ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΠΟΡΟ ΤΟΥ ΙΟΝΤΙΚΟΥ ΔΙΑΥΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A/M2

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΠΟΡΟ ΤΟΥ ΙΟΝΤΙΚΟΥ ΔΙΑΥΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A/M2 (UDORN, WEYBRIDGE)

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (22 – 46), Μ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΕ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΠΡΟΣΑΡΑΞΗΣ

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ

Α.Μ.: 1102-5

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αντώνιος Κολοκούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αντώνιος Κολοκούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α.

Δρ. Ζωή Κούρνια, Ερευνήτρια Δ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Εμμανουήλ Μικρός, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Δευτέρα 12 Μαΐου 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη του ιού της γρίπης τύπου Α σχηματίζει ομοτετραμερή και η διαμεμβρανική της περιοχή (TM) σχηματίζει έναν ιοντικό δίαυλο κατιόντων οξωνίου που ενεργοποιείται από το όξινο pH στο ενδοσωματιδιακό κυστίδιο. Η ενεργοποίηση του διαύλου προκαλεί απευλευθέρωση του ιικού RNA οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό του και προκαλώντας παθογένεια.

Έχει δειχθεί ότι αμινοαδαμαντανικά παράγωγα (Aamt), όπως η αμανταδίνη (Am) και η ριμανταδίνη (Rim), μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναστολείς του διαύλου της M2 πρωτεΐνης του ιού της γρίπης τύπου A/M2TM, όμως η χρήση τους έχει διακοπεί εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους ανθρώπους. Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων που ξεπερνούν την ανθεκτικότητα της A/M2TM.

Δυο διαφορετικές αλληλουχίες της M2TM, η αλληλουχία άγριου τύπου (WT) ή αλληλουχία Udorn και η αλληλουχία Weybridge (V28I, L38F) συντέθηκαν με τη μέθοδο πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν. Παρασκευάσθηκαν δείγματα που περιέχουν τα τετραμερή της M2TM σε pH 8 και λιπιδικό περιβάλλον από διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη (DPC) και μετρήθηκαν οι σταθερές σύνδεσης της M2TM με αμανταδίνη, ριμανταδίνη και αμινοαδαμαντανικά παράγωγά τους με Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) και για τις δύο αλληλουχίες. Οι μετρήσεις επαληθεύουν τις γνωστές από τη βιβλιογραφία τιμές των σταθερών σύνδεσης της αμανταδίνης και ριμανταδίνης με την πρωτεΐνη A/M2.

Πραγματοποιήθηκαν ακόμη προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (MD) για τη δομή του συμπλόκου M2TM-Am σε αλκαλικό pH για την αλληλουχία Udorn (πειραματική δομή από τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών: 2KQT.pdb) και Weybridge (δεν υπάρχει διαθέσιμη πειραματική δομή). Οι δομές που ελήφθησαν μετά το πέρας της MD χρησιμοποιήθηκαν σε υπολογισμούς μοριακής προσάραξης. Οι πειραματικές σταθερές σύνδεσης που μετρήθηκαν έναντι των τετραμερών A/M2TM σε pH 8 με ITC χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση και τη

βελτίωση των αποτελεσμάτων των υπολογισμών. Οι υπολογισμοί μοριακής προσάραξης με τη συνάρτηση βαθμολογίας ChemScore για την αλληλουχία Udorn οδήγησαν σε συσχέτιση των ενεργειακών τιμών με τις πειραματικές σταθερές σύνδεσης ίση με R^2 = 0.50. Ωστόσο όλες οι άλλες συναρτήσεις βαθμολογίας απέτυχαν να δώσουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση και δεδομένης της εμπειρικής κατασκευής των συναρτήσεων αυτών δοκιμάστηκαν πιο εύρωστες υπολογιστικές μέθοδοι όπως υπολογισμοί διαταραχών ελεύθερης ενέργειας, που η θεμελίωσή τους βασίζεται σε αρχές στατιστικής μηχανικής.

Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν υπολογισμοί διαταραχών ελεύθερης ενέργειας σε συνδυασμό με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (FEP/MD) του συμπλόκου M2TM-Aamt σε λιπιδικό περιβάλλον 1,2-διπαλμιτοϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης (DPPC) για να δημιουργηθεί ένα πρωτόκολλο ικανό να προβλέπει τη σχετική ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης των αμινοαδαμαντανικών αναλόγων-προσδετών έναντι των τετραμερών A/M2TM. Η μέθοδος αυτή δίδει τη σχετική σταθερά πρόσδεσης στην πρωτεΐνη μεταξύ δύο κοντινών χημικών αναλόγων με ακρίβεια 1 kcal/mol. Η μέθοδος FEP/MD επιλέχθηκε γιατί από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό πως είναι απαραίτητο να αφεθούν ελεύθεροι όλοι οι βαθμοί ελευθερίας του συστήματος δηλαδή να υπάρχει πλήρης ευκινησία της πρωτεΐνης και της επιδιαλυτωμένης λιπιδικής μεμβράνης DPPC για τη σωστή πρόβλεψη σχετικών σταθερών σύνδεσης των αμινοαδαμαντανικών αναστολέων και πιθανώς για τη βελτιστοποίηση νέων αμινοαδαμαντανικών προσδετών. Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιήθηκαν εννέα αλχημικοί μετασχηματισμοί μεταξύ αμινοαδαμαντανικών προσδετών, των οποίων οι σταθερές πρόσδεσης μετρήθηκαν με ITC όπως αναφέρθηκε. Η συσχέτιση των εννέα αλχημικών μετασχηματισμών που πραγματοποιήθηκαν στην αλληλουχία Udorn μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και υπολογιστικών προβλέψεων ήταν R^2 = 0.85 ενώ η συσχέτιση μεταξύ των επτά αλχημικών μετασχηματισμών που πραγματοποιήθηκαν στην αλληλουχία της Weybridge ήταν R^2 = 0.53. Τα αποτελέσματα δείχνουν ιδιαίτερα ικανοποιητικά αν ληφθεί υπόψη το μεγάλο εύρος της περιοχής σύνδεσης που είναι πλήρως ενυδατωμένη, συγκριτικά με μελέτες άλλων πρωτεϊνών όπου η περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης είναι πιο εντοπισμένη και καλύτερα ορισμένη.

Τέλος, κατά το σχεδιασμό φαρμάκων για μεμβρανικές πρωτεΐνες πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το ενεργειακό κόστος αποδιαλύτωσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μειώνοντας το κόστος αποδιαλύτωσης διευκολύνεται η είσοδος των προσδετών στην κοιλότητα πρόσδεσης μέσα στη μεμβρανική πρωτεΐνη, οπότε μπορεί να εξασφαλιστεί καλύτερη συγγένεια σύνδεσης. Για παράδειγμα, η προσθήκη ενός $CHCH_3$ στο αδαμαντάνιο από την αμανταδίνη στη ριμανταδίνη μπορεί να ελαττώσει το κόστος αποδιαλύτωσης και να οδηγήσει σε καλύτερη συγγένεια σύνδεσης, όπως φαίνεται από τις πειραματικές σταθερές σύνδεσης τους και όπως επιβεβαιώθηκε από υπολογισμούς διαταραχών ελεύθερης ενέργειας. Από την άλλη, η αύξηση της λιποφιλίας μπορεί να ελαττώσει τις ενθαλπικές δεσμικές αλληλεπιδράσεις εντός του πόρου οδηγώντας στη μικρότερη συγγένεια των 2-αλκυλο-2-αδαμανταναμινών συγκριτικά με τη 2-αδαμανταναμίνη. Για την επίτευξη καλής σύνδεσης χρειάζεται ένας βέλτιστος συγκερασμός των δύο φαινομένων.

ABSTRACT

Influenza A/M2 protein forms a tetramer and its transmembrane domain (TM) comprises the pore of a proton channel activated by low pH in the viral endosome. The pore activation triggers releasing of the the viral RNA into the cell cytoplasma, which then leads to the viral proliferation and pathogenesis.

It has been shown that aminoadamantane derivatives (Aamt), such as amantadine (Am) and rimantadine (Rim), have been reported to block the M2 membrane protein of influenza A virus A/M2TM, but their use has been discontinued due to reported resistance in humans. Understanding the mechanism of action of aminoadamantane derivatives could help the development of novel potent inhibitors which can overcome A/M2TM resistance.

Two different M2TM peptide sequences were synthesized through Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS), that is, Udorn (WT) and Weybridge (V28I, L38F), and they were then characterized. Different samples including aminoadamantane ligands and M2TM tetramers in dipalmytoylphosphatidylcholine (DPC) micelles at pH 8 have been prepared and used in affinity constant measurements with Isothermal Titration Calorimetry (ITC) for both sequences. The ITC measurements confirm the literature known binding constants of amantadine and rimantadine to A/M2 protein.

Molecular Dynamics (MD) simulations were performed for the complex M2TM-Am in high pH for Udorn (experimental structure from protein data bank: 2KQT.pdb) and Weybridge sequences (no available experimental structure). The obtained structures after the end of MD simulations were used to Molecular Docking calculations. The binding constants measured against A/M2TM tetramers at pH 8 through ITC were used to evaluate and optimize the calculations results. The energy scores of ChemScore function for Udorn sequence had a correlation of R^2 = 0.50 with experimental values. However, all the other scoring functions failed to give a good correlation with the experimental data. Due to the the empirical nature of these functions more sophisticated methods were used based on statistical mechanics, such as Free Energy Perturbation.

Thus, Free Energy Perturbation calculations coupled with Molecular Dynamics simulations (FEP/MD) were applied for the M2TM-Aamt complex embedded in a 1,2-dipalmytoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) lipid bilayer in order to establish a reliable protocol able to predict the relevant free energy of several Aamt derivatives inside the A/M2TM pore. FEP calculates the binding affinity to the protein between two similar chemical compounds with an accuracy of 1 kcal/mol. This method was used because it has been shown that the full protein flexibility in a hydrated DPPC lipid membrane is crucial for FEP/MD to be a successful methodology for predicting relative binding affinities of a series of aminoadamantane ligands bound inside the hydrated pore of A/M2TM and thus for a future optimization of new ligands. Nine and seven alchemical transformations were calculated for the Udorn and Weybridge sequences, which binding affinities were measured with ITC. The correlation between the experimental data and the calculated values was R^2 = 0.85 and 0.53 respectively. Thus, the results of the calculations are quite satisfactory considering that FEP/MD drug optimization is usually applied in other protein binding pockets, in which the binding site of the proton is better defined and diffused, in contract to the fully hydrated M2TM which represents a more challenging system.

Finally, the desolvation penalty should be considered for drug design purposes in membrane proteins. The results indicate that a reduced desolvation penalty can facilitate the entrance of the ligands into the binding site crevice increasing binding affinity. For example, the additional $CHCH_3$ attached to adamantane from amantadine to rimantadine can reduce the desolvation cost leading to the higher binding affinity of rimantadine relative to amantadine, as it has been shown by their experimental binding affinity constants and confirmed by the FEP calculations. However, increasing lipophilicity can also reduce enthaplic bonding interactions inside the pore resulting in the lower affinity of 2-alkyl-2-adamantanamines relative to 2-adamantanamine. A compromise between the two effects should be aimed.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του «Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης» με κατεύθυνση «Συνθετική Φαρμακευτική Χημεία» του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2011 – 2013, υπό τη γενική επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Α. Κολοκούρη.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Αντώνιο Κολοκούρη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο θέμα αυτό, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, τη μέριμνά του να καταρτιστώ περαιτέρω σε θέματα μοριακών προσομοιώσεων μέσα από την υποτροφία ΙΚΥΔΑ 2013, καθώς και την επιστημονική υποστήριξή του κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην Ερευνήτρια Δ’ του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Δρ. Ζωή Κούρνια, για τη συνεπίβλεψη στο τμήμα των Υπολογισμών, την καθοδήγηση και τις χρήσιμες υποδείξεις της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας και της συγγραφής αυτής, καθώς και για τη φιλοξενία στο χώρο του εργαστηρίου της.

Ευχαριστώ, επίσης, το μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου, Καθηγητή Εμμανουήλ Μικρό για τις χρήσιμες παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Για την εργασία αυτή, εκτός από τους επιβλέποντές μου, εργάστηκε μια ομάδα ανθρώπων που συνεισέφεραν σημαντικά στο αποτέλεσμα της εργασίας αυτής. Έτσι, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Παρασκευή Γκέκα από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για τη συνεχή της στήριξη σε κάθε εμπόδιο που συναντούσα, καθώς και για την εφαλτήριο δύναμη που μου άσκησε για την υλοποίηση αυτής της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ τους Δρ. Χρήστο Ζήκο, Δρ. Χρήστο Λιόλιο και Δρ. Ευαγγελία Λιβανίου, από το Ινστιτούτο «Ραδιοϊσοτόπων & Ραδιοδιαγνωστικών Παραγώγων» του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για την ανεκτίμητη βοήθειά τους στο κομμάτι της σύνθεσης των πεπτιδίων και για τη

φιλοξενία στο εργαστήριό τους. Οι μετρήσεις σταθερών σύνδεσης με «Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης» πραγματοποιήθηκαν από τους υποψήφιους Δρ. Felix Kolarov και Alexander Le Blanc, της ερευνητικής ομάδας του Καθηγητή Günter Gauglitz, του «Ινστιτούτου Φυσικοχημείας και Θεωρητικής Χημείας», του Πανεπιστημίου του Tübingen, τους οποίους και ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους συναδέλφους από το Τμήμα Φαρμακευτικής και από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, που είναι δίπλα μου σε κάθε δύσκολη στιγμή με πρόθεση να με βοηθήσουν, ιδιαίτερα τη Χριστίνα Τζιτζογλάκη, τον Στέλιο Ελευθεράτο και την Ευανθία Λιόντα. Επίσης, ευχαριστώ τους φίλους μου Βικτώρια και Ηλία για τη συμπαράσταση και την υπομονή τους.

Ευχαριστώ, επίσης, τη Φαρμακευτική Εταιρία *Chiesi Hellas* για τη χορηγία της προς το ερευνητικό εργαστήριό μας και την οικονομική ενίσχυση της έρευνας.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο «ευχαριστώ» στη μητέρα μου, η οποία με στηρίζει σε κάθε μου επιλογή.

Αθήνα, Απρίλιος 2014

Χαράλαμπος Ιωαννίδης

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ac_2O	οξικός ανυδρίτης
AcCN	ακετονιτρίλιο
Ala, A	αλανίνη
Am	αμανταδίνη
AMPS	αμινομεθυλοπολυστυρένιο
Arg, R	αργινίνη
Asn, N	ασπαραγίνη
Asp, D	ασπαρτικό οξύ
Boc	*tert*-βουτυλοξυκαρβόνυλο
Cl-HOBt	1-υδροξυ-6-χλωροβενζοτριαζόλιο
DCC	δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DHPC	διεπτανοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη
DIC	*N*,*N*-διισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο
DIEA	*N*,*N*-διισοπροπυλοαιθυλαμίνη
DMF	διμεθυλοφορμαμίδιο
DMPC	1,2-διμυριστοϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
DNA	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPC	διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη
DPPC	1,2-διπαλμιτοϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
DVB	διβινυλοβενζολιο
ESI	ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
Et_2O	διαιθυλαιθέρας
FEP	διαταραχή ελεύθερης ενέργειας
Fmoc	φλουορενυλομεθοξυκαρβόνυλο
Gly, G	γλυκίνη
Η/Υ	ηλεκτρονικός υπολογιστής

HA	αιματογλουτινίνη
His, H	ιστιδίνη
HOAt	1-υδροξυ-7-αζαβενζοτριαζόλιο
HOBt	1-υδροξυβενζοτριαζόλιο
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
Ile, I	ισολευκίνη
ITC	Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης
Leu, L	λευκίνη
NaCl	χλωριούχο νάτριο
NaH_2PO_4	δισόξινο φωσφορικό νάτριο
M2TM	διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2
MD	μοριακή δυναμική
MC	Monte Carlo
MM	Μοριακή Μηχανική
MS	Φασματομετρία Μαζών
NA	νευραμινιδάση
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
PBC	Περιοδικές Συνοριακές Συνθήκες
PDB	Τράπεζα Δεδομένων Πρωτεϊνών
PES	Επιφάνεια Δυναμικής Ενέργειας
Phe, F	φαινυλαλανίνη
PMF	Δυναμικό Μέσης Δύναμης
PME	πλέγμα σωματιδίων Ewald
Pro, P	προλίνη
QM	Κβαντική Μηχανική
Rim	ριμανταδίνη
RMSD	μέση τιμή του τετραγώνου της απόκλισης
RNA	ριβονουκλεϊκό οξύ
RNP	ριβονουκλεοπρωτεΐνη

RP-HPLC	Αντίστροφης Φάσης – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
Ser, S	σερίνη
SPPS	Πεπτιδική Σύνθεση Στερεάς Φάσης
ssNMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός στερεάς κατάστασης
TFA	τριφθοροξικό οξύ
Thr, T	θρεονίνη
TIPS	τριισοπροπυλοσιλάνιο
Trp, W	τρυπτοφάνη
UV	υπεριώδες
Val, V	βαλίνη
WT	άγριος τύπος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{ο} **1**

1.1 Εισαγωγή 1

1.2 Ο ιός της influenza A 1

1.3 Η πρωτεΐνη M2 2

1.4 Μηχανισμός δράσης του ιού της γρίπης 3

1.5 Εμφάνιση ανθεκτικότητας στην αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη 4

1.6 Δομές του συμπλόκου αμανταδίνης ή ριμανταδίνης και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης A/M2 5

1.6.1 Διάκριση με βάση το pH 6

1.6.2 Μελέτες από την ερευνητική ομάδα του Cross 6

1.6.3 Το μοντέλο της ερευνητικής ομάδας του Chou 8

1.6.4 Μελέτη της ερευνητικής ομάδας του DeGrado 11

1.6.5 Πρόσφατες μελέτες της δομής της πρωτεΐνης M2TM σε σύμπλοκο με ssNMR 13

1.7 Μηχανισμός αγωγιμότητας πρωτονίων 15

1.7.1 Ο ρόλος των πολικών αμινοξέων στην αγωγιμότητα πρωτονίων από το δίαυλο A/M2TM 15

1.7.2. Μηχανισμός της αγωγιμότητας των πρωτονίων: Ο Ρόλος της H37, W41 και V27 16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο} **18**

2.1 Το πεπτίδιο A/M2TM σε αλκαλικό pH 18

2.2 Σκοπός της εργασίας 19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{ο} **21**

3.1 Εισαγωγή 21

3.2 Πεπτίδια 22

3.3 Στρατηγικές πεπτιδικής σύνθεσης 23

3.4 Μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση: Η τεχνική στερεάς φάσης κατά Merrifield 24

3.4.1 Το στερεό πολυμερές υπόστρωμα 27
3.4.2 Το μόριο συνδέτης (*linker*) 28
3.4.3 Αποπροστασία αμινοπροστατευτικής ομάδας 29
3.4.4 Ανάπτυξη του πεπτιδίου 30
3.4.5 Απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη 32
3.4.6 Καθαρισμός και ταυτοποίηση καθαρού προϊόντος 33
3.4.7 Διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην SPPS 34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{ο} 35

4.1 Εισαγωγή 35
4.2 Περιγραφή Φαινομένων Σύνδεσης μέσω Βασικών Θερμοδυναμικών Εξισώσεων 36
4.3 Μη Θερμιδομετρικός προσδιορισμός της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης 38
4.4 Σύνδεση προσδέτη στη Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης 39
4.4.1 Περιγραφή του πειράματος της ITC 40
4.4.2 Μαθηματικές σχέσεις που περιγράφουν τη Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης 41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο} 48

5.1 Εισαγωγή 48
5.2 Μηχανικό πρότυπο 49
5.3 Πεδίο δυνάμεων 53
5.4 Επιφάνεια Δυναμικής Ενέργειας 54
5.5 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας ή Βελτιστοποίηση Γεωμετρίας 56
5.6 Χώρος φάσης και τροχιά 58
5.7 Υπολογισμός απλών θερμοδυναμικών ιδιοτήτων 58
5.8 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής 61
5.8.1 Προετοιμασία και εκτέλεση προσομοίωσης μοριακής δυναμικής 64
5.9 Ρυθμίσεις κατά την προσομοίωση χημικών φαινομένων 67
5.9.1 Περιοδικές Συνοριακές Συνθήκες και Αποστάσεις Αποκοπής 67
5.10 Σύγκλιση προσομοίωσης με βάση τον υπολογισμό της τιμής RMSD 75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο **78**

