fe-O1:CO ₃ ²⁻ 695(CO ₃ ²⁻ 696)	2.007	2.286
$\text{Fe-O2:CO}_3^{2-}695(\text{CO}_3^{2-}696)$	2.138	2.010

Dimensiunea legăturilor chimice (Å) ale ionilor de Fe³⁺ coordinați la liganzii din centrii activi ai lactoferinei umane.

Lactoferina posedă numeroase funcții biologice. Proprietățile biochimice ale lactoferinei derivă din caracteristicile structurale ale acesteea precum și din funcția de bază de legare a ionilor de fier. Lactoferina este implicată în mai multe procese fiziologice inclusiv antimicrobiene [7], imunomodulatoare [8] și anticancerigene [9, 10]. Din acest motiv, investigarea proprietăților lactoferinei este un domeniu de interes remarcabil, iar studierea mecanismelor de acțiune ale acesteea va contribui la dezvoltarea unor strategii pentru aplicații biotehnologice în medicină.

Obiectivul principal al acestui studiu este de a studia structura și mecanismul de interacție a lactoferinei cu ionii de Fe³⁺ prin aplicarea tehnicilor computaționale. Obiectivul acestui studiu se realizează prin dezvoltarea unui protocol de investigare a structurilor moleculare biologice care combină o serie de metode de cercetare și caracterizare structurală, pregărtirea configurațieie de pornire și crearea sistemului molecular pentru simulare, experimente de simulare a dinamicii moleculare și interpretarea datelor obținute.

1.2. Studiu de aliniament multiplu al secvențelor de lactoferină

În prezent sunt disponibile în băncile de date structuri moleculare ale lactoferinelor izolate din diferite specii (Tabelul 2). În acest context, analiza acestor structuri în ideea de a evalua gradul de similaritate / omologie reprezintă o etapă importantă de realizat.

Metoda de *aliniament multiplu al secvențelor* (Multiple Sequence Alignment) este utilizată pentru evaluarea seturilor de secvențe și structuri macromoleculare biologice ce au o relație de evoluție comună. Folosirea combinată a informației oferită de secvențe și a instrumentelor de calcul va conduce la creșterea înțelegerii funcției proteinelor cu structură similară.

Fișierele ce conțin informația de structură ale lactoferinelor au fost obținute din Banca de Date pentru Proteine (Protein Data Bank [16]). Studiul de aliniament multiplu al moleculelor de lactoferină a fost realizat cu pachetul de programe MultiSeq [17]. Acest program permite evaluarea secvențelor și structurilor ale moleculelor proteice și acizilor nucleici. Pentru aliniamentul secvențelor lactoferinelor cercetate a fost utilizat plug-inul ClustalW [18]. Pentru aliniamentul structurilor lactoferinelor cercetate a fost utilizat plug-inul STAMP [19]. Rularea algoritmelor incluse în ambele plug-inurile STAMP și ClustalW rezultă în generarea unui set de parametri: Q_{res} (similaritatea structurală), Q_H (omologia structurală), Identitatea Procentuală, RMSD (devierea medie pătratică). Valorile acestor parametri o să difere în dependență de algoritmul aplicat pe același set de proteine. Prin urmare, acest set de parametri poate fi folosit pentru evaluarea calității aliniamentului și pentru identificarea similarităților sau diferențelor dintre proteinele investigate.

Tabelul 2

Descrierea	Referința
Lactoferina diferică umană	[11]
Lactoferina diferică de bivol	[12]
Lactoferina diferică bovină	[13]
Lactoferina diferică de cal	[14]
Lactoferina diferică de cămilă	[15]
	Lactoferina diferică umană Lactoferina diferică de bivol Lactoferina diferică bovină Lactoferina diferică de cal Lactoferina diferică de cămilă

Codul PDB al fișierelor de structură folosite pentru acest studiu.

Parametrii aliniamentului de structură și secvență pentru cele cinci lactoferine cercetate sunt prezentați în Tabelul 3 și 4. Lactoferina umană a fost folosită ca moleculă de referință.

Tabelul 3

	Buffalo	Bovine	Equine	Camel
	lactoferrin	lactoferrin	lactoferrin	lactoferrin
Q _H	0.8393	0.8160	0.8688	0.3869
RMSD (Å)	1.5354	1.8106	1.2773	1.6093
Percent Identity (%)	69.35	68.88	74.31	30.60

Prametrii aliniamentului de structură.

	Buffalo	Bovine	Equine	Camel
	lactoferrin	lactoferrin	lactoferrin	lactoferrin
Q _H	0.8356	0.8154	0.8634	0.4503
RMSD (Å)	1.6093	1.8616	1.1414	12.6343
Percent Identity (%)	70.19	69.61	74.96	73.81

Prametrii aliniamentului de secvență.

Figura 2 reprezintă imaginea grafică rezultată în urma aliniamentului multiplu al celor cinci secvențe de lactoferină. Porțiunile colorate în albastru indică faptul că moleculele sunt bine conservate în aceste puncte. Porțiunile colorate în roșu sunt regiunile în care nu există o similaritate în structura moleculelor proteice.



Figura 2. Reprezentarea grafică rezultată din aliniamentului multiplu al structurilor lactoferinelor cercetate. Moleculele sunt colorate după Q_{res} (similaritatea reziduală).

Parametriii calculați din aliniamentul de structură arată că, în general structura lactoferinei este bine conservată printre speciiile investigate în acest studiu. În cazul lactoferinei de cămilă valoarea parametrului de omologie structurală este mai mică comparativ cu celelalte lactoferine, Q_H este 0.3869 și Identitatea Procentuală este 30.60%. Aliniamentul de secvență arată că lactoferina de cămilă diferă nu doar în compoziție chimică ci și din punct de vedere al aranjamentului aminoacizilor în molecula proteică (RMSD=12.6343).

Figura 3 prezintă graficul similarității structurale (Q_{res}) per reziduu al lactoferinei umane și lactoferinei de cămilă. Chiar dacă valorile Q_{res} diferă între specii, forma graficelor este similară în ambele cazuri indincând un profil strucural comun.



Figura 3. Graficul similarității structurale per reziduu obținut pentru lactoferina umană (negru) și lactoferina de cămilă (gri).

1.3.Calcule pKa

Procesul de legare și eliberare a ionilor de fier de către molecula lactoferinei este precedat de modificări ale conformației moleculare. Datorită interacțiilor intermoleculare, tranziția proteinei de la forma deschisă la forma închisă duce la modificarea stării de protonare a reziduurilor din compoziția proteinei. Pentru cercetarea reacțiilor de protonarea-deprotonare a reziduurilor lactoferinei și identificarea aminoacizilor implicați direct în legarea și eliberarea ionilor de fier a fost aplicat modelul electrostatic continuu Poisson-Boltzmann pentru molecula de lactoferină în conformația deschisă și închisă în starea de protonare corespunzătoare unui pH fiziologic.

Calculele pKa au fost realizate cu H++ web server [20-22]. Metoda care stă la baza acestor determinări a fost descrisă de descrisă de Bashford D. şi Karplus, M. [23]. Aceasta constă în calcularea valorilor pKa pentru grupele ionizabile în sistem prin aplicarea modelului electrostatic continuu Poisson-Boltzmann [24,25]. Determinările pKa au fost realizate în condiții de tărie ionică 150 mM, constanta dielectrică a solutului 4.0 și constanta dielectrică a solventului 80.0. Structurele PDB au fost protonate cu câmpul de forțe AMBER [26].

Datele au fos colectate pentru lobul N în patru conformații ale lactoferinei: apolactoferina umană în conformația dechisă, hololactoferina umană, hololactoferina fără ioni de CO_3^{2-} , apolactoferina umană în conformația închisă. Tabelul 5 prezintă valorile pKa calculate pentru lactoferina umană în cele patru conformații.

Rezultatele obținute confirmă că tranziția lacoferinei de la o conformație la alta este insoțită de schimbări în starea de protonare a unor reziduuri proteice specifice.

Aminoacidul Asp60 are valori pKa scăzute în toate conformațiile închise. Reieșind din informația de structură din fișierul PDB, Asp 60 formează o legătură de hidrogen cu lizina - Lys301 în conformația deschisă; în conformația închisă această legătură este absentă, ceea ce explică această diferența a valorilor pKa.

La pH fiziologic, tirozinele sunt în stare deprotonată în conformațiile închise cu excepția tirozinei Tyr92 ce are o stare de protonare stabilă în toate patru conformații și Tyr192 care este protonată în toate conformațiile închise. Această observație indică asupra importanței stării de protonare a reziduului de tirozină (Tyr-192). Protonarea acestuia în forma închisă va declanșa eliberarea ionilor de fier din compoziția lactoferinei.

Histidina His253 are valori scăzute în toate patru conformații ale lactoferinei. În formele închise al lactoferinei valorile pKa se micșorează cu 4 pK unități. Închiderea lobului lactoferinei crează un mediu de interacții electrostatice cu aminoacizii din proximitatea histidinei cauzând deprotonarea acestea.

Valorile pKa ale lizinei Lys301 suferă modificări în timpul tranzițiilor de la forma deschisă la forma închisă a lactofeinei. Deprotonarea lizinei este cauzată de aminoacizii din proximitatea acestea.

Argininile Arg89, Arg133, Arg171, Arg258 au valori ale pKa ridicate în forma deschisă și scăzute în formele închise ale lactoferinei. Spre deosebire de acestea, Arg 121 și Arg210 suferă modificări ale valorilor pKa cu 4 pK unități, subliniind importanța participării lor în procesul de închidere/deschidere al proteinei.

	pKa			
Residuu	a	b	с	d
GLU-51	6.973	5.318	5.296	5.293
*ASP-60	3.154	-0.405	-0.055	0.020
TYR-65	14.139	12.972	12.986	12.977
TYR-72	12.500	11.444	11.436	11.434
GLU-80	3.016	4.147	3.967	3.980
ARG-89	11.040	9.989	9.696	9.722
HIS-91	4.670	4.387	3.462	3.476
*TYR-92	12.218	12.034	12.615	12.857
ARG-121	8.169	3.781	3.781	3.667
ARG-133	16.499	11.879	11.946	11.936
LYS-163	9.867	7.833	7.826	7.815
ARG-171	14.304	11.913	11.908	11.908
*TYR-192	9.463	12.315	13.265	13.687
ARG-210	9.781	5.317	5.945	6.065
GLU-211	5.808	4.472	4.741	4.806
ARG-224	11.022	12.412	12.408	12.349
TYR-227	16.134	14.127	14.145	14.152
LYS-237	8.276	9.728	9.727	9.708
LYS-243	10.328	9.117	7.868	7.868
*HIS-253	2.371	-2.260	-1.762	-1.662
ARG-258	14.548	10.862	10.821	10.824
ASP-297	2.468	3.987	3.625	3.616
LYS-301	7.727	4.980	4.634	4.676
ASP-315	2.828	4.931	4.927	4.929

Valorile pKa calculate pentru lactoferina umană în diferite conformații.

 $a - pK_a$ pentru apolactoferina umană în conformația dechisă;

 $b - pK_a$ pentu hololactoferina umană;

 $c - pK_a$ pentru hololactoferina fără ioni de CO_3^{2-} ;

d - pK_a pentru apolactoferina umană în conformația închisă.