6.1 Σκοπός της μοριακής προσάραξης 78
6.2 Αλγόριθμοι μοριακής προσάραξης 78
6.2.1 Αλγόριθμοι άκαμπτης προσάραξης (*rigid docking*) 79
6.2.2 Αλγόριθμοι ευπροσάρμοστης προσάραξης (*flexible docking*) 80
6.2.3 Συναρτήσεις βαθμολογίας 81
6.2.4 Συναρτήσεις πεδίου δυνάμεων και εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολογίας 82
6.2.4.1 Συναρτήσεις πεδίου δυνάμεων 84
6.2.4.2 Εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολογίας 86
6.2.4.3 Στατιστικές συναρτήσεις βαθμολογίας 89

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο **92**

7.1 Εισαγωγή 92
7.2 Μέθοδος Διαταραχών Ελεύθερης Ενέργειας 92
7.3 Μεταβλητή σύζευξης *λ* – Σταδιοποίηση υπολογισμού διαταραχών ελεύθερης ενέργειας 95
7.4 Κύκλοι Ελεύθερης Ενέργειας 97
7.5 Εφαρμογές Κύκλων Ελεύθερης Ενέργειας 100
7.6 Περιορισμοί, τεχνικά χαρακτηριστικά και αστοχίες των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας 101

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο **107**

Α. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ (*UDORN & WEYBRIDGE*) ΤΗΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM) 107
8.1 Αντιδραστήρια – διαλύτες 107
8.2 Καθαρισμός προϊόντων και έλεγχος καθαρότητας 107
8.3 Χαρακτηρισμός των προϊόντων 108
8.4 Γενική πορεία πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης 109
8.5 Σύνθεση του 25-πεπτιδίου Udorn (WT) 114
8.5.1 Απαιτούμενες ποσότητες 114
8.5.2 Αποκοπή του πεπτιδίου Udorn από τη ρητίνη 115
8.5.3 Καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίου 115

8.6 Σύνθεση του 25-πεπτιδίου Weybridge (WT) 117
8.6.1 Απαιτούμενες ποσότητες 118
8.6.2 Αποκοπή του πεπτιδίου Weybridge από τη ρητίνη 119
8.6.3 Καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίου 119
Β. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM) ΜΕ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ 122
8.7 Εισαγωγή 122
8.8 Περιγραφή του θερμιδόμετρου 122
8.9 Προετοιμασία πειράματος 124
8.10 Προσδιορισμός σταθερών σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών στην A/M2TM σε αλκαλικό pH με ITC 125
Γ. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΑΡΑΞΗΣ ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM) 128
8.11 Υπολογισμοί Μοριακής Προσάραξης 128
8.11.1 Η σημασία των μορίων νερού στους υπολογισμούς προσάραξης 128
8.11.2 Προετοιμασία πρωτεϊνών 129
8.11.3 Πρωτόκολλο Μοριακής Δυναμικής 131
8.11.4 Προετοιμασία και εκτέλεση υπολογισμών μοριακής προσάραξης 132
8.11.5 Παρουσίαση αποτελεσμάτων υπολογισμών μοριακής προσάραξης 133
Δ. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΙ ΜΕ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ (FEP/MD) ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΕΤΗ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM) 135
8.12 Υπολογισμοί FEP/MD 135
8.12.1 Υπολογισμοί FEP/MD για το σύμπλοκο προσδέτη – πρωτεΐνης (*bound*) και του προσδέτη σε διάλυμα (*unbound*) 135
8.12.2 Πρωτόκολλο για τις προσομοιώσεις FEP/MD σε σύμπλοκο και σε διάλυμα 137
8.12.3 Υπολογισμοί FEP/MD σε διάλυμα (*unbound*) και στο κενό (*vacuum*) 138
8.12.4 Προσέγγιση FEP πολλαπλών σταδίων (Multistage FEP) 138
8.12.5 Παρουσίαση αποτελεσμάτων 139
8.12.6 Συσχετίσεις σταθερών διάστασης που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ITC με τα αποτελέσματα των υπολογισμών FEP/MD 140

8.12.7 Ανάλυση των τροχιών 145
8.12.7.1 Απόσταση αδαμαντανικού σκελετού από V27 145
8.12.7.2 Αποτίμηση δεσμών υδρογόνου 147
8.12.7.3 Γωνία δεσμού C-N 148
8.12.8 Αποτελέσματα ελεύθερης ενέργειας επιδιαλύτωσης 148

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^{ο} 151

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α 166

Α1. Θεωρητική Διαμόρφωση – Μέθοδος μη-γραμμικής προσαρμογής 166
Α.2 Θερμοδιαγράμματα ITC μετρήσεων 167

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β 172

Β.1 Αποτελέσματα υπολογισμών μοριακής προσάραξης 172

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ 177

Γ.1 Θεωρητική Διαμόρφωση 177
Γ.2 Σύγκλιση FEP/MD (FEP/MD Convergence) 179

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο}

Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A

1.1 Εισαγωγή

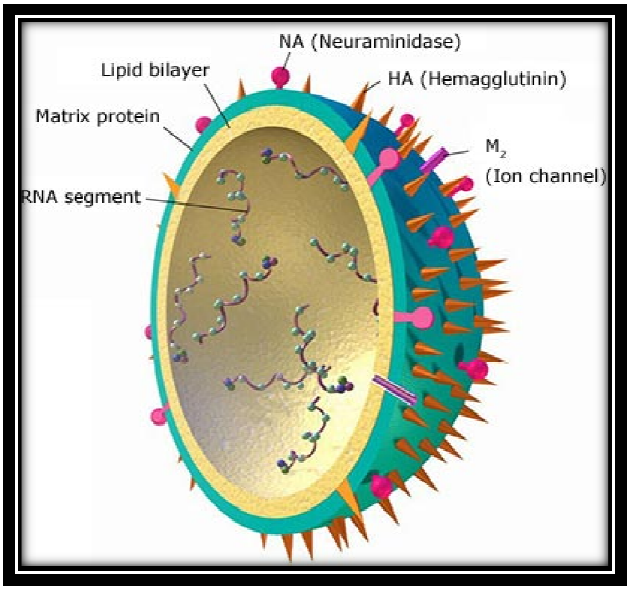
Η γρίπη (*influenza*) είναι ένα ιικής αιτιολογίας σύνδρομο του αναπνευστικού συστήματος, που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση βήχα, πυρετού, κεφαλαλγίας, μυαλγίας και φλεγμονής των βλεννογόνων του αναπνευστικού συστήματος. Εμφανίζεται κατά τους χειμερινούς μήνες και είναι ιδιαίτερα μεταδοτική προκαλώντας επιδημίες ή και πανδημίες.

Το πιο πρόσφατο παράδειγμα πανδημικής γρίπης παρουσιάστηκε το 2009 και οφείλεται στον ιό H1N1 ή αλλιώς στον ιό της γρίπης των χοίρων. Μάλιστα πρόκειται για τη δεύτερη ιστορικά πανδημική γρίπη που οφείλεται στον ιό H1N1, αφού η πρώτη – γνωστή και ως Ισπανική γρίπη – εμφανίστηκε το 1918 με περισσότερα από είκοσι εκατομμύρια θύματα.

1.2 Ο ιός της influenza A

Οι ιοί της influenza είναι μέλη της οικογένειας των ορθομυξοϊών και διαθέτουν φάκελο που περικλείει το πρωτεϊνικό τους καψίδιο. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι, οι A, B και C, αλλά μόνον οι δύο προσβάλλουν τον άνθρωπο.

Το βίριο του ιού της influenza A είναι σφαιρικού ή ελλειψοειδούς σχήματος με διάμετρο περίπου 90 nm. Οι πρώτοι δύο ιικοί τύποι A και B διαθέτουν τρεις πρωτεΐνες που διαπερνούν τον ιικό φάκελο, την αιμαγλουτινίνη (HA) και τη νευραμινιδάση (NA),[1] καθώς και τη μικρότερη σε μέγεθος πρωτεΐνη M2.[2] Το καψίδιο του πυρήνα του ιού αποτελείται από οκτώ διαφορετικά τμήματα μονής έλικας αρνητικού RNA, αντίγραφα νουκλεοπρωτεΐνης (NP) κι ένα σύμπλεγμα πολυμεράσης. Η πρωτεΐνη M1 σχηματίζει ένα φλοιό που αποτελεί τη βάση της λιπιδικής μεμβράνης του βιρίου. Η πρωτεΐνη M2 κωδικοποιείται από το έβδομο κομμάτι RNA μαζί με την πρωτεΐνη μήτρας M1. Η RNP και το λιπιδικό περίβλημα συνδέονται μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με την M1. Σχηματική αναπαράσταση του ιού φαίνεται στο σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1 Ιικό σωματίδιο της inluenza A. Στην εικόνα απεικονίζονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες του ιού: αιματογλουτινίνη (HA), νευραμινιδάση (NA), οι πρωτεΐνες μήτρας M1 και M2, καθώς και τα κομμάτια ιικού RNA.

Όπως η γρίπη A, έτσι και η B και C περιέχουν ένα συγκρότημα τριών πρωτεϊνών – πολυμερασών και πολλά αντίγραφα νουκλεοπρωτεΐνης.[3] Ωστόσο σε αντίθεση με τη γρίπη τύπου A που έχει τρεις μεμβρανικές πρωτεΐνες, η γρίπη τύπου B έχει τέσσερις, ενώ η τύπου C έχει μόνο δύο.

1.3 Η πρωτεΐνη M2

Η πρωτεΐνη M2 είναι μια ομοτετραμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη 97 αμινοξέων. Σχηματίζει έναν εκλεκτικό δίαυλο πρωτονίων H^+ που παίζει σημαντικό ρόλο στη μολυσματικότητα του ιού, με την κατεύθυνση μεταφοράς των H^+ να είναι από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο.[4] Ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο του ξενιστή με ενδοκύτωση. Αμέσως μετά την οξίνιση του ενδοσώματος λαμβάνουν χώρα δύο διαδικασίες: η συγχώνευση της ιικής μεμβράνης και το άνοιγμα του διαύλου της M2, με συνέπεια την εισροή πρωτονίων στο εσωτερικό του ιού.

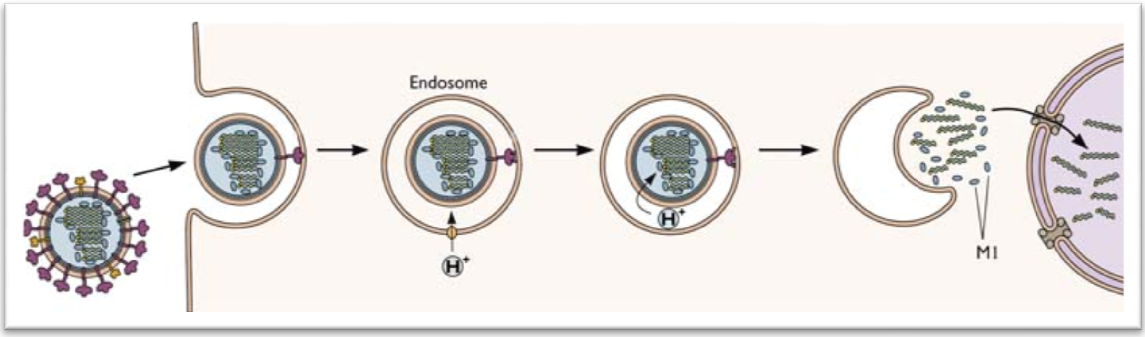
Η M2 αποτελείται από την εξωκυττάρια περιοχή 23 αμινοξέων (N-τελικό άκρο), τη διαμεμβρανική περιοχή 25 αμινοξέων (Transmembrane, TM) και την ενδοκυττάρια περιοχή 49

αμινοξέων (C-τελικό άκρο). Η διαμεμβρανική περιοχή σχηματίζει έναν ομοτετραμερή πόρο, που δρα ως δίαυλος πρωτονίων και κάθε μονομερές έχει δομή αριστερόστροφης α-έλικας. Πειραματικές και υπολογιστικές μελέτες έχουν αποδώσει την ενεργοποίηση του διαύλου στα αμινοξέα H37 (*ιστιδίνη*) και της W41 (*τρυπτοφάνη*) της διαμεμβρανικής περιοχής.[5,6]

Η κυτταροπλασματική περιοχή της M2 παίζει κρίσιμο ρόλο στη συναρμολόγηση του ιού. Με αφαίρεση ή μετάλλαξη της κυτταροπλασματικής περιοχής προκαλείται ελαττωματική εκκόλαψη του ιού που μπορεί να οφείλεται στη διακοπή αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης A/M2 με την A/M1.[7]

1.4 Μηχανισμός δράσης του ιού της γρίπης

Μόλις το βίριο ενωθεί με το σιαλικό οξύ, που βρίσκεται στην επιφάνεια των υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων της αναπνευστικής οδού του ξενιστή, το σύμπλεγμα ιού – υποδοχέα εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων με ενδοκύτωση, μια διαδικασία μέσω της οποίας τα κύτταρα προσλαμβάνουν μόρια από το εξωκυττάριο υγρό. Καθώς τα ενδοσωματικά κυστίδια, που περιέχουν τα ιικά σωματίδια, μετακινούνται προς τον πυρήνα, το pH τους μειώνεται.[8] Όταν το pH του ενδοσώματος φτάσει το 5.0, η HA υπόκειται σε μια διαμορφωτική αναδιάταξη. Έτσι, με την οξίνιση του ενδοσωματίου λαμβάνουν χώρα δύο διαδικασίες, η σύντηξη της ιικής μεμβράνης και το άνοιγμα του διαύλου πρωτονίων της M2, το οποίο συνεπάγεται την εισροή πρωτονίων στο εσωτερικό του ιού. Η οξίνιση προκαλεί εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης M1 και του συμπλόκου RNP. Όταν αυτό συμβεί, τα ιικά μόρια RNA απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή.[9] Στη συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου και πολλαπλασιάζονται (σχήμα 1.2).[10]

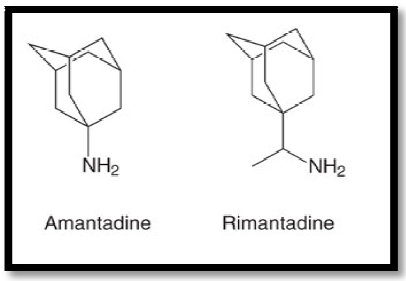


Σχήμα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του ιού της influenza A.

1.5 Εμφάνιση ανθεκτικότητας στην αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη

Οι δύο καθιερωμένες θεραπείες ενάντια στις μολύνσεις από τον ιό της γρίπης Α (σχήμα 1.3) βασίζονταν στην αμανταδίνη (Am, υδροχλωρικό άλας του 1-αμινο-αδαμαντανίου) και τη ριμανταδίνη (Rim, υδροχλωρικό άλας της α-μεθυλο-1-αδαμαντανομεθαναμίνης).[8] Ανάμεσα στις δύο αυτές ενώσεις, η ριμανταδίνη ήταν περισσότερο αποτελεσματική και με λιγότερες παρενέργειες.

Σε πειράματα που έγιναν σε διάφορους ιούς (A/Singapore H2N2, Rostock, Weybridge)[8] άγριου τύπου (*wildtype*, WT) δείχθηκε ότι οι συγκεκριμένες ιδιότητες αναστολής των ιών από την αμανταδίνη σχετίζονταν στενά με τη δομή του μορίου. Προτάθηκε ότι ο συνδυασμός μιας αμινομάδας με έναν υδρογονανθρακικό δακτύλιο μεγαλύτερο των πέντε ανθράκων προκαλεί αναστολή του ιού της influenza A. Οι διαφορές στην αναστολή μεταξύ διαφορετικών στελεχών γρίπης Α (π.χ. Rockstock, Weybridge) υποδεικνύουν ότι η βέλτιστη συγκέντρωση της αμανταδίνης εξαρτάται επίσης και από άλλα χαρακτηριστικά του εκάστοτε ιού.



Σχήμα 1.3 Τα μόρια αμανταδίνη και ριμανταδίνη είναι τα πρώτα αντιικά φάρμακα στα οποία ο ιός της γρίπης τύπου Α έχει εμφανίσει ανθεκτικότητα.

Στην ίδια μελέτη, πειράματα που έγιναν σε μεταλλαγμένους ιούς, όπως στον BEL^{R}, με παρόμοιες συγκεντρώσεις αμανταδίνης, έδειξαν ότι η αμανταδίνη δεν προκάλεσε αναστολή του ιού. Προκειμένου να αιτιολογηθεί η ανθεκτικότητα στην αμανταδίνη, απομονώθηκαν τρεις τύποι ιών που γίνονταν ανθεκτικοί σε αυτή μετά από δύο περάσματα αμανταδίνης στον αρχικό ιό. Από ανάλυση της αλληλουχίας τους φάνηκε να περιέχουν μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη M2 και συγκεκριμένα στις θέσεις V27 (*βαλίνη*), A30 (*αλανίνη*), S31 (*σερίνη*) και G34 (*γλυκίνη*). Η μετάλλαξη S31N που παρατηρήθηκε από τα πειράματα αυτά υπάρχει στον ανθεκτικό BEL^{R}. Από τα πειράματα αυτά φάνηκε ότι η πρωτεΐνη M2 ήταν στόχος δράσης της αμανταδίνης, ενώ οι μεταλλάξεις που προκαλούνται όριζαν τη θέση σύνδεσής της.[8]

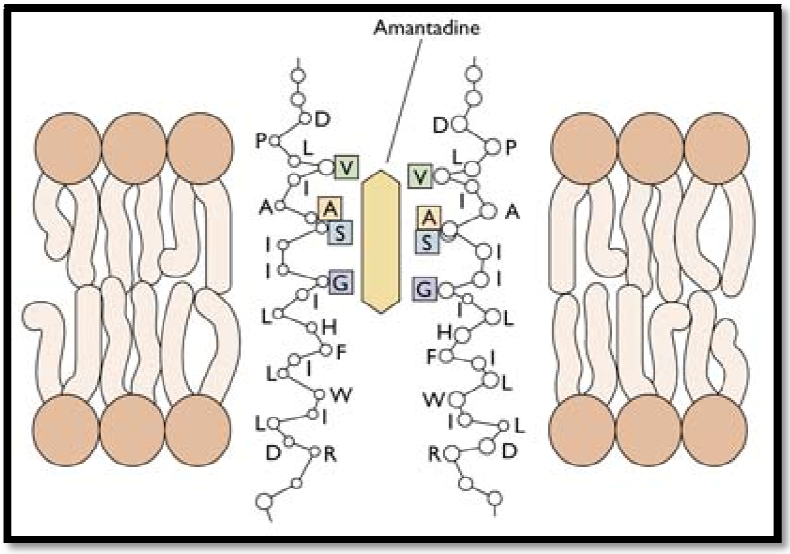
Όλες οι υποκαταστάσεις αυτές παρατηρούνται στην περιοχή των 19 αμινοξέων (25 – 43), της λεγόμενης διαμεμβρανικής περιοχής. Η θέση και η φύση των υποκαταστάσεων μπορούν να δώσουν στοιχεία για το μηχανισμό δράσης του ιού. Οι πιο συχνές παρατηρούμενες μεταλλάξεις είναι οι V27A, A30T, S31N, V27G ή V27D, A30P.

Η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του ιού στα φάρμακα αμανταδίνη και ριμανταδίνη, δημιούργησε νέα επιτακτική ανάγκη ανακάλυψης νέων φαρμάκων.

1.6 Δομές του συμπλόκου αμανταδίνης ή ριμανταδίνης και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης A/M2

Η έρευνα γύρω από την πρωτεΐνη M2 και τον πρωτεϊνικό δίαυλο της TM προήλθε από την προσπάθεια εξήγησης του τρόπου αναστολής της πρωτεΐνης A/M2 από τα αντιικά φάρμακα αμανταδίνη και ριμανταδίνη (σχήμα 1.3).

Το 1993, με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής από την ερευνητική ομάδα του Sansom,[11] προτάθηκε ότι μια πιθανή θέση σύνδεσης της αμανταδίνης βρίσκεται στο εσωτερικό του ιοντικού πόρου στην περιοχή που ορίζουν τα αμινοξέα V27, A30, S31 και G34 (σχήμα 1.4). Όμως, παρόλο που μέχρι το 2008 είχαν προταθεί μοντέλα του συμπλόκου M2TM-Am με μεταλλαξογένεση, προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (MD) και φασματοσκοπικές μελέτες ssNMR, δεν ήταν διαθέσιμες κρυσταλλογραφικές δομές υψηλής ανάλυσης ή δομές NMR. Στη συνέχεια παρατίθενται οι δομές του συμπλόκου M2TM-Am ή M2TM-Rim, όπως προέκυψαν πειραματικά.