Aminoacizii din centrul activ al proteinei, direct implicați în legarea ionilor de fier sunt marcați cu asterisk.

Figura 4 prezintă dependența sarcinii totale a lactoferinei în conformația deschisă și închisă calculate în funcție de pH-ul mediului. Curbele obținute au o forma caracteristică tuturor proteinelor din familia de transferine. Deasemenea a fost calculat punctul izoelectric al proteinei cu valoarea de 9.48 pentru conformația deschisă și 9.78 pentru conformația închisă. Aceste valori corespund cu valorile punctului izoelectric determinate experimental [27,28].

Cercetarea valorilor pKa ale celor patru conformații ale lactoferinei confirmă faptul că legarea /eliberarea ionilor de fier este permisă doar pentru anumite stări de protonare ale aminoacizilor implicați în aceste procese. Starea de protonare a acestor aminoacizi este determinată de interacțiile electrostatice în care aceștia sunt implicați.



Figure 4. Dependența sarcinii totale a lactoferinei în conformația deschisă (linie continuă) și închisă (linie punctată) calculate în funcție de pH-ul mediului.

1.4. Calculul potențialului electrostatic de suprafață

La pH fiziologic lactoferina este capabilă de a fixa ionii de fier rezultând în tranziția conformației de la forma deschisă la forma închisă. Scăderea pH-ului până la 5.0 declanşează deschiderea lobului N și eliberarea ionului de fier. La valori ale pH-ului mai mici de 3.5 lobul C eliberează ionul de fier. Toate aceste procese vor induce perturbații ale potențialului electrostatic de suprafață al moleculei proteice. Prin urmare, calcule ale potențialului

electrostatic de spurafață au fost efectuate pentru valori ale pH-ului 3.0; 5.0 și 7.4. Starea de protonare a reziduurilor lacoferinei a fost desemnată în conformitate cu pH-ul ales.

Figura 5 prezintă potențialul electrostatic de suprafață calculat pentru apolactoferina în conformație închisă și deschisă la pH 7.4. Calculele au fost realizate cu pachetul de programe APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) [29]. Analizând rezultatele obținute de pe urma acestui studiu (Figura 5) se poate observa că tranziția de la forma deschisă la forma închisă rezultă în redistribuirea sarcinii negative pe suprafața moleculei proteice.

Figura 6 reprezintă distribuția potențialului electrostatic de suprafață în centrul activ al proteinei din lobul N în forma deschisă modelat pentru valori ale pH-ului 3.0; 5.0 și 7.4. Analiza rezultatelor obținue indică asupra faptului că micșorarea pH-ului induce modificări ale electrostaticii de suprafață, crescând sarcia pozitivă a proteinei. Extinderea regiunilor de sarcină pozitivă pe suprafața proteinei va crea respingerea electrostatică între reziduurile proteinei inclusiv și a celor din centrii activi ai proteinei, provocând deschiderea lobului și eliberarea ionului de fier.



Figura 5. Potențialul de suprafață al apolactoferinei închise și apolactoferinei deschise la pH 7.4. Potențialul de suprafață mapat pe suprafața biomoleculară este colorat de ±10 kT/e. Suprafețele încărcate negativ sunt colorate în roșu și cele pozitive în albastru. Izosuprafața este colorată de un potențial de ±3 kT/e.



Figura 6. Reprezentarea grafică a distribuției potențialului electrostatic de suprafață în centrul activ al proteinei din lobul N în forma deschisă. În toate trei reprezentări potențialul este colorat de ±10 kT/e.

2. BAZELE TEORETICE ALE DINAMICII MOLECULARE

2.1.Simularea moleculară

Simularea dinamicii moleculare este un set de instrumente ce îmbină calcule teoretice și tehnici computaționale utilizate pentru a studia proprietățile sistemelor moleculare în termeni de structură și interacțiuni la scală microscopică [30]. Aceste metode de studiu pot oferi informații noi, ce nu sunt accesibile în experimentele de laborator. Simulările computaționale pot fi considerate ca metode experimentale "virtuale" ce fac legătura între teorie și experimentele de laborator [31,32].

O simulare de dinamică moleculară constă în generarea unei configurații de pornire din structura moleculară determinată experimental și simularea conditiilor ce imită un mediu natural pentru această structură moleculară. Calitatea modelului dinamic obșinut depinde de calitatea configurației de pornire. Prin urmare, dinamica moleculară poate fi utilizată pentru abordarea unor întrebări specifice legate de proprietățile sistemului model studiat. Simulările de dinamică moleculară se referă în primul rând la energia sistemului molecular construit în baza structurii studiate. Astfel, etapa inițială în realizarea unui studiu de modelare moleculară constă în descrierea problemei din punct de vedere al relației structură-energie. Teoretic, există două modalități de studiu al energiei unor astfel de sisteme moleculare și anume (I) modelul mecanicii moleculare în care se aplică un câmp de forte pentru calcularea interactiilor si evaluarea energiei potențiale a sistemului ca funcție de coordonatele atomice al modelului molecular; (II) modelul mecanicii cunatice ce descrie energiea unei molecule în functie de interacțiile întrei nuclee și electroni descrise de ecuația Schrödinger [33,34]. Principiile mecanicii cunatice sunt mult mai potrivite pentru a descrie dinamica și proprietățile sistemelor moleculare [35]. Insă, din cauza limitărilor impuse de tehnologia computațională disponibilă în prezent, este aproape imposibil de a investiga prin metoda mecanicii cuantice sistemele moleculare. Prin urmare, pentru cele mai multe sisteme moleculare se va alege metoda mecanicii moleculare care apelează la aproximări precum ignorarea descrieirii cuantice a electronilor [36,37].

2.2. Mecanica moleculară

Mecanica moleculară calculează structura și energia moleculelor în baza interacțiilor intramoleculare. Această metodă de studiu nu tratează electronii în mod explicit, însă se presupune că aceștia se vor regăsi într-o distribuție optimă odată ce se vor cunoaște pozițiile nucleelor [38]. Această presupunere se bazează pe aproximația Born-Openheimer în care se

ține cont de faptul că nucleele au masă mult mai mare decât electronii astfel încât aceștia din urmă își ajustează instantaneu pozițiile odată cu mișcarea nucleelor [39,40]. În modelele mecanicii moleculare atomii sunt priviți ca sfere rigide cu raze fixe, obținute teoretic sau experimental, iar legăturile chimice sunt considerate resorturi. Interacțiile intramoleculare pe care le suferă modelul investigat sunt descrise prin funcții matematice simple. De exemplu, legea lui Hooke este utilizată pentru a urmări interacțiile între atomii legați, iar interacțiile între atomii nelegați pot fi ușor descrise de funcția Lennard-Jones. O simulare de dinamică moleculară a modelelor simplificate rezolvă numeric ecuația de mișcare a lui Newton, ceea ce face posibilă urmărirea fluctuațiilor structurale pe care le suferă sistemul în timp [41].

2.3.Metoda dinamicii moleculare

Dinamica moleculară este o metodă de simulare moleculară ce descrie dinamica și interacțiunile din sistemul modelat, luând în calcul parametri precum temperatura, presiunea și interacțiunea cu solventul. O importantă caracteristică a simulărilor de dinamică moleculară este că descrie mișcarea individuală a particulelor ca o funcție de timp. Metoda simulării dinamicii moleculare generează o traiectorie (configurație moleculară ca funcție a timpului) a unui sistem molecular prin integrarea simultană a ecuației de mișcare a lui Newton pentru toți atomii sistemului molecular:

Vectorul de poziție în sistemul de coordonate carteziene este o funcție de timp iar este forța exercitată de către atomii sistemului molecular asupra unui atom din sistem.

În practică, traiectoriile simularilor de dinamică moleculară nu pot fi obținute direct din ecuația de mișcare a lui Newton din cauza lipsei unei soluții analitice. Cunoscând forța și masa pentru fiecare atom din modelul molecular, întâi se calculează accelerația atomului . După care, viteza se calculează din relația:

În final, vectorul de poziție se calculează din relația:

(3)

Astfel, ecuațiile de mișcare cuplate sunt rezolvate pas cu pas [42]. Algoritmul dinamicii moleculare integrează numeric ecuațiile de mișcare Newton pentru a genera traiectoriile. Necătând la unele limitări, în prezent mai mulți algoritmi sunt utilizați pentru calcularea traiectoriilor.

2.4.Câmpul de forțe

Metodele mecanicii moleculare inclusiv simulările de dinamică moleculară se bazează pe aproximarea empirică a câmpului de forțe pentru calcularea interacțiilor intramoleculare și evaluarea energiilor potențiale ale sistemului investigat.

Un câmp de forțe este o expresie matematică care îmbină funcții analitice clasice ce descriu interacțiunile atomilor din sistemul modelat. Câmpul de forțe este forma analitică a potențialului interatomic , ce reprezintă energia potențială a atomi ce interacționează în funcție de poziția acestora [43]. Câmpurile de forțe sunt calibrate conform rezultatelor experimentale și calculelor cuanto-mecanice pentru modele de compuși de dimensiuni mici. Un câmp de forțe tipic include următoarele tipuri de interacțiuni:

- întinderea legăturii;
- deformarea unghiului de valență;
- torsiunea legăturii;
- interacții între atomii nelegați.

Ecuațiile însumate ale acestor interacții precum și parametrii necesari pentru descrierea atomilor și legăturilor chimice reprezintă cîmpul de forțe (Ecuația 4) [44].

$$U = \sum_{bonds} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{angles} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsions} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)]$$

+
$$\sum_{improper} V_{imp} + \sum_{LJ} 4\epsilon_{ij} (\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6}) + \sum_{elec} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$
(4)

3. EXPERIMENTELE DE SIMULARE A DINAMICII MOLECULARE

3.1. Procedura generală de simulare

Configurațiile de pornire pentru experimentele de simulări de dinamică moleculară sunt create în baza structurilor moleculare determinate experimental cu ajutorul tehnicilor de difracție de raze-X și rezonanță magnetică nucleară. Pentru acest studiu, fișierele ce conțin coordonatele inițiale ale structurii proteice au fost obținute din Banca de Date pentru Proteine.

Toate experimentelor de simulare a dinamicii moleculare din cadrul acestui studiu au fost realizate cu pachetul de programe GROMACS v4.5 [45-49]. Acest pachet de programe rulează în mediul de operare Linux.

Experimentele de dinamică moleculară în cadrul acestui studiu au fost realizate pe sistem de operare Linux kernel: Fedora v17 (64-bit).

3.2. Simulări de dinamică moleculară a lactoferinei

Studiul dinamicii moleculare a lactoferinei a fost orientat în două direcții și anume: cercetarea stabilității lactoferinei în diferite conformații și pe de altă parte studierea rolului unor reziduuri proteice din apropierea sferei de coordonare a ionilor metalului din situsul activ al lactoferinei. Modelele de difracție a razelor-X cu rezoluție înaltă ale moleculelor de apolactoferină (1LFH.pdb [50]) și hololactoferină (1B0L.pdb [51]) au fost utilizate pentru generarea configurațiilor de pornire în experimentele de simulare. Aceste două modele proteice au fost întâi rafinate prin eliminarea tuturor moleculelor de apă. Atomii ce lipseau din structura reziduurilor proteice Arg86 și Gln418 ai moleculei de hololactoferină au fost reconstruiți cu ajutorul aplicației Swiss-PdbViewer [52]. În continuare, fișierul cu informația de structură a hololactoferinei a fost folosit pentru generarea a două structuri adiționale: conformația închisă a apolactoferinei și conformația închisă ce conține 2 ioni de carbonat.