Σχήμα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση της αμανταδίνης (κίτρινο) ως αποκλειστής του διαύλου της A/M2TM, με περιοχή σύνδεσης τα αμινοξέα V27, A30, S31 και G34. Στο σχήμα διακρίνεται η λιπιδική μεμβράνη και το διαμεμβρανικό τμήμα (TM) της πρωτεΐνης M2.

1.6.1 Διάκριση με βάση το pH

Η πρωτεΐνη A/M2 ως δίαυλος πρωτονίων μπορεί να βρεθεί σε δύο καταστάσεις ανάλογα με το pH. Σε αλκαλικό περιβάλλον (pH > 7.5), η M2 βρίσκεται στην κλειστή κατάσταση και δεν επιτρέπει τη διέλευση πρωτονίων. Σε όξινο περιβάλλον (pH < 5) οι πλευρικές αλυσίδες των H37 του τετραμερούς πρωτονιώνονται και λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης των θετικά φορτισμένων ιμιδαζολίων η M2 βρίσκεται σε ανοικτή κατάσταση. Αντίστοιχα, με την ολόκληρη την πρωτεΐνη, το διαμεμβρανικό της τμήμα σχηματίζει μια τετραμερή δέσμη που προσδένει την αμανταδίνη[12,13] και λειτουργεί ως δίαυλος πρωτονίων.[14]

1.6.2 Μελέτες από την ερευνητική ομάδα του Cross

Η ερευνητική ομάδα του Cross έχει δημοσιεύσει μια σειρά μελετών που αφορούσαν στη μελέτη του πρωτεϊνικού διαύλου της M2TM με ssNMR.

Το 1997, μελέτησε τη διαμεμβρανική περιοχή της M2 του ιού της γρίπης τύπου A σε ενυδατωμένη λιπιδική μεμβράνη DPMC (1,2-διμυριστοϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη).[15] Οι χημικές μετατοπίσεις των επισημασμένων δειγμάτων με ^{15}N περιορίζουν το μοριακό πλαίσιο σε σχέση με το μαγνητικό πεδίο. Όταν οι περιορισμοί αυτοί εφαρμόζονται στο πεπτίδιο, αυτό

μοντελοποιείται ως μια ενιαία α-έλικα, η κλίση (*tilt*) της οποίας σε σύγκριση με εκείνης της διπλοστιβάδας προσδιορίστηκε σε (33 ± 3)^{o}. Επιπλέον ο προσανατολισμός γύρω από τον άξονα της έλικας προσδιορίστηκε με σφάλμα ± 30°. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το πακετάρισμα της τετραμερούς πρωτεΐνης είναι μια αριστερόστροφη δέσμη τεσσάρων ελίκων. Μόνο με μια τόσο μεγάλη κλίση τα υδρόφιλα αμινοξέα ευθυγραμμίζονται στον άξονα του διαύλου.

Σε μια από τις μελέτες αυτές, το 2007,[12] χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ^{15}N διασταυρούμενης πόλωσης περιστροφικής κίνησης της μαγικής-γωνίας (CPMAS) NMR, συγκρίθηκε η αποτελεσματικότητα της διασταυρούμενης πόλωσης της H37 επισημασμένης με ^{15}N παρουσία και απουσία αμανταδίνης ως συνάρτηση του pH. Η δομή της M2TM σε αλκαλικό pH χωρίς την παρουσία αμανταδίνης φαίνεται να είναι περισσότερο δυναμική και δομικά ετερογενής σε σύγκριση με τη δομή όταν προσδένεται η αμανταδίνη. Φαίνεται ότι αυτή η δυναμική και η δομική πλαστικότητα της πρωτεΐνης είναι απαραίτητα για το άνοιγμα του διαύλου και για την αγωγιμότητα των πρωτονίων τόσο για την απομονωμένη δομή της TM περιοχής όσο και για ολόκληρη την πρωτεΐνη. Η παρουσία και η πρόσδεση της αμανταδίνης ελαττώνει την pK_{α} της H37 κατά τρεις τάξεις μεγέθους σε σύγκριση με την πρώτη pK_{α} της H37 απουσία της αμανταδίνης στον δίαυλο. Έτσι, η επίδραση της αμανταδίνης στις χημικές ιδιότητες της H37 αποτελούσε ένα νέο μηχανισμό αποκλεισμού της αγωγιμότητας πρωτονίων διαμέσου του διαύλου M2TM παρουσία της αμανταδίνης. Όχι μόνο μεταβάλλονται δραματικά οι τιμές των pK_{α} παρουσία της αμανταδίνης, αλλά επίσης δεν είναι δυνατός και ο σχηματισμός ενός χαμηλού φράγματος δεσμών υδρογόνου, προτείνοντας ότι ο μηχανισμός με τον οποίο η αμανταδίνη εμποδίζει την αγωγιμότητα πρωτονίων μπορεί να μην είναι εξαιτίας στερεοχημικής παρεμπόδισης, αλλά μέσω ενός μηχανισμού που εμποδίζει τη διευκόλυνση των ιστιδινών.

Τέλος, σε μια άλλη μελέτη[16] παρουσιάσθηκε η δομή της M2TM αποκλεισμένη από την αμανταδίνη, χρησιμοποιώντας περιορισμούς προσανατολισμού σε πειράματα ssNMR αναστροφής πόλωσης ανταλλαγής spin της μαγικής γωνίας. Τα δεδομένα έδειξαν μια συστροφή (*kink*) του μονομερούς μεταξύ των δύο θραυσμάτων (*fragment*) έχοντας κλίση (20 – 31)^{o} σε σύγκριση με την κανονική μεμβράνη. Η δομή αυτή χρησιμοποιήθηκε για την

κατασκευή ενός εύλογου μοντέλου του τετραμερούς M2TM-Am. Από τα φάσματα, παρατηρήθηκε, επίσης, επίδραση στην πρόσδεση της αμανταδίνης. Τέλος, παρουσιάσθηκαν φάσματα της μεταλλαγμένης S31N πρωτεΐνης που παρουσιάζει ανθεκτικότητα παρουσία και απουσία αμανταδίνης.

1.6.3 Το μοντέλο της ερευνητικής ομάδας του Chou

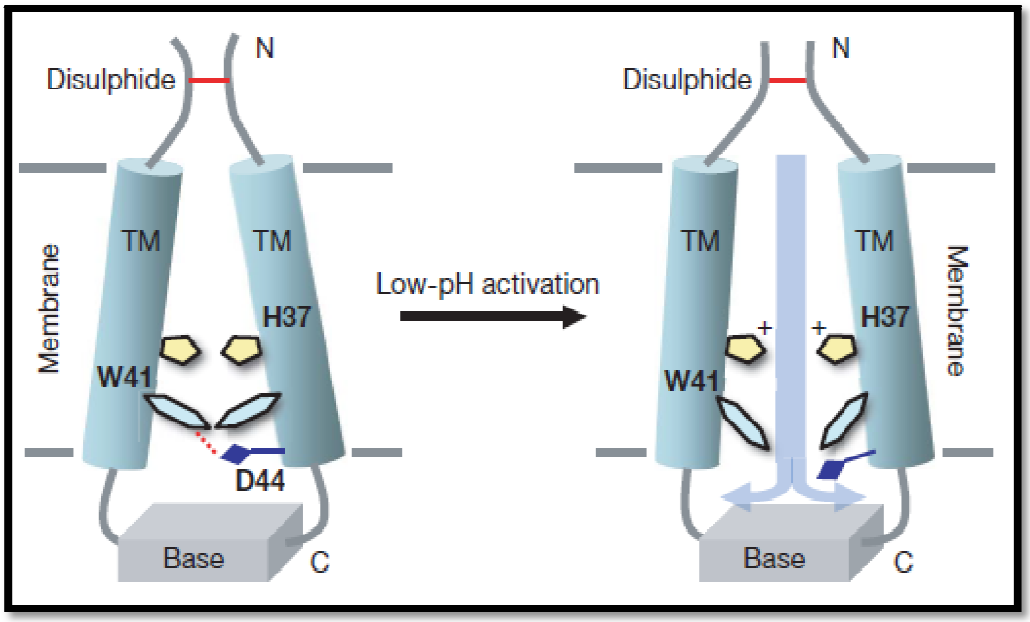
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η M2 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 97 αμινοξέων, η οποία σχηματίζει ομοτετραμερή ως φυσική της δομή. Οι τέσσερις διαμεμβρανικές έλικες σχηματίζουν ένα δίαυλο, στον οποίο οι H37 είναι ο ανιχνευτής pH και οι W41 οι πύλες.

Για 2-3 χρόνια υπήρξε μεγάλη φιλονικία για τη θέση σύνδεσης του αμινοαδαμαντανικού προσδέτη, δηλαδή εάν βρισκόταν εντός ή εκτός του πόρου. Η δομή του κλειστού διαύλου πρωτονίων A/M2 προσδιορίστηκε το 2008[17] με NMR σε διάλυμα που περιελάμβανε 50 mM φωσφορικού νατρίου, 6 M υδροχλωρικής γουανιδίνης και 150 mM DHPC (*διεπτανοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη*) και σε pH 7.5 ώστε τα ιμιδαζόλια των H37 του τετραμερούς να είναι ουδέτερα, οπότε το τετραμερές να βρίσκεται σε κλειστή κατάσταση, συμπλεγμένη με ριμανταδίνη. Η αλληλουχία της M2 που μελετήθηκε, ήταν λίγο μεγαλύτερη από ό,τι συνήθως, δηλαδή περιείχε τη TM (22 – 46) και 15 αμινοξέα του C-τελικού άκρου.

Η δομή του διαύλου της M2 αποκαλύπτει μια απλή, αλλά αποτελεσματική πύλη. Οι διαμεμβρανικές έλικες σχηματίζουν μια αριστερόστροφη δέσμη τεσσάρων ελίκων, που σχηματίζουν γωνία ~ 23° με τον κάθετο άξονα του επιπέδου της μεμβράνης (*tilt*). Οι α-έλικες συνιστούν έναν καλά σχηματισμένο δίαυλο. Ένας δακτύλιος μεθυλίων της V27 περιορίζει το N-τελικό άκρο του πόρου στα ~ 3.1 Å (εσωτερική διάμετρος). Σε συμφωνία με τα ήδη υπάρχοντα μοντέλα[18,19], οι H37 και οι W41 βρίσκονται εντός του πόρου. Οι ινδολικοί δακτύλιοι της W41 «συνωστίζονται» σε απόσταση van der Waals ο ένας από τον άλλο, απαγορεύοντας τη διέλευση νερού ή πρωτονίων. Επιπλέον, η αμινομάδα του ινδολίου της W41 της μιας υπομονάδας είναι σε απόσταση σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με την καρβοξυλομάδα (COO^{-}) του D44 της απέναντι υπομονάδας. Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της κλειστής πύλης της W41. Τέλος, οι πλευρικές αλυσίδες της R45 (*αργινίνη*) συμμετέχουν σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις με το D44. Χαμηλώνοντας το pH λαμβάνει

χώρα πρωτονίωση των H37, αποσταθεροποίηση του πακεταρίσματος «έλικα-έλικα» με ηλεκτροστατική άπωση. Αυτή η διαμορφωτική αναδιάταξη σπάει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της W41 και του D44 και επιτρέπει τη διάνοιξη της πύλης του διαύλου.

Το C-τελικό άκρο του πόρου εκτείνεται σε ένα μικρό βρόγχο (αμινοξέα 47 – 50) που συνδέει τη TM με την C-τελική αμφιπαθική έλικα. Οι αμφιπαθικές έλικες σχηματίζουν ένα ξεχωριστό τετραμερές με δεξιόστροφη κατεύθυνση ως βάση του διαύλου. Ο προσανατολισμός και ο αμφιπαθικός χαρακτήρας αυτών των ελίκων συνιστούν ότι η C-τελική βάση «αγγίζει» στην επιφάνεια της μεμβράνης.



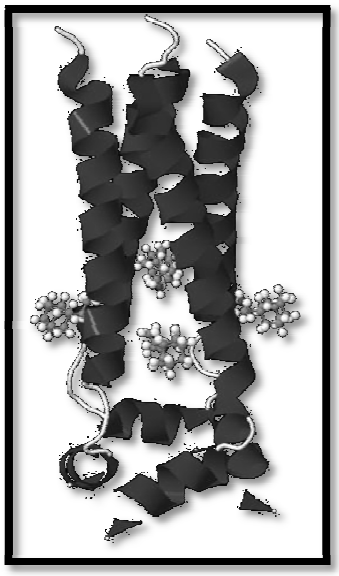
Σχήμα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης του διαύλου M2. Σε υψηλό pH, οι διαμεμβρανικές έλικες συγκρατούνται (packed) σφικτά και η πύλη τρυπτοφάνης είναι κλειστή εξαιτίας ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με το D44. Σε χαμηλό pH, η πρωτονίωση των ιμιδαζολίων της H37 αποσταθεροποιεί το πακετάρισμα των ελίκων, επιτρέποντας την ενυδάτωση του πόρου και την εισροή πρωτονίων. Για λόγους ευκρίνειας φαίνονται μόνο δύο από τις τέσσερις έλικες [Από την Παραπομπή N° 17].

Ένα ζευγάρι κυστεϊνών στο N-τελικό άκρο, που δεν εμφανίζουν μεταλλάξεις σε όλες τις αλληλουχίες, έχει δειχθεί ότι σχηματίζει ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς *in vivo.* Ως εκ τούτου, οι διαμεμβρανικές έλικες είναι «δεμένες» σε ένα μεγάλο μόριο από τους δισουλφιδικούς δεσμούς στο N-τελικό άκρο και από την αμφιπαθική δέσμη δεξιόστροφων

ελίκων στο C-τελικό άκρο. Έτσι διασφαλίζεται ότι η αποσταθεροποίηση της δέσμης των ελίκων που λαμβάνει χώρα κατά την ενεργοποίηση του διαύλου δεν προκαλεί τη διάσπαση του τετραμερούς (σχήμα 1.5).

Στη μελέτη αυτή της ερευνητικής ομάδας του Chou[17] η αμινομάδα της ριμανταδίνης φάνηκε να συνδέεται εκτός των της περιοχής του πόρου του διαύλου του τετραμερούς M2TM και να αλληλεπιδρά με την πλευρική αλυσίδα του D44 (σχήμα 1.6), πιθανώς και με της R45. Αυτό ήρθε αφενός σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες αιτιολόγησης της ανθεκτικότητας στα αντιικά φάρμακα λόγω μετάλλαξης των αμινοξέων εντός του διαύλου,[8] όπου αναμενόταν ότι τα φάρμακα προσδένονται εντός του πόρου, και αφετέρου με την κρυσταλλογραφική δομή της ερευνητικής ομάδας του DeGrado, που θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Έτσι, προτάθηκε πως τα υπάρχοντα αντιικά φάρμακα δε δρουν ως αποκλειστές διαύλου, αλλά δρουν σε αλλοστερική θέση στο D44 σταθεροποιώντας την κλειστή δομή της M2 και κάνοντας το δίαυλο πιο δύσκολο στο να βρεθεί στην ανοικτή του δομή. Προτάθηκε ότι οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που φέρουν μεταλλάξεις αποσταθεροποιούν την κλειστή κατάσταση του πόρου επιτρέποντας τη διάνοιξη του διαύλου.



Σχήμα 1.6 Αναπαράσταση με κορδέλες της M2TM δείχνοντας το αριστερόστροφο πακετάρισμα των ελίκων της διαμεμβρανικής περιοχής και το δεξιόστροφο πακετάρισμα των αμφιπαθών ελίκων και το φάρμακο ριμανταδίνη προσδεμένο σε αλλοστερική θέση κοντά στο D44 [Από την Παραπομπή N° 17].

1.6.4 Μελέτη της ερευνητικής ομάδας του DeGrado

Ταυτόχρονα με τη μελέτη της ομάδας του Chou[17], η ερευνητική ομάδα του DeGrado ήρθε να δώσει μια ακόμη δομή της περιοχής M2TM σε σύμπλοκο με την αμανταδίνη.[20] Στη μελέτη αυτή[20] μετρήθηκαν δύο κρύσταλλοι. Ο πρώτος κρύσταλλος μετρήθηκε με ανάλυση 2.0 Å και αφορούσε το πεπτίδιο της M2TM στο οποίο η I33 (*ισολευκίνη*) είχε μεταλλαχθεί σε σελενομεθειονίνη (I33SeM), σε pH 7.3, απουσία αμανταδίνης (σχήμα 1.7) (3BKD.pdb). Το πεπτίδιο κρυστάλλωσε με έξι μόρια οκτυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζίτη, που σχηματίζουν περιβάλλον ανάλογο της λιπιδικής μεμβράνη, στο οποίο τα τετραμερή της M2TM είναι ενσωματωμένα. Ο δεύτερος κρύσταλλος, με μικρότερη ανάλυση 3.5 Å, αφορούσε ένα πεπτίδιο που φέρει τη μετάλλαξη G34A και κρυσταλλώθηκε σε χαμηλότερο pH = 5.3, αυτή τη φορά παρουσία αμανταδίνης εντός του διαύλου (3C9J.pdb). Οι δομές αυτές είναι παρόμοιες και εμφανίζουν κάποιες διαφορές στη C-τελική περιοχή των ελίκων.

Τα τετραμερή της M2TM σχηματίζουν μια αριστερόστροφη δέσμη, που μοιάζουν με έναν κόλουρο κώνο, με το στενό αμινοτελικό άκρο να βλέπει το εξωτερικό του ιικού φακέλου. Κάθε έλικα αρχίζει από την πολική αλληλουχία που διατηρείται σε όλα τα στελέχη των ιών της influenza A, S-S-D, τέσσερα αντίγραφα της οποίας σχηματίζουν έναν στενό πόρο γεμάτο διαλύτη, στον οποίο ευθυγραμμίζονται τα υδροξύλια των σερινών και τα καρβονύλια της κύριας αλυσίδας, μέσω του οποίου περνούν τα πρωτόνια. Το ήμισυ του N-τελικού τετραμερούς του διαύλου έχει ακριβώς περιστροφική συμμετρία ως προς C4 άξονα, με τις έλικες να έχουν κλίση ~ $(35 \pm 2)^{o}$ ως προς τον z- άξονα του πόρου. Ο πόρος είναι πιο στενός στην περιοχή της V27, ενώ μετά το σημείο αυτό «ανοίγει» για να δημιουργήσει μια κοιλότητα μορίων νερού που περικλείεται από μικρά αμινοξέα (A30, S31 και G34), με διάμετρο 9 Å στην περιοχή της G34, κοντά στο κέντρο της μεμβράνης. Το κανάλι «κλείνει» ξανά στην εξαρτώμενη από το pH «πύλη» των αμινοξέων H37 και W41.

Σχήμα 1.7 Αναπαράσταση με κορδέλες της M2TM G34A, όπως προσδιορίστηκε σε σύμπλοκο με την αμανταδίνη από κρυσταλλογραφικές μελέτες της ερευνητικής ομάδας του DeGrado, σε ανάλυση 3.5 Å [Από την Παραπομπή N° 20].