Cele patru modele de lactoferină au fost utilizate pentru experimentele de dinamică moleculară. Sistemele simulate sunt sumarizate în Tabelul 6.

Tabelul 6

Modelul simulat	Compoziția modelului	Durata simulării
S 1	Apolactoferina în conformația deschisă	5 ns
S 2	Apolactoferina în conformația închisă	5 ns
S 3	Apolactoferina în conformația închisă + 2 CO_3^{2-}	5 ns
S 4	Hololactoferina	5 ns

Sumarul simulărilor de dinamică moleculară.

PDB2PQR Server [53, 54] a fost utilizate pentru a desemna starea de protonare corespunzătoare pH-ului fiziologic tuturor reziduurilor din structura proteică a modelului simulat. Câmpul de forțe OPLS-AA (Optimized Potential for Liquid Simulations [55]) a fost implimentat pentru construirea topologiei proteinei. Sarcinile atomice ale ionului de carbonat au fost luate din referința [56]. Parametrii potențialui Lennard-Jones ai ionilor Fe³⁺ în soluție au fost luați din referința [57]. Inițial, modelul proteinei a fost plasat într-o celulă de reacție de formă cubică. Celula a fost setată astfel încât să aibă 10 Å profunzime în jurul proteinei. Condițiile la limită periodice au fost aplicate în toate direcțiile celulei de reacție. Ulterior, cutia de reacție a fost umplută cu molecule de apă modelate de funcția TIP3P [58], iar pentru neutralizarea sarcinii electrice în sistemul creat s-au adaugat ioni de clor. Figura 7 prezintă imaginea sistemului obținut. După care a urmat minimizarea energiei potențiale a sistemului timp de 100 picosecunde (ps) folosind algoritmul *steepest descent*.



Figura 7. Reprezentarea grafică a modelului de lactoferină în celula de reacție cu apă.

Pentru a stabiliza temperatura întregului sistem, după etapa de minimizare, acesta a fost echilibrat timp de 500 ps folosind ansamblul termodinamic izoterm-izocor NVT (număr constant de atomi, N, volum constant, V și temperatură constantă, T). Stabilizarea presiunii s-a realizat prin echilibrare sistemului timp de 500 ps folosind ansamblul termodinamic izoterm-izobar NPT (număr constant de atomi, N, presiune constantă, P și temperatură constantă, T). Presiunea a fost menținută constantă prin utilizarea barostatului Parinello-Rhaman [59]. După care au urmat simulările de dinamică moleculară propriu-zise.

Distanța *cutoff* pentru interacțiile van der Waals a fost de 14 Å. Calculul forțelor electrostatice îndepărtate a fost realizat prin metoda PME (particle-mesh Ewald) cu dimensiunile nodurilor de 1 Å. În timpul simulării lungimea legăturilor a fost constrânsă cu algoritmul LINCS (Linear Constraint Solver [60]).

Simulările de dinamică moleculară s-au desfășurat la temperatura de 300 K și lungimea traiectoriilor rezultate a fost de 5 ns pentru fiecare model molecular.

Analiza simulărilor s-a realizat cu programele GROMACS și VMD [61]. Reprezentările grafice au fost produse cu programul VMD.

4. ANALIZA SIMULĂRILOR DE DINAMICĂ MOLECULARĂ

Procedura de realizare a experimentelor de simulare a dinamicii moleculare poate fi divizată în trei etape generale: prima este pregărtirea configurației de pornire și crearea sistemului molecular pentru simulare, minimizarea energiei și echilibrarea, a doua este însăși rularea simulării și producerea traiectoriei, iar a treia este analiza traiectoriilor și interpretarea datelor obținute. Ultima etapă poate fi divizată în alte trei subetape:

- verificarea calității experimentelor de dinamică moleculară. În aceatsă etapă se verifică evoluția în timp a energiei potențiale, temperatura, presiunea şi densitatea sistemului cerecetat;
- realizarea analizelor menite să răspundă la întrebările ştiințifice propuse pentru realizarea simulării;
- analiza comparativă a rezultatelor obținute din mai multe simulări pentru evaluarea complexă a problemei cercetate.

4.1. Evaluarea stabilității lactoferinei în diferite conformații

Experimentele de simulare a dinamicii moleculare au fost realizate în scopul evaluării stabilității moleculei proteice de lactoferină în patru conformații: apolactoferina deschisă, apolactoferina închisă, apolactoferina în conformația închisă + $2CO_3^{2-}$ și hololactoferina. În continuare ne vom referi la aceste sistem ca S1, S2, S3, S4, după cum este indicat în Tabelul 6. Analiza comparativă a comportamentului proteinelor la nivel unimolecular a fost realizată cu ajutorul pachetelor de programe GROMACS, XmGrace și VMD. Traiectoria sistemelor pe parcursul etapei de simulare de dinamică moleculară a fost analizată prin intermediul evoluției devierii medii pătratice (RMSD) pentru atomii C α (Figura 8).



Figura 8. Evoluția devierii medii pătratice ale atomilor Cα din structura lactoferini de-a lungul simulării de dinamică moleculară ale celor patru sisteme.

Analiza RMSD este aplicată în determinarea tranzițiilor structurale ale secvențelor proteice dea lungul simulărilor simulărilor de dinamică moleculară. Curbele RMSD-ului calculate pentru molecula proteică în toate patru sisteme au prezentat diferențieri. Analizând graficul prezentat în Figura 8 se poate observa că valorile RMSD cresc brusc în primele 100 ps ale simulării în toate patru sisteme cercetate, atingând valor de 1.5-2.0 Å. De-a lungul întregii simulări valorile RMSD prezintă fluctuații cu valori maxime cuprinse între 2.5-3.8 Å. Reieșind din graficul din Figura 8 sistemul S3 prezintă cele mai mici fluctuații indicând asupra faptului ca această conformație este și cea mai stabilă dintre cele patru cercetate. Interesant este faptul că S1 și S2 diferă în evoluția RMSD-ului de-a lungul simulării, apolactoferina în forma deschisă fluctuează mai mult decât apolactoferina în forma închisă. O imagine mai detaliată despre comportamentul moleculelor de lactoferină în sistemele studiate poate fi obținută prin intermediul analizei evoluției fluctuațiilor medii pătratice (RMSF) ale atomilor C α (Figura 9).



Figura 9. Evoluția fluctuațiilor medii pătratice ale atomilor Cα din structura lactoferini de-a lungul simulării de dinamică moleculară ale celor patru sisteme.

Rezultatele obținute corespund observațiilor ce au reieșit din analiza evoluției RMSD. Sistemul S4 în care se conține hololactoferina (lactoferina saturată cu fier) suferă cele mai notabile fluctuații. Analiza ariei suprafeței accesibile solventului (SASA) oferă informație adițională asupra flexibilității structurale ale proteinei. Graficul SASA (Figura 10) oferă o informație diferită decât rezultatele RMSD și RMSF. S-a identificat că sistemul S2 (apolactoferina în conformația închisă) suferă cele mai mari fluctuații. Această observație sugerează ideea că apolactoferina în conformația închisă este cel mai puțin stabilă, astfel rearanjarea conformația locală este necesară pentru stabilizarea condiției moleculei.



Figura 10. Evoluția ariei suprafeței accesibile solventului calculate pentru traiectorii de 5 ns ale celor patru sisteme.

5. CONCLUZII

În această lucrare a fost studiată structura și mecanismul de interacție al lactoferinei cu ionii de Fe³⁺ prin aplicarea tehnicilor computaționale. Pentru realizarea acestui studiu s-au utilizat structuri din bazele de date pentru proteine (PDB) și pachete de programe de simulare și analiză: H++ server, PDB2PQR server, APBS, GROMACS, XmGrace, VMD.

În prezent sunt disponibile în băncile de date structuri moleculare ale lactoferinelor izolate din diferite specii. În acest context apare necesitatea de a studia gradul de similaritate ale structurilor și secvențelor proteice ale lactoferinelor. Metoda de aliniament multiplu al secvențelor fost aplicată pentru a studia gradul de similaritate dintre moleculele lactoferinei diferică umană, lactoferinei diferică de bivol, lactoferinei diferică bovină, lactoferinei diferică de cal și ale lactoferinei diferică de cămilă. Parametriii calculați din aliniamentul de structură arată că, în general structura lactoferinei este bine conservată printre speciiile investigate în acest studiu. În cazul lactoferinei de cămilă valoarea parametrul de omologie structurală este mai mică comparativ cu celelalte lactoferine, QH este 0.3869 și Identitatea Procentuală este 30.60%. Aliniamentul de secvență arată că lactoferina de cămilă diferă nu doar în compoziție chimică ci și din punct de vedere al aranjamentului aminoacizilor în molecula proteică (RMSD=12.6343).

Procesul de legare și eliberare a ionilor de fier de către molecula lactoferinei este precedat de modificări ale conformației moleculare. Datorită interacțiilor intermoleculare, tranziția proteinei de la forma deschisă la forma închisă duce la modificarea stării de protonare a reziduurilor din compoziția proteinei. Pentru cercetarea reacțiilor de protonarea-deprotonare a reziduurilor lactoferinei și identificarea aminoacizilor implicați direct în legarea și eliberarea ionilor de fier a fost aplicat modelul electrostatic continuu Poisson-Boltzmann pentru molecula de lactoferină în conformația deschisă și închisă în starea de protonare corespunzătoare unui pH fiziologic. Cercetarea valorilor pKa ale celor patru conformații ale lactoferinei confirmă faptul că legarea /eliberarea ionilor de fier este permisă doar pentru anumite stări de protonare ale aminoacizilor implicați în aceste procese. Starea de protonare a acestor aminoacizi este determinată de interacțiile electrostatice în care aceștia sunt implicați.

La pH fiziologic lactoferina este capabilă de a fixa ionii de fier rezulând în tranziția conformației de la forma deschisă la forma închisă. Scăderea pH-ului până la 5.0 declanşează deschiderea lobului N și eliberarea ionului de fier. La valori ale pH-ului mai mici de 3.5 lobul C eliberează ionul de fier. Toate aceste procese vor induce perturbații ale potențialului electrostatic de suprafață al moleculei proteice. Calculele potentialului electrostatic de suprafața au fost realizate cu pachetul de programe APBS. Analiza rezultatelor obținue indică asupra faptului că micșorarea pH-ului induce modificări ale electrostaticii de suprafață, crescând sarcia

pozitivă a proteinei. Extinderea regiunilor de sarcină pozitivă pe suprafața proteinei vor crea respingerea electrostatică între reziduurile proteinei inclusiv și a celor din centrii activi ai proteinei, provocând deschiderea lobului și eliberarea ionului de fier.