Η πρωτεΐνη M2 αναστέλλεται παρουσία αμανταδίνης και ριμανταδίνης.[21] Στην πρωτεΐνη συνδέεται ένα μόριο φαρμάκου ανά τετραμερές, δηλαδή σε αναλογία 4:1.[22] Το φάρμακο περιβάλλεται από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων V27, A30, S31 και G34. Αυτά είναι τα αμινοξέα, που όπως έχει ήδη αναφερθεί, αλλάζουν στους μεταλλαγμένους ιούς που έχουν απομονωθεί και ήταν ανθεκτικοί στην αμανταδίνη.[8] Επιπλέον, οι μεταλλάξεις των αμινοξέων που δεν έχουν προκαλούν αναστολή της αμανταδίνης[6,18] βρίσκονται πιο απομακρυσμένες από την περιοχή πρόσδεσης, δηλαδή στην περιοχή του C-τελικού άκρου, όπου οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων βρίσκονται σε μεγαλύτερη επαφή με τη μεμβράνη (περιοχή L38 – D44).[6,18]

Η δομή (3C9J.pdb) είναι σε πλήρη συμφωνία με ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες ολόκληρης της πρωτεΐνης M2, που έχουν δείξει ότι η πρόσβαση του μορίου της αμανταδίνης εντός του πόρου είναι περίπου εκατό χιλιάδες φορές πιο αργή από ό,τι ήταν αναμενόμενο για τη διάχυση ενός μικρού μορίου σε ένα δίαυλο με τέτοιο εξωκυτταρικό άνοιγμα. Ο ισχυρά περιορισμένος προθάλαμος εξηγεί την αργή κινητική της εισόδου του φαρμάκου, που εισέρχεται στο κανάλι μέσω διαμορφωτικών αλλαγών ή πλευρικά από τη μεμβρανική φάση.[20]

Το σημείο πρόσδεσης του φαρμάκου βρίσκεται περίπου στην ίδια περιοχή και για τις δύο δομές (RMSD = 0.4 Å), κάτι που είναι σύμφωνο με την ανασταλτική ικανότητα της αμανταδίνης μεταξύ pH 5.0 και 8.0.[12,21,22] Σύμφωνα με την ανάλυση της δομής, δύο είναι οι πιθανοί προσανατολισμοί του φαρμάκου είτε η αμινομάδα να κατευθύνεται προς το εξωτερικό του ιού είτε εσωτερικά, όπου και δύναται να ενυδατωθεί από τον ενυδατωμένο πόρο. Στη μελέτη αυτή, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτρονικής πυκνότητας, η αμινομάδα φαίνεται να δείχνει προς το C-τελικό άκρο.

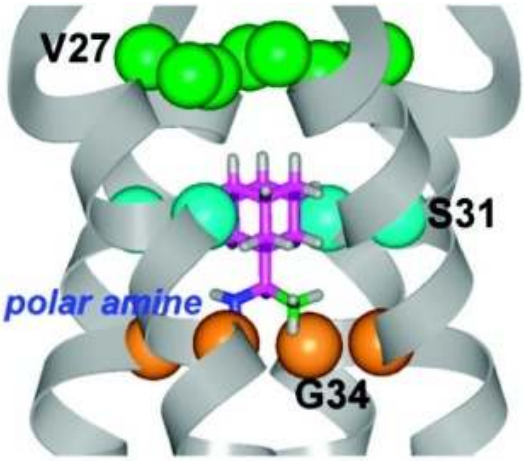
Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί ότι αυτό το μεγάλο άνοιγμα του διαύλου δεν είναι καθόλου συνεπές με το γεγονός ότι η δομή προσδιορίστηκε σε pH 7.3, η οποία αντιστοιχεί στην κλειστή διαμόρφωση. Μια πιθανή εξήγηση για το μεγάλο άνοιγμα κοντά στο C-τελικό άκρο είναι ότι το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε για αυτήν τη μελέτη δεν περιείχε τη C-τελική περιοχή (47 – 60), που είναι απαραίτητη για ένα σταθερό τετραμερές, μέσω του οποίου γίνεται η ροή πρωτονίων. Επίσης, το μη ρεαλιστικό πλάτος των TM ελίκων μπορεί να οφείλεται στον τρόπο πακεταρίσματος των κρυστάλλων ή και σε συνδυασμό και των δύο.

1.6.5 Πρόσφατες μελέτες της δομής της πρωτεΐνης M2TM σε σύμπλοκο με ssNMR

Παρά τις προηγούμενες μελέτες η απάντηση στο ερώτημα πού τελικά προσδένεται η αμανταδίνη δεν είχε ακόμη δοθεί. Έτσι, οι ερευνητικές ομάδες των Mei-Hong και DeGrado σε μια μελέτη με ssNMR κοντά σε ουδέτερο pH, μέτρησαν αποστάσεις μεταξύ υπερδευτεριωμένης αμανταδίνης και επισημασμένης με ^{13}C Ala του πεπτιδίου M2TM, και έδειξαν ότι υπάρχουν δύο περιοχές πρόσδεσης της αμανταδίνης στην ενσωματωμένη σε λιπιδικές μεμβράνες πρωτεΐνη M2.[23] Η μία από αυτές αφορούσε στην περιοχή υψηλής σύνδεσης, που καταλαμβάνεται από ένα μόνο μόριο αμανταδίνης, και βρίσκεται στην περιοχή του N-τελικού άκρου που περιβάλλεται από αμινοξέα που μεταλλάσονται σε ιούς ανθεκτικούς στην αμανταδίνη. Η δομή αυτή ήταν ανάλυσης 0.3 Å (2KQT.pdb). Η δεύτερη, περιοχή χαμηλής σύνδεσης παρατηρήθηκε στην επιφάνεια του C-τελικού άκρου, αλλά μόνον όταν το φάρμακο φτάνει τη μέγιστη συγκέντρωσή του στη διπλοστιβάδα. Ο προσανατολισμός και η δυναμική του φαρμάκου είναι διακριτά και στις δύο περιοχές, όπως φαίνεται από τις μελέτες ^{2}H NMR.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η αμανταδίνη φράσσει τον δίαυλο της M2, ανοίγοντας τον δρόμο για την ανάπτυξη νέων αντιικών φαρμάκων ενάντια στους ιούς της γρίπης.

Τέλος, δεν είχε ακόμη προσδιοριστεί ο ακριβής προσανατολισμός της αμινομάδας, δηλαδή αν αυτή δείχνει προς το N- ή το C- τελικό άκρο του διαύλου. Η διευκρίνιση της κατεύθυνσης της πολικής ομάδας θα δώσει φως στο μηχανισμό με τον οποίο η πρόσδεση του φαρμάκου αναστέλλει το δίαυλο πρωτονίων και θα διευκολύνει τον ορθολογικό σχεδιασμό νέων αναστολέων. Σε μελέτη των Mei-Hong και DeGrado[24] προσδιορίστηκε η κατεύθυνση της πολικής αμινομάδας χρησιμοποιώντας ανασυσταμένο M2TM σε λιπιδικές μεμβράνες, καθώς επίσης και σε μικκύλια DPC (δωδεκυλοφωσφοχολίνη). Πειράματα NMR διπλού συντονισμού ^{13}C – ^{2}H ορθολογικής ηχούς επισημασμένου με ^{13}C M2TM και μεθυλο-δευτεριωμένης (CD_3) ριμανταδίνης σε λιπιδικές μεμβράνες έδειξαν ότι η πολική αμινομάδα προσανατολίζεται προς το C-τελικό άκρο του διαύλου με το μεθύλιο να βρίσκεται κοντά στην περιοχή της G34. Πειράματα NMR σε διάλυμα M2TM σε μικκύλια DPC έδειξαν ότι η πρόσδεση του φαρμάκου προκαλεί αισθητή χημική διατάραξη της μετατόπισης της πρωτεΐνης που είναι παρόμοιες με εκείνες που έχουν βρεθεί για την M2TM και την M2 (18 – 60) προσδεμένης σε λιπιδικές μεμβράνες. Συγκεκριμένη επισήμανση των φαρμάκων με ^{2}H επέτρεψαν τον προσδιορισμό κορυφών διασταυρώσεων φαρμάκου – πρωτεΐνης, που δείχνουν ότι η αμανταδίνη και η ριμανταδίνη προσδένονται στον πόρο με τον ίδιο τρόπο όπως και για την M2TM. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν όχι μόνο ότι η αναστολή της M2TM από τα αδαμαντανικά παράγωγα επιτυγχάνεται μέσω ενός απ’ ευθείας φυσικού αποκλεισμού, αλλά και διαταράσσοντας τη σταθερά ισορροπίας του αισθητήρα πρωτονίων της H37.



Σχήμα 1.8 Αναπαράσταση του προσανατολισμού της πολικής αμινομάδας της CD_3-Rim προς το C-τελικό άκρο του πρωτεϊνικού διαύλου. Το μεθύλιο της ριμανταδίνης βρίσκεται κοντά στην περιοχή της G34 [Από την Παραπομπή N° 24].

1.7 Μηχανισμός αγωγιμότητας πρωτονίων

Τα πρωτόνια ξεχωρίζουν σε σχέση με άλλα ιόντα σε βιολογικά συστήματα διότι βρίσκονται σε δυναμική ανταλλαγή με το νερό, ρυθμιστικά διαλύματα (*buffer*), τιτλοδοτούμενες ομάδες λιπιδίων, πρωτεϊνών και άλλων κυτταρικών μορίων. Συνεπώς, η κίνηση πρωτονίων κατά μήκος λιπιδικών μεμβρανών συνήθως απαιτεί έναν ξεχωριστό μηχανισμό από εκείνους που έχουν υιοθετηθεί για άλλα ήδη ιοντικών διαύλων. Η κινητικότητα πρωτονίων σε υδατικά διαλύματα είναι περίπου πέντε φορές μεγαλύτερη από εκείνη μονοσθενών κατιόντων παρόμοιου μεγέθους με το ιόν οξωνίου.[25,26] Έχει προταθεί ότι τα πρωτόνια μπορούν να κινούνται στο νερό πηδώντας από το ένα μόριο νερού στο άλλο κατά μήκος δικτύων μορίων νερού. Κάθε δίκτυο μορίων νερού είναι μια αλυσίδα μορίων νερού που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Ο μηχανισμός σχηματισμού δικτύου νερού αναφέρεται συνήθως ως μοντέλο Grotthuss.[3]

1.7.1 Ο ρόλος των πολικών αμινοξέων στην αγωγιμότητα πρωτονίων από το δίαυλο A/M2TM

Εξαιτίας της πρωτονίωσης των ιμιδαζολίων της H37, όπως έχει ήδη αναφερθεί, προκαλείται το άνοιγμα του διαύλου μέσω ηλεκτροστατικής άπωσης. Προτείνεται ότι ο δίαυλος ανοίγει και η κατάσταση αγωγιμότητας πρωτονίων ενεργοποιείται μετά την

πρωτονίωση του τρίτου ιμιδαζολίου. Με την πρωτονίωση των H37 ο «δακτύλιος» που σχηματίζεται από τα ινδόλια της W41 διευρύνεται και τα ιόντα οξωνίου περνούν προς το C-τελικό άκρο. Θεωρείται ότι οι H37 συνιστούν τους αισθητήρες του διαύλου και η W41 την πύλη του. Τα ινδόλια της W41 σχηματίζουν ένα δακτύλιο ακτίνας 1.4 Å στην κλειστή κατάσταση του διαύλου σε βασικό pH που αποτρέπει τα μόρια νερού να εισέλθουν από το C-τελικό άκρο του πόρου M2TM και να έλθουν σε επαφή με τις H37. Η αλληλουχία HXXXW διατηρείται μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών M2 των τύπων influenza A, B.

Η A/M2 έχει και άλλα πολικά αμινοξέα κατά μήκος του πόρου του διαύλου. Αυτά τα αμινοξέα παίρνουν μέρος στην ενυδάτωση του διαύλου ως προϋπόθεση για τη μεταφορά των πρωτονίων. Μετάλλαξη αυτών των αμινοξέων με πιο υδρόφοβα οδηγεί σε χαμηλότερο ρυθμό ροής πρωτονίων.[27] Η A/M2 έχει τέσσερα αμινοξέα στο διαμεμβρανικό της τμήμα ικανά να συμβάλλουν στη μεταφορά πρωτονίων, τη S31, την H37, το D44 και την R45. Η μετάλλαξη S31A οδηγεί σε μέτρια ελάττωση του ρυθμού ροής των πρωτονίων. Ωστόσο, η μετάλλαξη D44A μειώνει δραστικά το ρυθμό ροής των πρωτονίων, αφού το D44 «διευκολύνει» την έξοδο των πρωτονίων.[28] Η δομή NMR του κλειστού διαύλου δείχνει ότι η περιοχή του C-τελικού άκρου μετά την περιοχή της W41 είναι πυκνά πακεταρισμένη με υδρόφοβες φαινυλαλανίνες, οι οποίες σφραγίζουν το δίαυλο σε εκείνη την περιοχή. Το D44 και η R45 είναι τα μόνα πολικά αμινοξέα στο υδρόφοβο αυτό κομμάτι του διαύλου. Συνεπώς, είναι πιθανό να βοηθούν την έξοδο των πρωτονίων δεχόμενα τα πρωτόνια ή τα οξώνια και να τα απελευθερώνουν στην υδρόφιλη περιοχή της μεμβράνης. Το D44 διατηρείται στους διάφορους μεταλλαγμένους ιούς σχεδόν πάντοτε, ενώ η R45 πάντοτε.

1.7.2. Μηχανισμός της αγωγιμότητας των πρωτονίων: Ο Ρόλος της H37, W41 και V27

Η ροή πρωτονίων της A/M2 οδηγείται από το δυναμικό πρωτονίων και γίνεται μόνο με κατεύθυνση από το N- προς το C-τελικό άκρο. Το N-τελικό άκρο «περιορίζεται» φυσικά με τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες της V27.[29] Όπως αναφέραμε και στην §1.7.1 τα πολικά αμινοξέα στο εσωτερικό του διαύλου διευκολύνουν την ενυδάτωσή του επιτρέποντας στα πρωτόνια να φτάσουν τις H37. Με την πρωτονίωση τα ιμιδαζόλια των ιστιδινών φορτίζονται θετικά και ο πόρος «ανοίγει» λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων.

Η ανοικτή κατάσταση του διαύλου φαίνεται να σταθεροποιείται μέσω ευνοϊκής αλληλεπίδρασης μεταξύ των κατιόντων ιμιδαζολίου της H37 και του π-νέφους ινδολίου της W41. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές π-κατιόντος αναγνωρίζονται από τις κύριες μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις που είναι σημαντικές για τη σταθεροποίηση της δομής των πρωτεϊνών και από ενεργειακής πλευράς είναι ισότιμες ή και ισχυρότερες από ένα συνήθη δεσμό υδρογόνου. Στην κλειστή κατάσταση του διαύλου τα ιμιδαζόλια των H37 είναι ουδέτερα και σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου φράζοντας τον πόρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο}

ΚΙΝΗΤΡΟ & ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

2.1 Το πεπτίδιο A/M2TM σε αλκαλικό pH

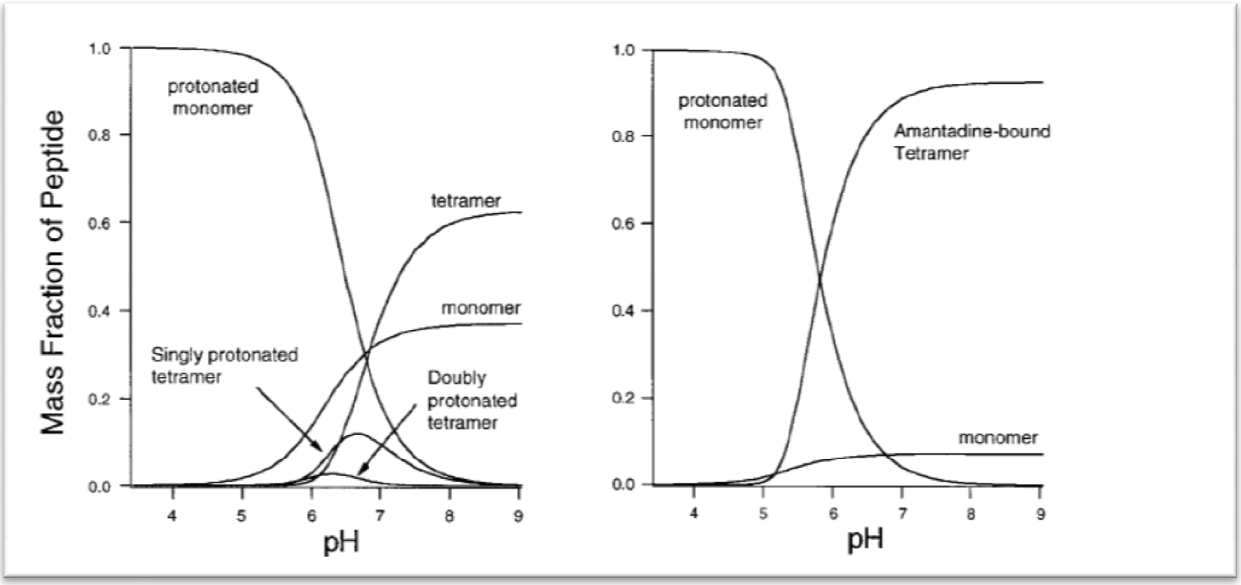
Το τετραμερές M2TM έχει χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά μέχρι στιγμής για την προσομοίωση των φαινομένων αγωγιμότητας οξωνίων της πλήρους πρωτεΐνης. Ακόμη περιγράφει τη θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ τετραμερούς μορφής και αμανταδίνης.[30] Το πεπτίδιο M2TM σχηματίζει τετραμερείς διαύλους πρωτονίων σε μικκύλια DPC σε pH = 7.5.[30–32] Από μελέτη του συστήματος με διάφορες αναλογίες M2TM/DPC απουσία ή παρουσία αμανταδίνης προέκυψε ότι υπάρχει ισορροπία μεταξύ τετραμερούς – μονομερούς εξαρτώμενη από το pH, τη σύνδεσή του με την αμανταδίνη και τον λόγο M2TM/DPC.[13]

Σε αναλογία M2TM:DPC ≤ 1:100 και σε pH 7.5, πάνω από το 90% του M2TM βρίσκεται σε τετραμερή μορφή. Καθώς ο λόγος μικραίνει, αυξάνεται η συγκέντρωση του τετραμερούς, ώστε για M2TM:DPC < 1:400 να θεωρείται ότι υπάρχει αποκλειστικά η τετραμερής μορφή. Η προσθήκη αμανταδίνης σταθεροποιεί την τετραμερή δομή μετατοπίζοντας την ισορροπία μονομερούς – τετραμερούς προς την τετραμερή δομή, ώστε σε αναλογία M2TM:DPC = 1:100 και συγκέντρωση αμανταδίνης 1 mM, το πεπτίδιο M2TM να βρίσκεται πλήρως σε τετραμερή δομή.

Σε χαμηλό pH επικρατεί η μονομερής μορφή, ενώ σε υψηλότερο pH, η ισορροπία μετατοπίζεται προς το τετραμερές (σχήμα 2.1). Παρουσία αμανταδίνης και με αναλογία Am:DPC = 1:10, το τετραμερές διατηρείται σταθερό και σε pH χαμηλότερο από 7.5, γεγονός που δείχνει ότι η αμανταδίνη σταθεροποιεί το τετραμερές από τη διάσπαση που προκαλείται από τα οξέα (σχήμα 2.1).

Στα διαγράμματα που λήφθησαν σε pH 8 με αναλογία M2TM:DPC ίση με 1:100, φαίνεται ότι απουσία αμανταδίνης το πεπτίδιο βρίσκεται κατά 60% με τη μορφή τετραμερούς και κατά 40% στη μορφή μονομερούς. Ωστόσο, μετά την προσθήκη αμανταδίνης, η αναλογία τετραμερούς συνδεδεμένου με αμανταδίνη είναι 90% και μονομερούς 10%. Η αντίδραση

σύνδεσης της αμανταδίνης με το τετραμερές είναι μια εξώθερμη αντίδραση (ΔH = -10 kcal/mol) και με στοιχειομετρία n = 0.25.[33]



Σχήμα 2.1 ***Αριστερά*: Εναλλαγή μεταξύ μονομερούς και τετραμερούς μορφής του διαμεμβρανικού τμήματος της πρωτεΐνης M2 απουσία αμανταδίνης για διάφορες τιμές pH. Σε pH > 6 φαίνεται ο σχηματισμός του τετραμερούς. *Δεξιά*: Εναλλαγή μεταξύ μονομερούς και τετραμερούς μορφής του M2TM παρουσία αμανταδίνης συγκέντρωσης 1 mM σε διάφορες τιμές pH και Am:DPC = 1:10. Η αναλογία M2TM:DPC και για τις δύο μετρήσεις είναι 1:100 με το M2TM να έχει συγκέντρωση 0.1 mM και το DPC 10 mM [Από την Παραπομπή N° 13].**

2.2 Σκοπός της εργασίας

Εξαιτίας της ανάπτυξης αντοχής του ιού της γρίπης έναντι στην αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη νέων αποκλειστών του πρωτεϊνικού διαύλου της πρωτεΐνης M2.