Experimentele de simulare a dinamicii moleculare au fost realizate în scopul evaluării stabilității moleculei proteice de lactoferină în patru conformații: apolactoferina deschisă, apolactoferina închisă, apolactoferina în conformatia închisă + $2CO_3^{2-}$ și hololactoferina. Variatia RMSD-ului în experimentele de simulare este cuprinsă între 1.0 Å și 3.8 Å. Reieșind din graficul prezentat în Figura 8 remarcăm faptul că cea mai stabilă este structura apolactoferinei în conformatia închisă cu ioni de CO_3^{2-} fixati în centrii activi ai proteinei. Rezultate similare oferă curbele RMSF (Figura 9). Din analiza RMSF s-a identificat că la pH fiziologic hololactofeina (lactoferina saturată cu fier) suferă cele mai notabile fluctuații ale reziduurilor din structura proteinei. Prezenta fierului în sistem crează perturbații de natură electrostatică rezultând în modificări ale pozitiilor reziduurilor de aminoacizi din structura proteinei de-a lungul simulărilor. Graficul SASA (Figura 10) oferă informații despre fluctuațiile ce au loc la suprafața proteinei. Rezultatele SASA oferă o informație diferită decât rezultatele RMSD și RMSF. S-a identificat că sistemul cu apolactoferina în conformația închisă suferă cele mai mari fluctuatii. Această observatie sugerează ideea că apolactoferina în conformația închisă este cel mai puțin stabilă, astfel rearanjarea conformațională locală este necesară pentru stabilizarea condiției moleculei.

6. **BIBLIOGRAFIE**

[1] B. Johanson, Isolation of an iron-containing red protein from human milk, Acta Chem. Scand. 1960, 14(2), 510-512.

[2] M.-H. Metz-Boutigue, J. Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, P. Jolles, Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins, Eur. J. Biochem. 1984, 145, 659-676.

[3] S. Iyer, B. Lonnerdal, Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism, Eur. J. Clin. Nutr. 1993, 47(4), 232-241.

[4] L. Adlerova, A. Bartoskova, M. Faldyna, Lactoferrin: a review. Vet. Med. Cech. 2008, 53(9), 457-468.

[5] C.A. Smith, B.F. Anderson, H.M. Baker, E.N. Baker, Metal substitution in transferrins: the crystal structure of human copper-lactoferrin at 2.1 - Å resolution, Biochemistry 1992, 31, 4527-4533.

[6] H.M. Baker, E.N. Baker, Lactoferrin and Iron: structural and dynamic aspects of binding and release, BioMetals 2004, 17, 209-216.

[7] C. Guillen, I. B. McInnes, H. Kruger, J. Brock, Iron, lactoferrin and iron regulatory protein activity in the synovium; relative importance of iron loading and the inflammatory response, Ann. Rheum. Dis.1998, 57, 309-314.

[8] M. Spadaro, C. Caorsi, P. Ceruti, A. Varadhachary, G. Forni, F. Pericle, M. Giovarelli, Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells, FASEB J. 2008, 28, 2747-2757

[9] M. Iigo, D. Alexander, N. Long, J. Xu, K. Fukamachi, M. Futakuchi, M. Takase, H. Tsudai, Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine, Biochemie. 2009, 91, 86-101

[10] L. Tang, J. Wu, Q. Ma, F. Andreopolus, J. Gil, J. Valdes, S. Davis, J. Li, Human lactoferrin stimulates skin keratinocyte function and wound re-epithelialization, Brit. J. Dermatol. 2010, 163, 38-47.

[11] Sun, X.L.; Baker, H.M.; Shewry, S.C.; Jameson, G.B.; Baker, E.N. Structure of recombinant human lactoferrin expressed in Aspergillus awamori. Acta Crystallographica, Section D, 1999, 55, 403-407.

[12] Karthikeyan, S.; Yadav, S.; Paramasivam, M.; Srinivasan, A.; Singh, T.P. Structure of buffalo lactoferrin at 3.3 A resolution at 277 K. Acta Crystallographica, Section D, 2000, 56, 684-689.

[13] Moore, S.A.; Anderson, B.F.; Groom, C.R.; Haridas, M.; Baker, E.N. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. Journal of Molecular Biology, 1997, 274, 222-236.

[14] Kumar, P.; Khan, J.A.; Yadav, S.; Singh, T.P. Crystal structure of equine apolactoferrin at 303 K providing further evidence of closed conformations of N and C lobes. Acta Crystallographica, Section D 2002, 58, 225-232.

[15] Khan, J.A.; Kumar, P.; Srinivasan, A.; Singh, T.P. Protein intermediate trapped by the simultaneous crystallization process. Crystal structure of an iron-saturated intermediate in the Fe³⁺ binding pathway of camel lactoferrin at 2.7 Å resolution. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276, 36817-36823.

[16] F.C. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J. Williams, Meyer E.F., M.D. Brice, J.R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. Tasumi. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. Journal of Molecular Biology 1997, 112, 535.

[17] Roberts, E.; Eargle, J.; Wright, D.; Luthey-Schulten, Z. MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis, BMC Bioinformatics, 2006, 7, 382, 1-11.

[18] Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22), 4673-4680.

[19] Russell, R.B.; Barton, G.J. Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. Proteins, 1992, 14(2), 09-323.

[20] Gordon, J.C.; Myers, J.B.; Folta, T.; Shoja, V.; Heath, L.S.; Onufriev, A. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules, Nucleic Acids Research, 2005 1(33), W368-W371.

[21] Myers, J.; Grothaus, G.; Narayanan, S.; Onufriev, A. A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pKs in macromolecules, Proteins 2006, 63, 928-938.

[22] Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A.V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulation, Nucleic Acids Research, 2012, 40(W1), W537-W541.

[23] Bashford, D.; Karplus, M. pKa of Ionizable Groups in Proteins: Atomic Detail from a Continuum Electrostatic Model. Biochemistry, 1990, 29, pp. 10219-10225.

[24] Georgescu, R.; Alexov, E.; Gunner, M. Combining Conformational Flexibility and Continuum Electrostatics for Calculating pKas in Proteins. Biophysical Journal, 2002, 83, 1731–1748.

[25] Baker, N.A.; Bashford, D.; Case, D.A. Implicit solvent electrostatics in biomolecular simulation. In: Leimkuhler, B.; Chipot, C.; Elber, R.; Laaksonen, A.; Mark, A.; Schlick, T.;

Schutte, C.; Skeel, R. (eds), New Algorithms for Macromolecular Simulation, Vol. 49. Springer Berlin/Heidelberg, 2006, Chapter 15, 263–295.

[26] Ponder, J.W.; Case, D.A. Force fields for protein simulations. Advances in Protein Chemistry, 2003, 66, 27-85.

[27] Farnaud, S.; Evans, R.W. Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. Molecular Immunology, 2003, 40,b395-405.

[28] Moguilevsky, N.; Retegui, L.A.; Masson, P.L. Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Biochemical Journal, 1985, 229, 353-359.

[29] N. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. Holst, and J. McCammon, Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, 10037-10041.

[30] M.W. van der Kamp, K.E. Shaw, C.J. Woods, A.J. Mulholland, Biomolecular simulation and modelling: status, progress and prospects. Journal of the Royal Society Interface 2008, 5, S173-S190, 2008.

[31] T. Hansson, C. Oostenbrink, W.F. van Gunsteren, Molecular dynamics simulations. Current Opinion in Structural Biology 2002, 12, 190-196.

[32] M. Karplus, J.A. McCammon, Molecular dynamics simulations of biomolecules. Nature Structural Biology 2002, 9(9), 646-652.

[33] W.J. Hehre, A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations, Wavefunction, Inc., Irvine, CA, 2003.

[34] T. Schlick, Molecular modeling and simulation. An interdisciplinary guide, Springer Science+Business Media, LLC, 2010.

[35] R. Car and M. Parinello. Unified approach for molecular dynamics and density-functional theory. Physical Review Letters 1985, 55(22), 2471-2474.

[36] T. van Mourik. First-principles quantum chemistry in the life sciences. Philosophical Transactions of The Royal Society A 2004, 362, 2653-2670.

[37] K.I. Ramachandran, G. Deepa, and K. Namboori. Computational chemistry and molecular modeling. Principles and applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

[38] K.I. Ramachandran, G. Deepa, and K. Namboori. Computational chemistry and molecular modeling. Principles and applications. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2008.

[39] P. Atkins and R. Friedman. Molecular quantum mechanics. Oxford University Press, 2005.

[40] M. Born, J.R. Oppenheimer. Zur quantentheorie der molekeln. Annalen der Physik (Leipzig) 1927, 84, 457-484.

[41] S.A. Adcock, J.A. McCammon. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. Chemical Reviews 2006, 106(5), 1589-1615.

[42] W.F. van Gunsteren and A.E. Mark. On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics. European Journal of Biochemistry 1992, 204, 947-961.

[43] J. Meller. Molecular dynamics. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.

[44] C.L. III Brooks. Molecular simulations of proteins, structure, dynamics and thermodynamics. Computer Modelling of Fluids Polymers and Solids1990, 289-334.

[45] H. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation, Comput. Phys. Commun. 1995, 91, 43-56.

[46] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis, J. Mol. Model. 2001, 7, 306-317.

[47] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. Mark, H. Berendsen, GROMACS:Fast, Flexible, and Free, J. Comput. Chem. 2005, 26, 1701-1718.

[48] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation, J. Chem. Theory Comput. 2008, 4, 435-447.

[49] S. Pronk, S. Pall, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. Shirts, J. Smith, P. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, Bioinformatics 2013, 29, 845-854.

[50] Norris, G.E.; Anderson, B.F.; Baker, E.N. Molecular replacement solution of the structure of apolactoferrin, a protein displaying large-scale conformational change. Acta Crystallographica, Section B, 47, 998-1004.

[51] Sun, X.L.; Baker, H.M.; Shewry, S.C.; Jameson, G.B.; Baker, E.N. Structure of recombinant human lactoferrin expressed in Aspergillus awamori. Acta Crystallographica, Section D, 1999, 55, 403-407.

[52] N. Guex and M. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling, Electrophoresis 1997, 18, 2714-2723.

[53] T. Dolinsky, J. Nielsen, J. McCammon, N. Baker, PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations, Nucleic. Acids. Res. 2004, 32, W665-W667.

[54] T. Dolinsky, P. Czodrowski, H. Li, J. Nielsen, J. Jensen, G. K. N. Baker, PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations, Nucleic. Acids. Res. 2007, 35, W522-W525.

[55] Jorgensen,W.L., Maxwell,D.S. and Tirado-Rives, J., Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids, Journal of American Chemical Society 1996, 118, pp 11225-11236.

[56] P. Mason, G. Neilson, C. Dempsey, J. Brady, Neutron Diffraction and Simulation Studies of CsNO₃ and Cs₂CO₃ Solutions, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 15136-15144.

[57] W. Lin, W. Welsh, and W. Harris, Molecular Mechanics Studies of Model Iron(III) Transferrin Complexes in Vacuo and in Aqueous Solution, Inorg. Chem. 1994, 33, 884-890.
[58] W. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, R. Impey, M. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys. 1983, 79, 926-935.

[59] M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, J. Appl. Phys. 1981, 52, 7182-7190.

[60] B. Hess, H. Bekker, H. Berendsen, and J. Fraaije, LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, J. Comp. Chem. 1997, 18, 1463-1472.

[61] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, VMD: Visual Molecular Dynamics, J. Molec. Graphics. 1996, 14, 33-38.