Οι πρόσφατα προσδιορισμένες δομές της M2 με κρυσταλλογραφία[20] σε όξινο pH και με ssNMR[23] σε αλκαλικό pH δείχνουν ένα μόριο αμανταδίνης εντός του διαύλου κοντά στην περιοχή του N-τελικού άκρου, δομές συνεπείς ως προς τη γνωστή στοιχειομετρία πρόσδεσης[33] και της θέσης των ανθεκτικών μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένων των L26, V27, A30, S31 και G34.[21,34,35] Εντούτοις, έχει δειχθεί ότι η αμανταδίνη συνδέεται με την πλήρη M2 στον πόρο M2TM τόσο σε όξινο όσο και σε βασικό pH. Το φάρμακο μάλιστα συνδέεται πρώτα με

υψηλότερη συγγένεια προς την πρωτεΐνη κοντά σε ουδέτερο pH.[21] Επομένως, κάθε μοντέλο που μπορεί να περιγράψει το φαινόμενο σύνδεσης σε οποιοδήποτε pH μπορεί να σταθεί χρήσιμο στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης των αντιικών φαρμάκων.

Χρησιμοποιώντας, λοιπόν, τα ήδη υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα, έγινε η προσπάθεια ανάπτυξης μιας υπολογιστικής μεθόδου που πιθανώς να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο σύνδεσης των αμινοαδαμαντανικών προσδετών με την A/M2TM, ως μοντέλο σύνδεσης αποκλειστών άλλων διαύλων και για τη βελτιστοποίηση ενώσεων οδηγών έναντι στα ιικά στελέχη του ιού της influenza A. Ακόμη, η δημιουργία μιας τέτοιας μεθόδου σε συνδυασμό με την ταχύτατη ανάπτυξη των H/Y μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην ανάπτυξη νέων αντιικών φαρμάκων απέναντι στη νέα πανδημική γρίπη που προκάλεσε τη γρίπη των χοίρων το 2009 με 10000 θύματα.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού ήταν απαραίτητη η εκτέλεση των ακόλουθων βημάτων. Αρχικά, συντέθηκαν τα πεπτίδια 25 αμινοξέων που περιλαμβάνουν τη διαμεμβρανική περιοχή (22 – 46) της πρωτεΐνης M2 με πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση από το C- προς το N- τελικό άκρο. Πιο συγκεκριμένα συντέθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δύο πεπτίδια που αντιστοιχούν στην αλληλουχία Udorn (WT M2) και Weybridge, με αλληλουχίες

Udorn $S^{22}\,S^{23}\,D^{24}\,P^{25}\,L^{26}\,V^{27}\,V^{28}\,A^{29}\,A^{30}\,S^{31}\,I^{32}\,I^{33}\,G^{34}\,I^{35}\,L^{36}\,H^{37}\,L^{38}\,I^{39}\,L^{40}\,W^{41}\,I^{42}\,L^{43}\,D^{44}\,R^{45}\,L^{46}$

Weybridge $S^{22}\,S^{23}\,D^{24}\,P^{25}\,L^{26}\,V^{27}\,\mathbf{V}^{28}\,A^{29}\,A^{30}\,S^{31}\,I^{32}\,I^{33}\,G^{34}\,I^{35}\,L^{36}\,H^{37}\,\mathbf{F}^{38}\,I^{39}\,L^{40}\,W^{41}\,I^{42}\,L^{43}\,D^{44}\,R^{45}\,L^{46}$

Η αλληλουχία Weybridge αντιστοιχεί σε μια μεταλλαγμένη αλληλουχία της Udorn με τις μεταλλάξεις V28I και L38F (F, *φαινυλαλανίνη*). Αυτό έγινε με σκοπό την αξιολόγηση της μεθόδου υπολογισμού σε περισσότερες από μία αλληλουχίες. Στη συνέχεια, μετρήθηκαν οι σταθερές σύνδεσης μερικών αμινοαδαμαντανικών προσδετών με Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης. Τέλος, ακολούθησαν συμβατικοί υπολογισμοί μοριακής προσάραξης και υπολογισμοί διαταραχών ελεύθερης ενέργειας σε συνδυασμό με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής στη δομή αλκαλικού pH του διαμεμβρανικού τμήματος της πρωτεΐνης του ιού της influenza A/M2.

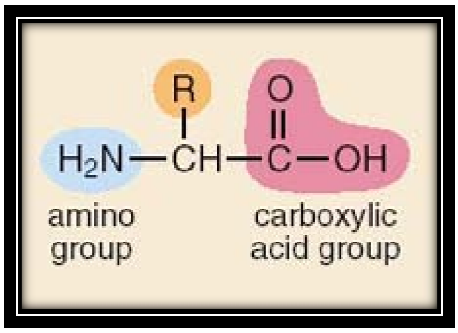
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{ο}

ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

3.1 Εισαγωγή

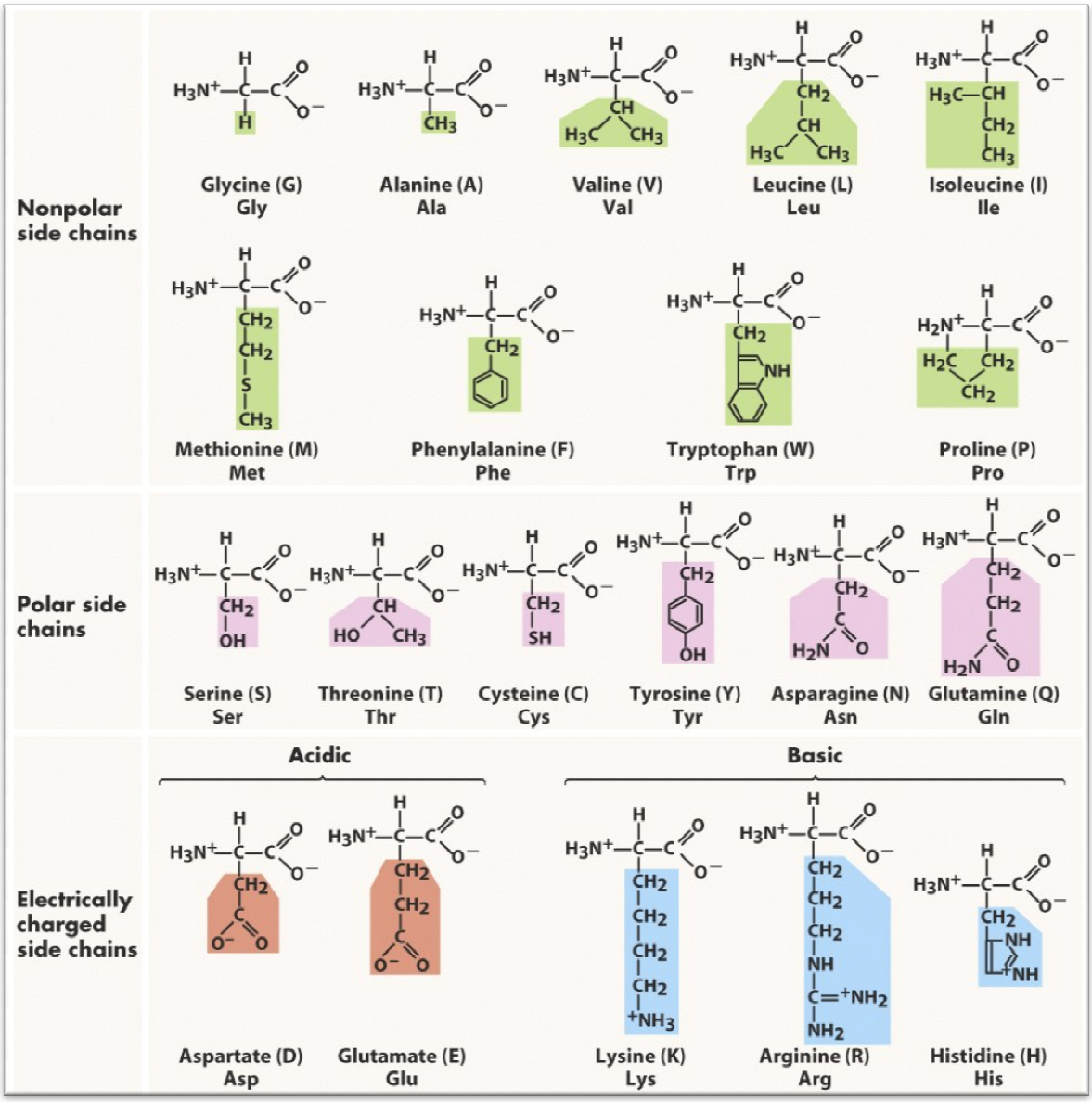
Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα βιομόρια που απαντούν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη πρωτεϊνών, τα οποία συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Η κερατίνη του δέρματος και των νυχιών, η φιβροΐνη του μεταξιού και των ιστών της αράχνης, η πολυμεράση του DNA, η οποία καταλύει τη σύνθεση των DNA στα κύτταρα, καθώς και η M2 που διαπερνά τον ιικό φάκελο, είναι πρωτεΐνες. Ανεξάρτητα από τη λειτουργία τους, όλες οι πρωτεΐνες αποτελούνται από ένα μεγάλο αριθμό **αμινοξέων**, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μια επιμήκη πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Τα αμινοξέα, ο γενικός τύπος των οποίων απεικονίζεται στο σχήμα 3.1, όπως υποδηλώνει η ονομασία τους περιέχουν δύο **λειτουργικές ομάδες**. Τη βασική **αμινομάδα** και την όξινη **καρβοξυλομάδα**. Ακόμη, περιέχουν μια **πλευρική αλυσίδα** (R) η οποία καθορίζει κάθε αμινοξύ. Αυτή μπορεί να είναι υδρόφοβη ή πολική, θετικά ή αρνητικά φορτισμένη (σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.1 Γενικός τύπος των αμινοξέων. Με γαλάζιο συμβολίζεται η αμινομάδα, με ροζ η καρβοξυλική ομάδα και με πορτοκαλί η πλευρική ομάδα τους.

Η μεγάλη βιολογική σημασία των αμινοξέων απορρέει από το γεγονός ότι αυτά μπορούν να συνδέονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας μακριές αλυσίδες, μέσω αμιδικών δεσμών, ανάμεσα στην $–NH_2$ του ενός αμινοξέος και την –COOH κάποιου άλλου. Καθαρά για λόγους ταξινόμησης, αλυσίδες με λιγότερα από 50 αμινοξέα ονομάζονται συχνά **πεπτίδια**, ενώ ο όρος **πρωτεΐνες** χρησιμοποιείται για τις μεγαλύτερες αλυσίδες. Στο σχήμα 3.2 απεικονίζονται τα είκοσι συνήθη αμινοξέα των πρωτεϊνών.

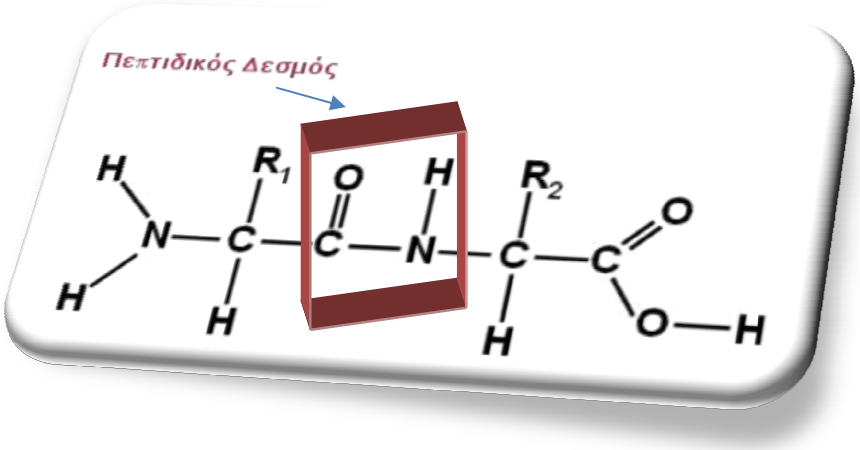


Σχήμα 3.2 Τα 20 συνήθη αμινοξέα των πρωτεϊνών. Ο διαφορετικός χρωματισμός των πλευρικών αλυσίδων υποδηλώνει: (πράσινο): μη πολικές, (μωβ): πολικές, (κόκκινο): αρνητικά φορτισμένες, (γαλάζιο): θετικά φορτισμένες. Κάτω από το συντακτικό τύπο κάθε αμινοξέος δηλώνεται η πλήρης ονομασία του, σε παρένθεση αναγράφεται η συντομογραφία του με ένα γράμμα του λατινικού αλφάβητου και κάτω από αυτή η συντομογραφία του με τρία γράμματα.

3.2 Πεπτίδια

Τα πεπτίδια είναι πολυμερή αμινοξέων. Οι δομικές μονάδες τους, τα αμινοξέα, είναι μεταξύ τους συνδεδεμένες με αμιδικούς δεσμούς. Μια αμινομάδα από το ένα αμινοξύ

σχηματίζει αμιδικό δεσμό με την καρβοξυλική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος, η αμινομάδα του δεύτερου αμινοξέος σχηματίζει **αμιδικό δεσμό** (ή **πεπτιδικό δεσμό**) με την καρβοξυλομάδα ενός τρίτου αμινοξέος, κ.ο.κ. (σχήμα 3.3). Κατά σύμβαση τα πεπτίδια γράφονται πάντοτε με το ***N*-τελικό αμινοξύ** (εκείνο που έχει ελεύθερη την ομάδα $-NH_2$) στα αριστερά και το **C-τελικό αμινοξύ** (εκείνο με την ελεύθερη ομάδα –COOH) στα δεξιά. Η αντίδραση ακυλίωσης της αμινομάδας του ενός αμινοξέος με την καρβοξυλομάδα του άλλου ονομάζεται **σύζευξη**.



Σχήμα 3.3 Αναπαράσταση του πεπτιδικού δεσμού σε ένα διπεπτίδιο.

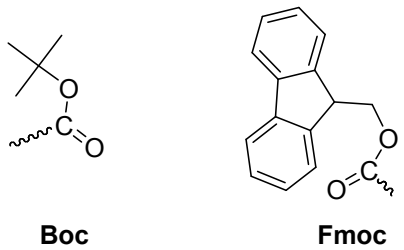
3.3 Στρατηγικές πεπτιδικής σύνθεσης

Πολλές φορές είναι απαραίτητη η σύνθεση των πεπτιδίων με σκοπό την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων, ιδιαίτερα εάν ή πρωτεΐνη έχει βιολογική αξία. Κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων είναι απαραίτητο οι πεπτιδικοί δεσμοί να σχηματιστούν με συγκεκριμένη σειρά και όχι τυχαία, δηλαδή να εξασφαλιστεί εκλεκτικότητα της αντίδρασης.

Η εκλεκτικότητα αντίδρασης μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλη **προστασία** στη μία από τις δύο ομάδες κάθε αμινοξέος. Είναι δυνατόν να επιτευχθεί η επιθυμητή σύζευξη των αμινοξέων μόνο εάν προστατευθούν εκλεκτικά όλες οι αμινο- ή καρβοξυ- λειτουργικές ομάδες, εκτός από αυτές που είναι επιθυμητό να αντιδράσουν. Έτσι, αν για παράδειγμα είναι επιθυμητή η σύνθεση του διπεπτιδίου Ala-Leu, θα πρέπει αρχικά να προστατευθούν η αμινομάδα της αλανίνης και η καρβοξυλομάδα της λευκίνης έτσι ώστε να μην μπορούν να αντιδράσουν, κατόπιν να σχηματιστεί ο επιθυμητός αμιδικός δεσμός και τελικά να

απομακρυνθούν οι προστατευτικές ομάδες. Ακόμη, πρέπει να προστατεύονται και οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων όταν περιέχουν λειτουργικές ομάδες που μπορεί να παρεμποδίσουν την πεπτιδική σύνθεση, π.χ. αμινομάδες (Asn, Gln, Arg), υδροξυλομάδες (Ser, Tyr), καρβοξυλομάδες (Asp, Glu), κ.λπ.

Έχουν προταθεί διάφορες προστατευτικές ομάδες, όμως ελάχιστες χρησιμοποιούνται ευρέως. Οι καρβοξυλομάδες προστατεύονται συχνά με τη μετατροπή τους σε μεθυλο- ή βενζυλο- εστέρες. Οι αμινομάδες προστατεύονται συχνά με τη μορφή των *tert*-βουτοξυκαρβονυλο-αμιδικών παραγώγων τους (Boc) ή με τη μορφή των 9-φλουορενυλο-μεθοξυ-καρβόνυλο (Fmoc) παραγώγων τους (σχήμα 3.4).



Σχήμα 3.4 Δομή των προστατευτικών ομάδων που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση.

Η επιμήκυνση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας θα μπορούσε να γίνει σε διάλυμα, όμως τυχόν μη αντιδρών ολιγοπεπτίδιο κατά τη σταδιακή προσθήκη αμινοξέων οδηγεί σε μίγματα πεπτιδίων διαφορετικού μήκους πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η ξεχωριστή σύνθεση ολιγοπεπτιδίων π.χ. διπεπτιδίων, τριπεπτιδίων και η επακόλουθη σύζευξη μεταξύ τους, μπορεί να προσφέρει κάποια λύση, όχι όμως για τη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων.

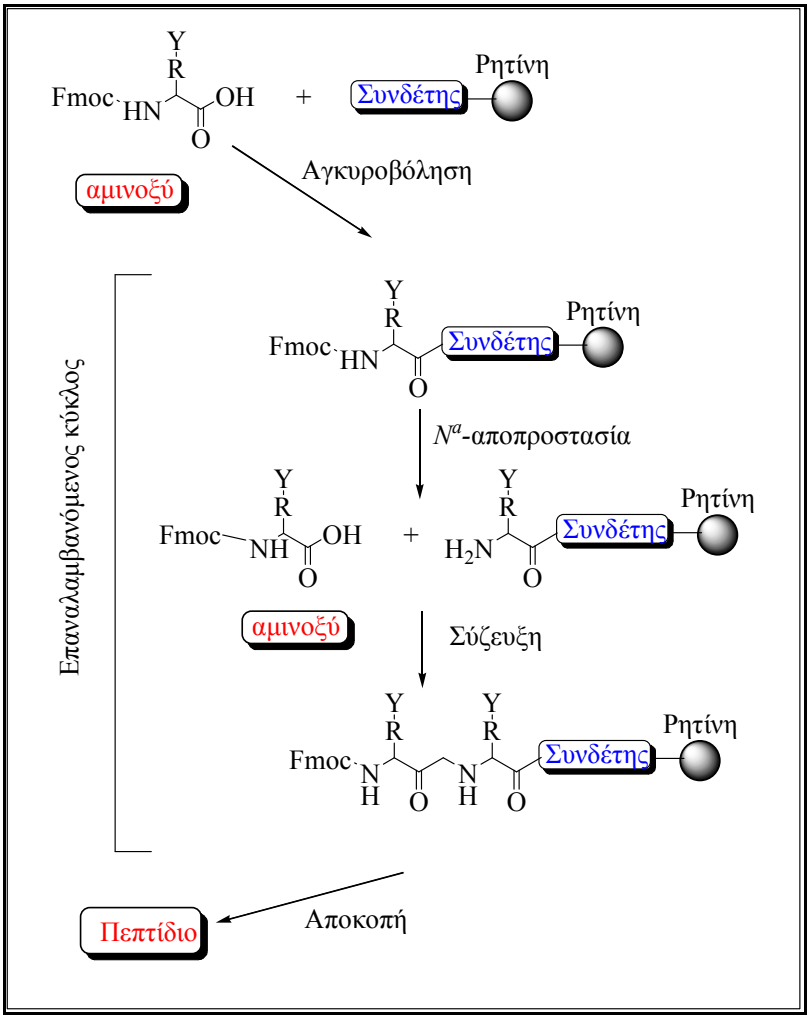
3.4 Μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση: Η τεχνική στερεάς φάσης κατά Merrifield

Η βασική αρχή της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεό υπόστρωμα αναπτύχθηκε το 1963 από τον R. Bruce Merrifield στο Πανεπιστήμιο Rockefeller των Η.Π.Α. Σύμφωνα με τη μέθοδο Merrifield, η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιείται σε στερεά φάση από σφαιρίδια ενός στερεού πολυμερούς υποστρώματος, με σκοπό το πρώτο αμινοξύ να αποκτά με τον τρόπο αυτό μια μόνιμη προστατευτική ομάδα στο C-τελικό άκρο.[36] Ακολουθεί η σύζευξη της

καρβοξυλομάδας ενός δεύτερου N-προστατευμένου αμινοξέος στην ελεύθερη αμινομάδα του πρώτου, οπότε σχηματίζεται ένα διπεπτίδιο. Ακολουθεί αποπροστασία της αμινομάδας του διπεπτιδίου που είναι αγκυροβολημένο στη στερεά φάση και προστίθεται ένα άλλο αμινοξύ. Με τον ίδιο τρόπο προστίθενται και τα υπόλοιπα αμινοξέα για τη σύνθεση της επιθυμητής αλληλουχίας.

Κάθε κύκλος προσθήκης ενός νέου αμινοξέος περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα που διαγραμματικά φαίνονται στο σχήμα 3.5.

1. Απομάκρυνση της N^{α} προστατευτικής ομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να κάνει πυρηνόφιλη προσβολή και εκπλύσεις του πολυμερούς με κατάλληλους οργανικούς διαλύτες, ώστε να απομακρυνθούν τα διαλυτά παραπροϊόντα και η περίσσεια των αντιδραστηρίων.
2. Σύζευξη του επόμενου N^{α} προστατευμένου αμινοξέος στο οποίο έχει ενεργοποιηθεί η καρβοξυλομάδα.
3. Εκπλύσεις του πολυμερούς με κατάλληλους οργανικούς διαλύτες ώστε να απομακρυνθούν τα διαλυτά παραπροϊόντα και η περίσσεια των αντιδραστηρίων.



Σχήμα 3.5 Γενική πορεία πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Με Y συμβολίζονται οι προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων.

Μετά το σχηματισμό του επιθυμητού πεπτιδίου ακολουθεί επεξεργασία με κατάλληλο αντιδραστήριο (συνήθως η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται με τη χρησιμοποίηση όξινων διαλυμάτων), ώστε να αποκοπεί αυτό από τη ρητίνη στην οποία βρίσκεται προσδεδεμένο. Ταυτόχρονα με την αποκοπή (*cleavage*) του πεπτιδίου από τη ρητίνη μπορούν να απομακρυνθούν και οι μόνιμες προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Αυτό συμβαίνει όταν όλες οι ομάδες είναι της ίδιας «φύσης», για παράδειγμα, οι πλευρικές αλυσίδες να είναι αμινικές και Boc προστατευμένες και ο συνδέτης της στερεάς φάσης να είναι αμιδικής φύσης, οπότε απομακρύνονται εύκολα με οξύ.

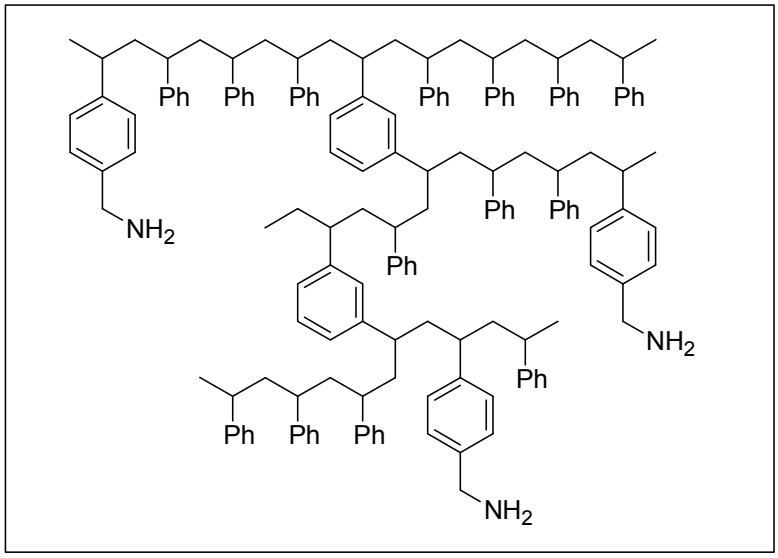
Η τεχνική της σύνθεσης σε στερεά φάση μπορεί να αυτοματοποιηθεί για σχετικά εύκολες αλληλουχίες. Υπάρχουν συσκευές ελεγχόμενες από ηλεκτρονικό υπολογιστή, οι οποίες επαναλαμβάνουν αυτόματα τα στάδια σύζευξης και αποπροστασίας των διαφόρων αμινοξέων, όσες φορές αυτό είναι επιθυμητό. Η απόδοση κάθε σταδίου είναι εξαιρετικά υψηλή, ενώ οι απώλειες ελαχιστοποιούνται, γιατί τα πεπτίδια που σχηματίζονται σε ενδιάμεσα στάδια δεν απομακρύνονται από το αδιάλυτο πολυμερές μέχρι το τελευταίο στάδιο.

3.4.1 Το στερεό πολυμερές υπόστρωμα

Το στερεό πολυμερές υπόστρωμα θα πρέπει να διαθέτει τα κατάλληλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, ώστε να ανταποκρίνεται στις συνθήκες της πεπτιδικής σύνθεσης και να επιτυγχάνονται ποσοτικές αντιδράσεις με υψηλές αποδόσεις με όσο το δυνατόν λιγότερα παραπροϊόντα.

Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει να διαθέτει την κατάλληλη μηχανική αντοχή στις συνθήκες των αντιδράσεων και ικανοποιητική διόγκωση στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες, ώστε να είναι εύκολη και αποδοτική η πρόσβαση των αντιδραστηρίων στα ενεργά κέντρα σύνθεσης του πεπτιδίου. Τέλος, το πολυμερές θα πρέπει να είναι αδρανές στις συνθήκες των αντιδράσεων της πεπτιδικής σύνθεσης.

Ένα από τα ευρύτατα διαδεδομένα πολυμερή στην πεπτιδική σύνθεση είναι το αμινομεθυλιωμένο συμπολυμερές του στυρολίου με 1% m-διβινυλοβενζόλιο (AMPS-DVB) (σχήμα 3.6).

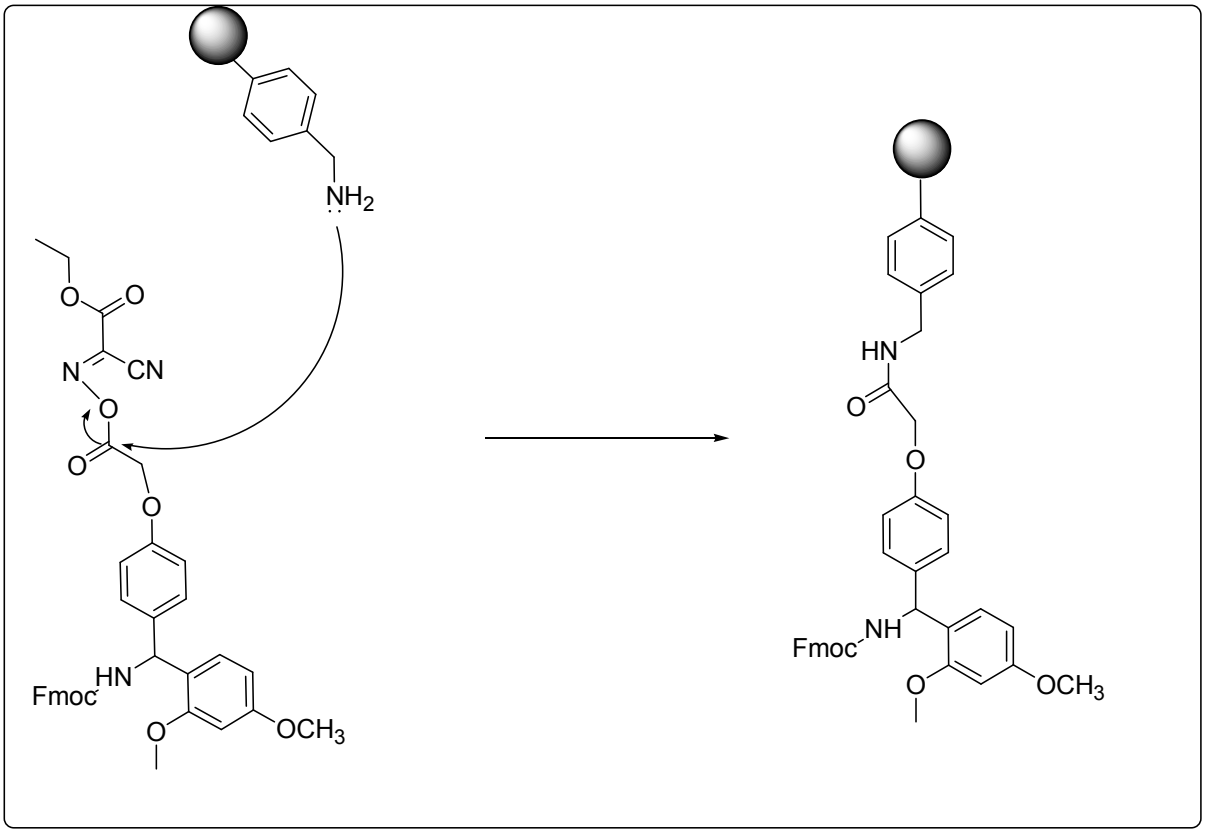


Σχήμα 3.6 Αμινομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρενίου διβινυλοβενζολίου (AMPS)

3.4.2 Το μόριο συνδέτης (*linker*)

Το πρώτο αμινοξύ ενός πεπτιδίου συνδέεται πάνω στη ρητίνη κυρίως μέσω της καρβοξυλικής ομάδας του αμινοξέος με αμιδικό δεσμό με την αμινομάδα του AMPS. Ο δεσμός αυτός θα πρέπει να είναι σταθερός σε όλα τα στάδια της σύνθεσης, ώστε το αναπτυσσόμενο πεπτίδιο να είναι μόνιμα προσκολλημένο στο πολυμερές και η απόδοση σύνδεσης να είναι υψηλή. Προκειμένου να συμβεί αυτό θα πρέπει να συνδεθεί με τις αμινομάδες του πολυμερούς ένας κατάλληλος αριθμός (0.3 – 0.7 mmol/g) ενεργών ενδιαμέσων μορίων συνδετών, πάνω στα οποία θα συνδεθεί το πρώτο αμινοξύ του υπό σύνθεση πεπτιδίου.[37,38] Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **ενεργοποίηση** του πολυμερούς (σχήμα 3.7).

Το πλεονέκτημα χρήσης του ενδιάμεσου μορίου συνδέτη, είναι ότι η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται σε ήπιες συνθήκες και ότι το πεπτίδιο λαμβάνεται με τη μορφή αμιδίου (σχήμα 3.10, §3.4.5). Το αμίδιο λαμβάνεται με την επίδραση TFA στο μόριο συνδέτη κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Η χρησιμοποίηση ήπιων συνθηκών κατά την αποκοπή του πεπτιδίου σημαίνει πως αν το πρώτο αμινοξύ συνδεόταν απευθείας με τη ρητίνη με αμιδικό δεσμό, χωρίς δηλαδή τη μεσολάβηση του συνδέτη, τότε η αποκοπή θα μπορούσε να γίνει μόνο υπό έντονα αλκαλικές ή όξινες συνθήκες, κάτι που θα κατέστρεφε όλους τους πεπτιδικούς δεσμούς του συντιθέμενου πεπτιδίου.

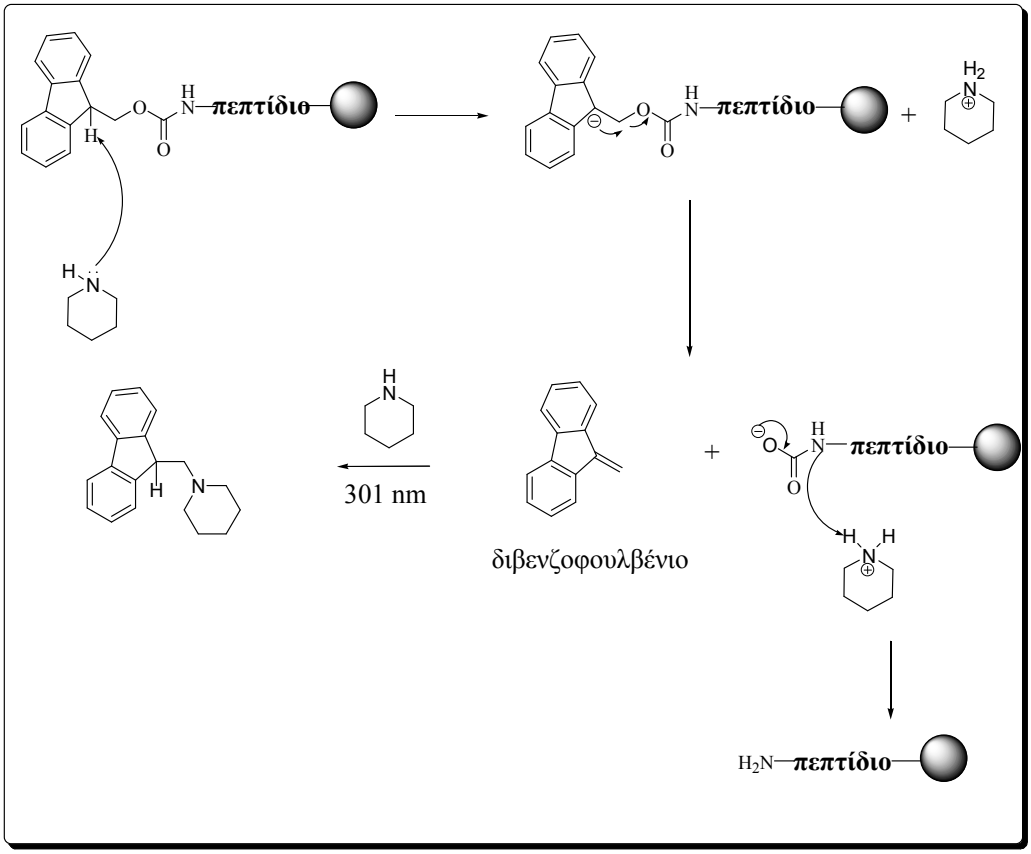


Σχήμα 3.7 Σύζευξη ενεργοποιημένου μορίου συνδέτη με τη ρητίνη.

3.4.3 Αποπροστασία αμινοπροστατευτικής ομάδας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά τη διάρκεια σύνθεσης του πεπτιδίου χρησιμοποιείται παροδική προστασία για την α-αμινομάδα κάθε προστιθέμενου αμινοξέος και μόνιμη προστασία για τις δραστικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων. Οι α-αμινοπροστατευτικές ομάδες των αμινοξέων απομακρύνονται σε κάθε κύκλο σύζευξης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί μία από τις πιο διαδεμόνες α-αμινοπροστατευτικές ομάδες είναι η Fmoc.

Η Fmoc ομάδα είναι ευαίσθητη σε βασικές συνθήκες και η απομάκρυνσή της από την α-αμινομάδα γίνεται με επίδραση δευτεροταγούς αμίνης, στην περίπτωση της SPPS (SPPS, *Solid Phase Peptide Synthesis*), συνήθως διαλύματος 20% πιπεριδίνης σε DMF (σχήμα 3.8).[39]



Σχήμα 3.8 Σχηματική αναπαράσταση του βήματος της αποπροστασίας της αμινομάδας του αμινοξέος. Περιγράφεται η πυρηνόφιλη προσβολή της πιπεριδίνης στην Fmoc προστατευτική ομάδα και η απόσπασή της από το αναπτυσσόμενο πεπτίδιο που είναι αγκυροβολημένο στο πολυμερές. Σχηματίζεται διβενζοφουλβένιο που δίνει αντίδραση Michael (συζυγής προσθήκη) με την πιπεριδίνη προς το πιπεριδινομεθυλοφλουορένιο που απορροφά στα 301 nm. Η αποπροστασία ολοκληρώνεται όταν πλέον δε λαμβάνεται απορρόφηση στα 301 nm.

3.4.4 Ανάπτυξη του πεπτιδίου

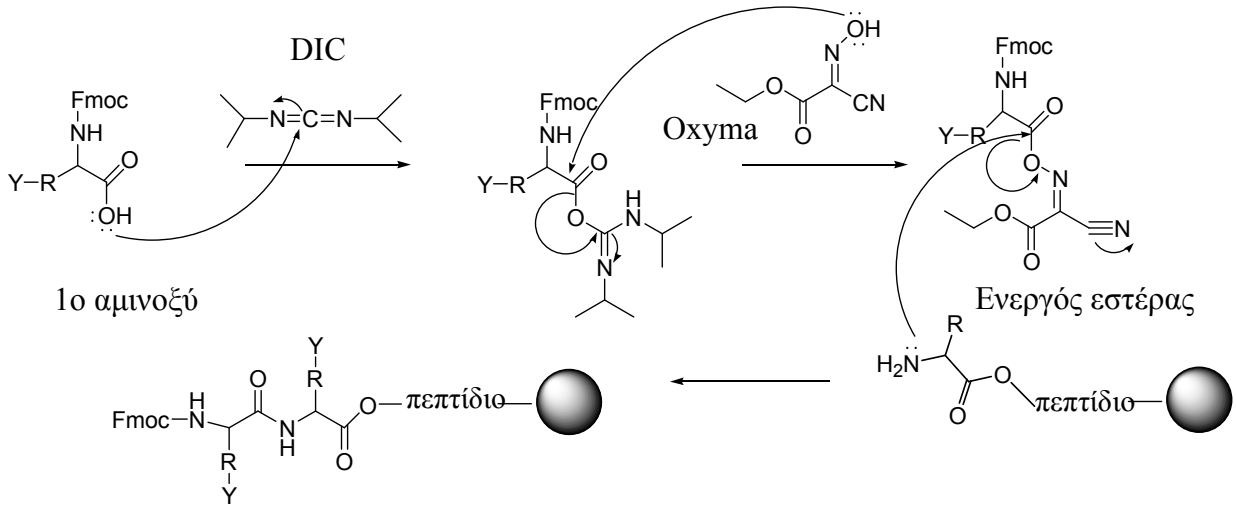
Οι αμιδικοί δεσμοί μεταξύ των αμινοξέων σχηματίζονται συνήθως με την επίδραση ενός καρβοδιιμιδίου, όπως DCC ή το DIC και ενός αντιδραστηρίου σύζευξης όπως το HOBt ή το Oxyma Pure (στο εξής Oxyma). Τα αντιδραστήρια αυτά χρησιμοποιούνται επειδή η α-καρβοξυλομάδα των αμινοξέων πρέπει να **ενεργοποιηθεί** από μια ομάδα X που είναι δέκτης ηλεκτρονίων, ώστε να είναι ενεργά εύκολη η πυρηνόφιλη προσβολή από την αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος.

Το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt) αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην πεπτιδική σύνθεση εξαιτίας της εξαιρετικής του δραστικότητας και της

χειρικής σταθερότητας των βενζοτριαζολικών (Bt) εστέρων των πεπτιδίων και των αμινοξέων.[40] Πρόσφατα, το μονοϋδρικό HOBt, η συνήθης μορφή του αντιδραστηρίου αυτού, αναταξινομήθηκε από τον OHE ως εκρηκτικό τάξης 1c.[41] Η μέτρηση αυτή, δυστυχώς, επέφερε τη σημαντική αύξηση του κόστους του αντιδραστηρίου.

Η έλλειψη διαθεσιμότητας του HOBt προκάλεσε ιδιαίτερες δυσκολίες στους πεπτιδοχημικούς και ενεργοποίησε την έρευνα για την εύρεση ενός μη εκρηκτικού αντιδραστηρίου που θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά του HOBt. Ένα από τα υποψήφια αυτά μόρια είναι ο αιθυλο-2-κυανο-2-(υδροξυϊμινο)οξικός εστέρας, γνωστό επίσης και ως Oxyma (σχήμα 3.9). Ο Subirós-Funosas και οι συνεργάτες του[42] έδειξαν ότι το αντιδραστήριο αυτό είναι περισσότερο αποτελεσματικό και οδηγεί σε μικρότερη ρακεμίωση σε σχέση με το HOBt σε αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται καρβοδιιμίδια. Το Oxyma πρωτοαναγνωρίστηκε ως δυνητικά χρήσιμο αντιδραστήριο σύζευξης τη δεκαετία του 1970.[40,43] Έχει pK_a = 4.60, ίδια με του HOBt, αλλά δεν περιέχει την εκρηκτική τριαζολομάδα του HOBt και ανάλογων ενώσεων όπως το HOAt[44] και Cl-HOBt.[45]

Ακριβώς όπως το HOBt, το Oxyma αντιδρά με προστατευμένα αμινοξέα ή πεπτίδια παρουσία καρβοδιιμιδίων προς σχηματισμό ενεργών εστέρων (σχήμα 3.9).



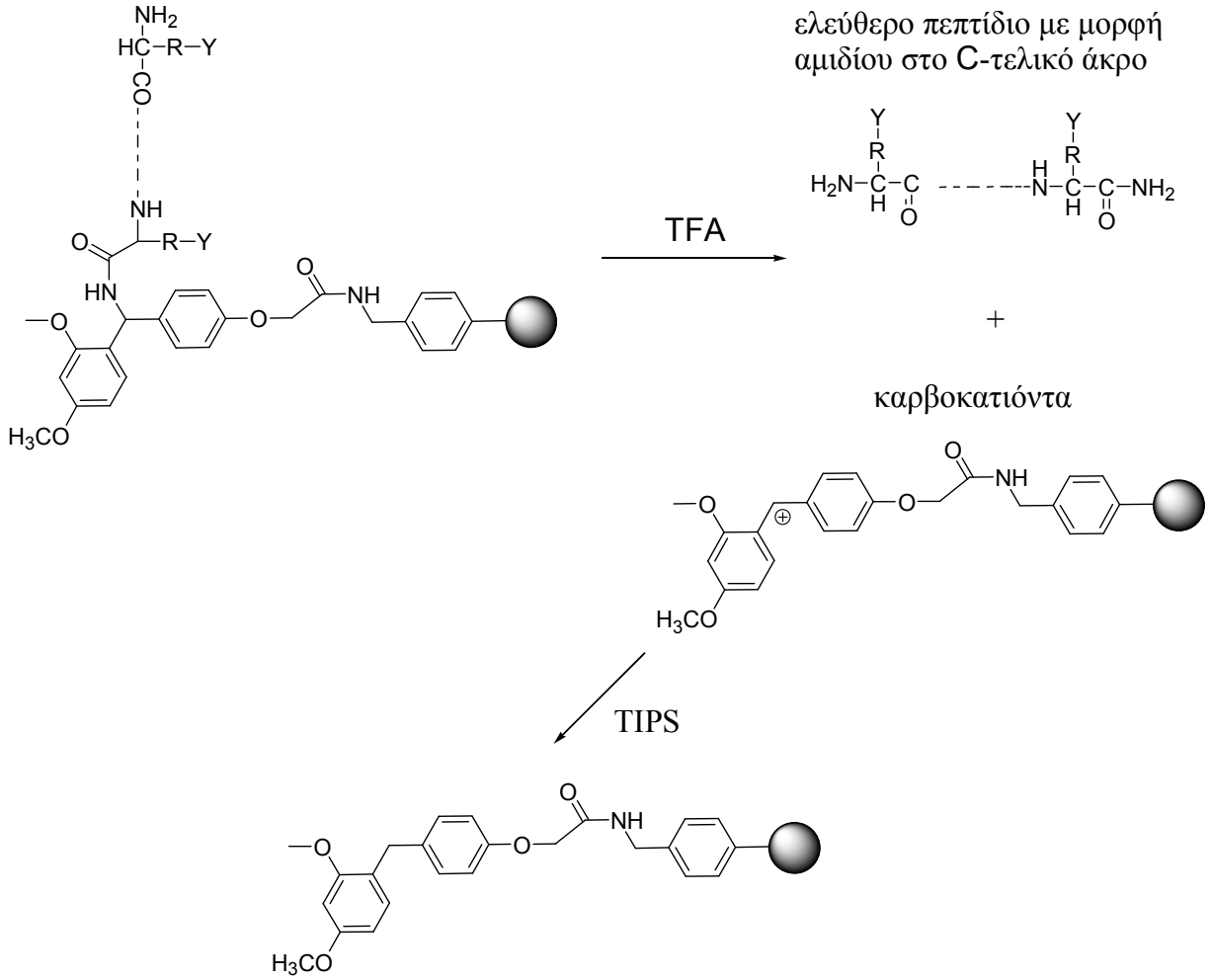
Σχήμα 3.9 Ενεργοποίηση αμινοξέος με συνδυασμό DIC/Oxyma και σύζευξη με υποθετικό πεπτίδιο. Στο σχήμα φαίνονται επίσης οι ενώσεις DIC και Oxyma.

Ο συνδυασμός DIC/Oxyma χρησιμοποιείται στην πεπτιδική σύνθεση για την *in situ* ενεργοποίηση του καρβοξυλικού αμινοξέος (βλ. σχήμα 3.9).[42] Ο ενεργός εστέρας του Fmoc αμινοξέος που σχηματίζεται αμινολύεται από την ελεύθερη αμινομάδα του πεπτιδίου, οπότε προστίθεται ένα ακόμη αμινοξύ στην πεπτιδική αλυσίδα (σχήμα 3.9).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι στην Fmoc στρατηγική δε χρησιμοποιείται DCC επειδή η σχηματιζόμενη ουρία μετά τη σύζευξη είναι δυσδιάλυτη στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες και συνεπώς δεν μπορεί να διαχωριστεί από τη ρητίνη.

3.4.5 Απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του προστατευμένου πεπτιδίου το προϊόν πρέπει να αποσπαστεί από τη ρητίνη. Αυτό επιτυγχάνεται όταν η σύνθεση γίνεται με βάση την Fmoc/*t*Bu στρατηγική, με επίδραση όξινων διαλυμάτων που περιέχουν αντιδραστήρια που δεσμεύουν τα καρβοκατιόντα (*scavengers*), τα οποία προκύπτουν από την απομάκρυνση των μόνιμων προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων του πεπτιδίου (σχήμα 3.10).



Σχήμα 3.10 Απόσπαση του πεπτιδίου από το στερεό υπόστρωμα.

3.4.6 Καθαρισμός και ταυτοποίηση καθαρού προϊόντος

Μετά την ολοκλήρωση της απόσπασης του πεπτιδίου από τη ρητίνη είναι απαραίτητος ο καθαρισμός του πεπτιδίου από τα παραπροϊόντα της σύνθεσης, π.χ. ολιγοπεπτίδια μικρότερου μοριακού βάρους. Ο καθαρισμός γίνεται με τη χρήση HPLC.

Στη συνέχεια, αφού απομονωθεί το καθαρό προϊόν πραγματοποιείται η ταυτοποίησή του. Η φασματομετρία μαζών έχει βρει εφαρμογή στον έλεγχο της ταυτότητας των συνθετικών πεπτιδίων, καθώς όχι μόνο παρέχει την πληροφορία για την ορθότητα της σύνθεσης, αλλά πληροφορεί επιπλέον άμεσα για την ύπαρξη τυχόν τροποποιήσεων στο μόριο του πεπτιδίου, οι οποίες δεν είναι ανιχνεύσιμες με αναλυτικές τεχνικές.

Η πλέον διαδεδομένη τεχνική ανάλυσης πεπτιδίων με MS είναι η τεχνική ESI, η οποία εφαρμόζεται σε διάλυμα της προς ανάλυση ουσίας. Σταγονίδια δείγματος, τα οποία

σχηματίζονται από τη διέλευση του διαλύματος μέσω ενός μεταλλικού τριχοειδούς, φορτίζονται επιφανειακά υπό την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου και στη συνέχεια εισάγονται σε περιβάλλον στο οποίο εφαρμόζεται ρεύμα θερμού αζώτου, οπότε και προκαλείται εξάτμιση του διαλύτη και τελικά απόσπαση φορτισμένων ιόντων του αναλυτή στην αέρια φάση. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε πεπτίδια ή πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μέχρι 75000 Da.

3.4.7 Διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην SPPS

Σπουδαίο ρόλο στην πεπτιδική σύνθεση παίζει ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών. Το αποτέλεσμα της σύζευξης εξαρτάται από το διαλύτη κατά πολλούς τρόπους.[46,47] Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το διχλωρομεθάνιο, το διμεθυλοφορμαμίδιο, το τετραϋδροφουράνιο και η N-μεθυλο-2-πυρρολιδινόνη. Εκτός από το να διαλύει όλα τα αντιδρώντα, ο διαλύτης πρέπει να διογκώνει επαρκώς τη ρητίνη, να βοηθάει στην έκθεση της N-τελικής αμινομάδας στο ακυλιωτικό αντιδραστήριο, να αυξάνει την ταχύτητα των αντιδράσεων ακυλίωσης και ενεργοποίησης και να αποτρέπει τη ρακεμοποίηση.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται κυρίως στο στάδιο της σύζευξης και της αποπροστασίας είναι το DMF. Καλές ιδιότητες παρουσιάζει και η N-μεθυλο-2-πυρρολιδινόνη, τόσο στη διόγκωση της ρητίνης όσο και στο στάδιο της σύζευξης, ωστόσο λόγω του αυξημένου κόστους της δε χρησιμοποιείται ευρέως.

Μετά από κάθε αντίδραση η ρητίνη εκπλύνεται προς απομάκρυνση των παραπροϊόντων και της περίσσειας των αντιδρώντων. Για το λόγο αυτό η επιλογή του διαλύτη είναι ιδιαίτερα σημαντική, επειδή πρέπει να παρουσιάζει μεγάλη διαλυτική ικανότητα και για τις ανεπιθύμητες ουσίες. Στις εκπλύσεις μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν μεθανόλη και πετρελαϊκός αιθέρας επειδή προκαλούν συρρίκνωση της ρητίνης όταν αυτό είναι επιθυμητό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{ο}

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΣΕ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑ ΜΕ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

4.1 Εισαγωγή

Όλα τα βιολογικά φαινόμενα περιλαμβάνουν μοριακή αναγνώριση. Αυτή μπορεί να είναι είτε διαμοριακή, όπως για παράδειγμα η σύνδεση ενός προσδέτη με ένα βιολογικό μακρομόριο προς σχηματισμό μακρομοριακών συμπλόκων, είτε ενδομοριακή, όπως η αναδίπλωση των πρωτεϊνών.

Το πρόβλημα σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει αντιδράσεις σύνδεσης προσδέτη – πρωτεΐνης. Η εκλεκτικότητα και η ακρίβεια των αντιδράσεων σύνδεσης μεταξύ μακρομορίων, προσδέτη – μακρομορίων, κ.λπ. εντυπωσιάζει βιολόγους και χημικούς από τις αρχές εξέλιξης της σύγχρονης βιοχημείας. Ένα από τα πιο ταχέως αναπτυσσόμενα πεδία σήμερα είναι η μελέτη της μοριακής αναγνώρισης μεταξύ μακρομορίων και μικρών προσδετών – μακρομορίων. Η ποσοτική περιγραφή των δυνάμεων που ρυθμίζουν το σχηματισμό βιολογικών συμπλόκων αποτελεί μέρος αυτής της προσπάθειας. Έτσι, έχει πολύ μεγάλη πρακτική σημασία για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, εμβολίων και φαρμακευτικών ενώσεων.[48]

Ο αριθμός των δομών συμπλόκων πρωτεΐνης – προσδέτη, που επιλύονται με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ σε υψηλή ανάλυση, αυξάνεται συνεχώς. Σήμερα υπάρχει μεγάλη βάση δεδομένων που περιγράφει τη συμπληρωματικότητα των περιοχών των μορίων που αλληλεπιδρούν και τον ακριβή προσανατολισμό των ομάδων που αλληλεπιδρούν. Μέσω αυτών των λεπτομερειών γίνεται γνωστό το *πώς* αλληλεπιδρούν τα μόρια, αλλά δε γνωστοποιείται καλά το *γιατί*, αφού οι δομές αυτές των βιομοριακών συμπλόκων είναι στατικές.

Για το λόγο αυτό, πρέπει να βρεθούν τρόποι να εξηγηθεί η δομή με ενεργειακούς όρους, μια εργασία εξαιρετικά δύσκολη παρ' όλες τις πολλά υποσχόμενες προόδους στους

θεωρητικούς υπολογισμούς και τη συνεχή συσσώρευση πειραματικών αποτελεσμάτων. Η ελεύθερη ενέργεια σχηματισμού του συμπλόκου είναι ένας πολύ μικρός αριθμός, που προκύπτει από το συγκερασμό μεταξύ μεγάλων ευνοϊκών και μεγάλων μη ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων. Η σύνδεση συμβαίνει μόνον όταν η *ολική* ενέργεια ελαττώνεται. Κατά τη σύνδεση αυτή οι αλληλεπιδράσεις με τον διαλύτη – νερό είναι εξίσου σημαντικές.[49,50] Για παράδειγμα, στην περίπτωση σύνδεσης ενός προσδέτη – φαρμάκου με τον υποδοχέα πρέπει να απομακρυνθούν τα μόρια του διαλύτη από τις επιφάνειες των δύο μορίων, διαδικασία που ευνοείται εντροπικά αλλά όχι ενθαλπικά.

4.2 Περιγραφή Φαινομένων Σύνδεσης μέσω Βασικών Θερμοδυναμικών Εξισώσεων

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs, Δ*G*, μιας αντίδρασης σύνδεσης εξαρτάται από τη θερμοκρασία και περιγράφεται από την εξίσωση (4.1)

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.1)$$

Οι μεταβολές της ενθαλπίας (Δ*H*) και της εντροπίας (ΔS) εξαρτώνται από τη θερμοκρασία (*T*), σύμφωνα με την εξίσωση (4.2)

$$\Delta C_P = \frac{d(\Delta H)}{dT} - T\frac{d(\Delta S)}{dT} \quad (4.2)$$

οπότε $\Delta C_P = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T}\right)_P - \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial \ln T}\right)_P$, όπου $C_P = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_P$.

Βάσει των σχέσεων (4.1) και (4.2), η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά τη μεταβολή $T_R \longrightarrow T$, μπορεί να γραφεί

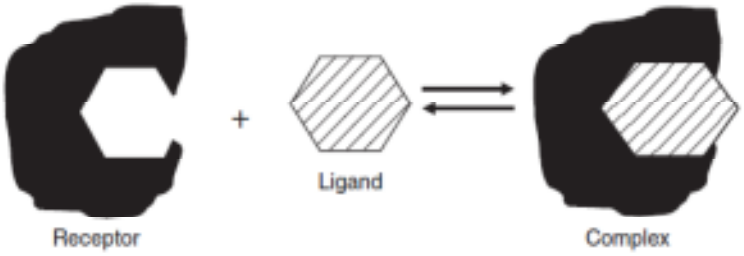
$$\Delta G(T) = \Delta H(T_R) + \int_{T_R}^{T} \Delta C_P dT - T\Delta S\,(T_R) - T\int_{T_R}^{T} \Delta C_P d\ln T \quad (4.3),$$

όπου ΔC_P η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας και T_R η κατάλληλη θερμοκρασία αναφοράς. Εάν η ΔC_P είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας στο διάστημα ενδιαφέροντος, τότε η εξίσωση (4.3) απλοποιείται στην παρακάτω (4.4)

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_R) - T\Delta S(T_R) + \Delta C_P T\left[(T - T_R - T)\ln {}^{T}/_{T_R}\right] \quad (4.4)$$

Οι εξισώσεις (4.1) και (4.2) δείχνουν ότι η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης έχει μια ενθαλπική και μια εντροπική συνιστώσα. Για το θερμοδυναμικό χαρακτηρισμό μιας αντίδρασης σύνδεσης, πρέπει να προσδιοριστούν οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας, της ενθαλπίας και της εντροπίας, καθώς επίσης να προσδιοριστεί η μεταβολή των τριών αυτών μεγεθών με τη θερμοκρασία ώστε να ληφθεί η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας.

Στο σχήμα 4.1 αναπαρίσταται μια τυπική ισορροπία πρόσδεσης μεταξύ ενός προσδέτη και ενός υποδοχέα.[51]



Σχήμα 4.1 Απλουστευμένο μοντέλο αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός υποδοχέα (*receptor*) και ενός προσδέτη (*ligand*) προς σχηματισμό συμπλόκου (*complex*). Ο προσδέτης σε αυτήν την αναπαράσταση ταιριάζει με τη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα ώστε να προκαλέσει μια συγκεκριμένη αλληλεπίδραση πρόσδεσης [Από την Παραπομπή N° 51].

Γενικά, ο προσδέτης μπορεί να είναι ένα υπόστρωμα, αναστολέας, φάρμακο, συνένζυμο, μεταλλικό ιόν, πρωτεΐνη, πολυπεπτίδιο, ολιγονουκλεοτίδιο, νουκλεϊκό οξύ, κ.λπ., που μπορεί να αλληλεπιδράσει μη ομοιοπολικά με συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης ενός δεύτερου μορίου, συνήθως πρωτεΐνης ή νουκλεϊκού οξέος. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.1 στην ισορροπία στο διάλυμα συμμετέχουν τρία είδη, ο υποδοχέας, ο προσδέτης και το σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Για την κατανόηση, λοιπόν, της εικονιζόμενης αντίδρασης, αρχικά,

είναι απαραίτητη η σταθερά ισορροπίας, K_A, και η στοιχειομετρία *n*, πόσοι δηλαδή προσδέτες προσδένονται στο μακρομόριο όταν αυτό βρίσκεται σε κορεσμό. Ωστόσο, για τη βαθύτερη κατανόηση του σχήματος 4.1 απαιτείται η γνώση των συνεισφορών της ενθαλπίας (Δ*H*) και της μεταβολής της εντροπίας (Δ*S*) στο σχηματισμό του συμπλόκου.

Συμβολίζοντας τον υποδοχέα (R), τον προσδέτη (L) και το σύμπλοκό τους (RL), η σχηματική αναπαράσταση του σχήματος 4.1 μπορεί να αποδοθεί με την παρακάτω ισορροπία,

$$R + L \rightleftharpoons RL$$

η σταθερά σύνδεσης ή σχηματισμού της αντίδρασης δίνεται από τη σχέση (4.5)

$$K_{\mathrm{A}} = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad (4.5)$$

και η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs, Δ*G*, σχετίζεται με τη σταθερά σύνδεσης ή σχηματισμού σύμφωνα με τη σχέση (4.6)

$$\Delta G^{\mathrm{o}} = -\mathrm{R}T\ln K_{\mathrm{A}} = \Delta H^{\mathrm{o}} - T\Delta S^{\mathrm{o}} \quad (4.6),$$

όπου R η παγκόσμια σταθερά των ιδανικών αερίων και ίση με R = 8.314 $J \cdot K^{-1} mol^{-1}$ και *T* η απόλυτη θερμοκρασία σε Kelvin (K).

4.3 Μη Θερμιδομετρικός προσδιορισμός της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης

Υπάρχουν διάφορες φυσικοχημικές, μη θερμιδομετρικές τεχνικές για τον άμεσο προσδιορισμό των τιμών των [RL], [R] και [L] με σκοπό των προσδιορισμό της K_A. Ανάμεσα σε αυτές τις τεχνικές βρίσκονται η υπερφυγοκέντρηση, τεχνικές που χρησιμοποιούν ραδιοεπισημασμένους προσδέτες για τη μελέτη σύνδεσης, κ.λπ. Οι φασματοσκοπικές μελέτες, αναφέρονται ως έμμεσες τεχνικές, γιατί μετρούν μια παρατηρήσιμη ποσότητα *O*, της οποίας η μεταβολή είναι ανάλογη του βαθμού κορεσμού σύνδεσης, *Y*, σύμφωνα με τη σχέση (4.7)

$$\Upsilon = \frac{\Delta O_i}{\Delta O_{\max}} = \frac{[RL]}{[R]+[RL]} = \frac{K_{\mathrm{A}}[L]}{1+K_{\mathrm{A}}[L]} \quad (4.7)$$

όπου ΔO_i η μεταβολή ενός σήματος, για παράδειγμα η αλλαγή στο φθορισμό κατά το σχηματισμό του συμπλόκου RL. Αν το *Y* προσδιοριστεί σε διάφορες θερμοκρασίες λαμβάνονται η $K_{\mathrm{A}}(T)$, καθώς επίσης και οι τιμές των Δ*G*, Δ*H* και Δ*S*, όπως θα περιγραφεί στην πορεία.

Συνδυάζοντας τις σχέσεις (4.1) και (4.6) προκύπτει η έκφραση (4.8)

$$\ln\left(\frac{K_{\mathrm{A}}}{T}\right) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4.8)$$

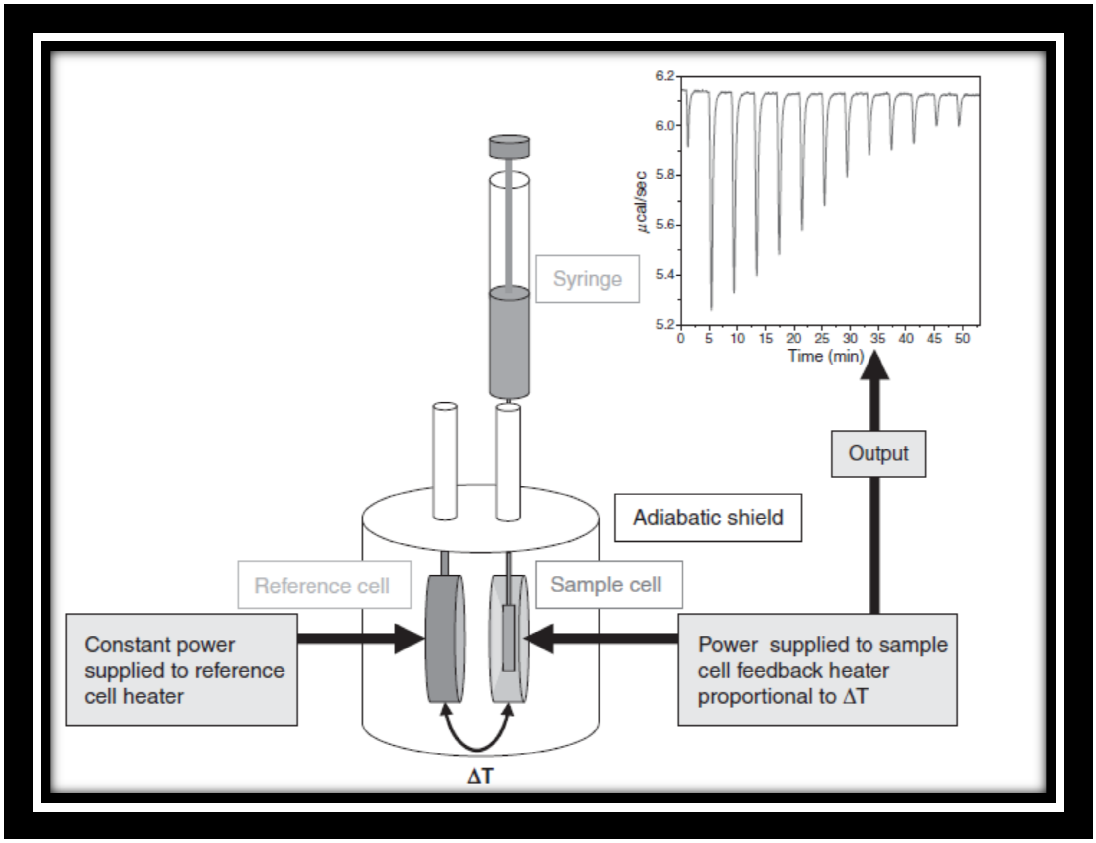
Από το γράφημα της $\ln\left({K_{\mathrm{A}}}/{T}\right)$ σε διάφορες θερμοκρασίες προκύπτει ευθεία γραμμή με κλίση $-{\Delta H}/{R}$ και τομή ίση με ${\Delta S}/{R}$. Από τις ποσότητες αυτές είναι δυνατόν να προσδιοριστεί πειραματικά η ελεύθερη ενέργεια. Εδώ είναι σημαντικό να τονιστεί ότι επειδή τα πειράματα πραγματοποιούνται για συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών, οι τιμές του Δ*G* υπόκεινται σε σφάλματα. Παράδειγμα ενός τέτοιου σφάλματος είναι ο προσδιορισμός της τιμής του Δ*S*, ο οποίος προκύπτει από την προέκταση της ευθείας γραμμής που λαμβάνεται από την εξίσωση (4.8), σε σημεία εκτός πειραματικού εύρους μέχρι $T = \infty$.

4.4 Σύνδεση προσδέτη στη Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης

Η Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης αποτελεί μία από τις δύο μεθόδους, που είναι κατάλληλες για τον άμεσο προσδιορισμό της Δ*H*. Η ITC αποτελεί την πιο άμεση μέθοδο για τη μέτρηση της θερμότητας κατά το σχηματισμό ενός συμπλόκου σε σταθερή θερμοκρασία. Έτσι, με την τιτλοδότηση ενός προσδέτη *L* σε διάλυμα του υποδοχέα *R* προσδιορίζονται η σταθερά σύνδεσης K_{A} καθώς και η στοιχειομετρία του συμπλόκου *n*. Είναι επίσης δυνατός ο προσδιορισμός της ΔS^{o}. Επιπλέον είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ΔC_{P}, της εξίσωσης (4.2), με θερμιδομετρία τιτλοδότησης, με πειράματα που διενεργούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

4.4.1 Περιγραφή του πειράματος της ITC

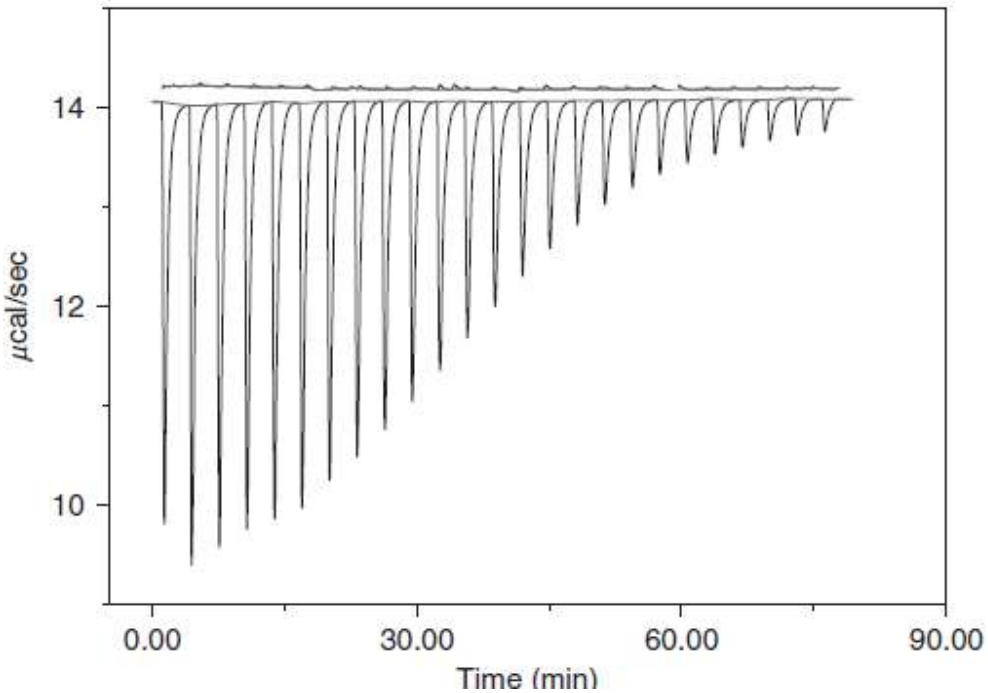
Η τιτλοδότηση του διαλύματος του υποδοχέα *R* με το διάλυμα του προσδέτη *L* πραγματοποιείται στο κελί του δείγματος και σε σταθερή θερμοκρασία (ισοθερμική τιτλοδότηση), όπως φαίνεται στο σχήμα 4.2.[51]



Σχήμα 4.2 Αντιπροσωπευτική αναπαράσταση ενός θερμιδόμετρου ITC. Διακρίνονται τα κελιά του δείγματος (*sample cell*) και αναφοράς (*reference cell*), η σύριγγα (*syringe*) με την οποία προστίθεται ο τιτλοδότης και το αδιαβατικό τοίχωμα (*adiabatic shield*). Το διάγραμμα (output) δείχνει μια υπεραπλούστευση του *πώς* μετράται η θερμότητα, που εκλύεται ή απορροφάται από το όργανο για να διατηρήσει σταθερή τη θερμοκρασία μεταξύ των κελιών του δείγματος και αναφοράς, ως σήμα του οργάνου [Από την Παραπομπή Ν° 51].

Μετά από κάθε προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος προσδέτη *L* στο διάλυμα του υποδοχέα *R*, μετράται η θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται στο κελί του δείγματος σε σχέση με ένα κελί αναφοράς, που είναι γεμάτο με ρυθμιστικό διάλυμα. Το κελί του δείγματος, καθώς και το κελί αναφοράς, είναι τοποθετημένα σε δοχείο με αδιαβατικό περίβλημα. Ο

προσδέτης προστίθεται στο διάλυμα του μακρομορίου με τη χρήση σύριγγας ακριβείας, που οδηγείται από έναν κινητήρα βήματος που ελέγχεται από Η/Υ, ενώ ταυτόχρονα το σχηματιζόμενο διάλυμα αναδεύεται για πιο γρήγορη ανάμιξη των αντιδρώντων. Τέλος, κατά τη σταδιακή προσθήκη του προσδέτη λαμβάνεται το γράφημα του σχήματος 4.3, με κάθε κορυφή να αντιστοιχεί στη θερμότητα που εκλύεται η απορροφάται σε κάθε προσθήκη του προσδέτη στον υποδοχέα.



Σχήμα 4.3 Θερμιδογράφημα στο οποίο φαίνεται η μεταβολή της θερμότητας ως συνάρτηση του χρόνου.

4.4.2 Μαθηματικές σχέσεις που περιγράφουν τη Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης

Η μεταβολή της θερμότητας εκφράζεται ως η ηλεκτρική ισχύς ($J \cdot s^{-1}$) που απαιτείται για τη διατήρηση της σταθερά μικρής διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του κελιού του δείγματος και του κελιού αναφοράς (σχήμα 4.1).[51] Με ολοκλήρωση του διαφορικού σήματος ισχύος ως

προς το χρόνο, προκύπτει η μεταβολή της θερμότητας $\Delta q_{i,app}$ μεταξύ της προσθήκης για *i – 1* και *i,* η οποία δίνεται από τη σχέση (4.9)

$$\Delta q_{i,app} = q_i - q_{i-1} \quad (4.9)$$

Το $\Delta q_{i,app}$ *είναι* ανάλογο της συνολικής ποσότητας του σχηματιζόμενου συμπλόκου $\Delta[RL_i]$ ή $\Delta[L_i]_{\text{bound}}$, του όγκου του θερμιδομετρικού κελιού V_{cell}, καθώς και της παρατηρούμενης ενθαλπίας σύνδεσης ΔH_{app}, όπως φαίνεται στη σχέση (4.10)

$$\Delta q_{i,app} = \Delta q_i + \Delta q_{i,dil} + \Delta q_{i,ns} \quad (4.10) \text{ ή}$$

$$\Delta q_{i,app} = [\Delta L_i]_{\text{bound}} \cdot V_o \cdot \Delta H_{app} \quad (4.11)$$

Αν η K_A είναι μεγάλη επειδή η ποσότητα του προσδέτη *L* στην αρχή της τιτλοδότησης είναι μικρή, τότε στην πραγματικότητα όλος ο προσδέτης είναι συνδεδεμένος στον υποδοχέα και οι επιφάνειες των κορυφών είναι παρόμοιες. Καθώς ο τμηματικός κορεσμός αυξάνεται, το $\Delta q_{i,app}$ σταδιακά ελαττώνεται (σχήμα 4.3). Στο τέλος όλα τα σημεία του υποδοχέα έχουν κορεστεί. Όπως φαίνεται από την εξίσωση (4.10), στην ποσότητα $\Delta q_{i,app}$ εμπεριέχονται μικρές μεταβολές θερμότητας που προκαλούνται από την αραίωση του διαλύματος στο κελί τιτλοδότησης $q_{i,dil}$ και από άλλα μη ειδικά φαινόμενα $q_{i,ns}$.

Για μια αντίδραση στοιχειομετρίας 1:1 (*n*=1), σαν κι αυτή που περιγράφηκε στην §4.2, η ισορροπία σύνδεσης περιγράφεται από τις εξισώσεις (4.12) και (4.13)

$$[L]_{\text{tot}} = [L] + [RL] \quad (4.12)$$

$$[R]_{\text{tot}} = [RL] + [R] = [RL] + \frac{[RL]}{K_A[L]} \quad (4.13)$$

όπως προκύπτει από τη σχέση (4.5).

Αν η εξίσωση (4.12) λυθεί ως προς [*L*] και αντικαθιστώντας στην (4.13) προκύπτει το πολυώνυμο δευτέρου βαθμού (4.14)

$$[RL]^2 + [RL]\left(-[R_{\text{tot}}] - [L_{\text{tot}}] - \frac{1}{K_{\text{A}}}\right) + [R_{\text{tot}}][L_{\text{tot}}] \quad (4.14)$$

με μοναδική λύση την

$$[RL] = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4c}}{2} \quad (4.15)$$

με

$$b = -[L]_{\text{tot}} - [R]_{\text{tot}} - \frac{1}{K_{\text{A}}} \quad (4.16)$$

$$c = [R]_{\text{tot}} \cdot [L]_{\text{tot}} \quad (4.17)$$

Παραγωγίζοντας τη σχέση (4.15) λαμβάνεται η έκφραση (4.18)

$$\frac{d[RL]}{d[L]_{\text{tot}}} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{[L]_r}{2}}{\left\{[L]_r{}^2 - 2[L]_r \cdot (1-r) + \sqrt{(1+r)^2}\right\}} \quad (4.18)$$

όπου $r = {}^{1}/_{(K_{\text{A}} \cdot [R]_{\text{tot}})}$ και $[L]_r = {}^{[L]_{\text{tot}}}/_{[R]_{\text{tot}}}$.

Η αλλαγή στη συγκέντρωση $[RL]$ σχετίζεται με τη μεταβολή της θερμότητας, σύμφωνα με τη σχέση (4.19), όπως προκύπτει από την εξίσωση (4.11)

$$dq = d[RL] \cdot \Delta H^{\text{o}} \cdot V_{\text{o}} \quad (4.19)$$

με ΔH^{o} να συμβολίζει τη μοριακή ενθαλπία σύνδεσης και V_{o} τον όγκο του κελιού.

Αντικαθιστώντας στην εξίσωση (4.18) την εξίσωση (4.19) προκύπτει η τελική εξίσωση (4.20)

$$\boxed{\frac{d(Q)}{d[L]_{tot}} = \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{[L]_r}{2}}{\left\{[L]_r{}^2 - 2[L]_r \cdot (1-r) + \sqrt{(1+r)^2}\right\}}\right] \cdot \Delta H^{\mathrm{o}} \cdot V_{\mathrm{o}} \quad (4.20)}$$

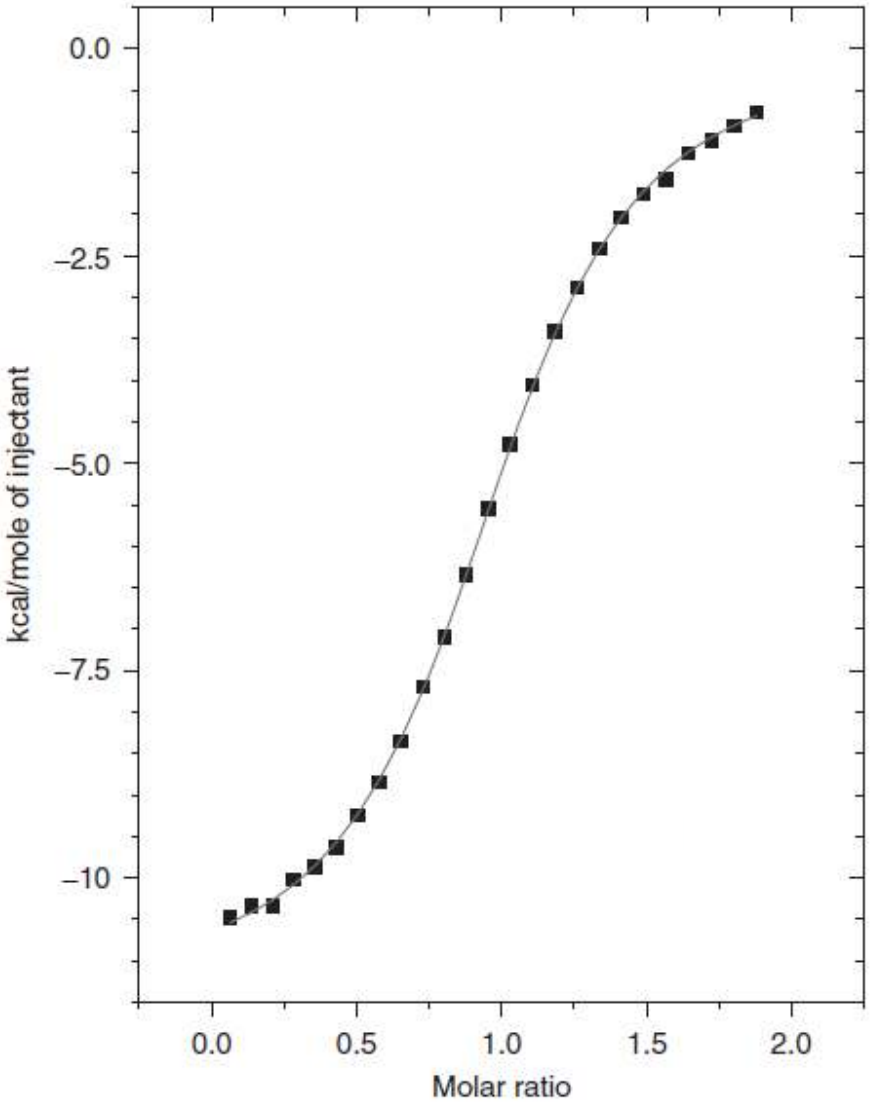
Η εξίσωση (4.20) περιλαμβάνει δυο παραμέτρους χωρίς μονάδες που να εξαρτώνται από την ολική συγκέντρωση του προσδέτη $[L]_{tot}$ και την ολική συγκέντρωση του μακρομορίου $[R_{tot}]$.

$$1/r = c = [R]_{\mathrm{tot}} \cdot K_{\mathrm{A}} \quad (4.21)$$

$$[L_r] = {[L]_{\mathrm{tot}}}/{[R]_{\mathrm{tot}}} \quad (4.22)$$

Η πειραματική παράμετρος που προσδιορίζεται από τη θερμιδομετρία τιτλοδότησης (σχήμα 4.4) είναι η διαφορική θερμότητα ${dq}/{d[L]_{\mathrm{tot}}}$ και δεν εξαρτάται από την απόλυτη τιμή $[R]_{\mathrm{tot}}$, όπως φαίνεται από τις εξισώσεις (4.21) και (4.22), παρά μόνο από την τιμή της σε σχέση με την K_{A} και σε σχέση με την $[L]_{\mathrm{tot}}$.

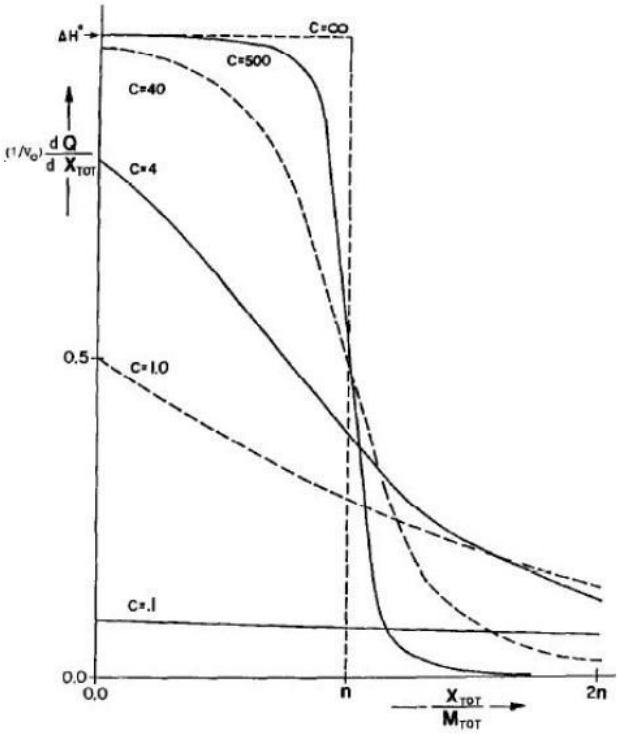
Το σχήμα 4.4 αναπαριστά την «ολοκληρωμένη» (*integrated*) μορφή του γραφήματος του σχήματος 4.3. Και από τις δύο καμπύλες λαμβάνονται τα ΔH, K_{A} και n από ένα πείραμα ITC.



Σχήμα 4.4 «Ολοκληρωμένη» μορφή διαφορικού σήματος ως προς το χρόνο. Τα δεδομένα του γραφήματος αυτού έχουν υποστεί μη-γραμμική προσαρμογή.

Μετά τη λήψη των δεδομένων γίνεται μη-γραμμική προσαρμογή (*non-linear regression*) με συγκεκριμένο μοντέλο σιγμοειδούς καμπύλης τιτλοδότησης, όπως προκύπτει από την εξίσωση (4.20). Έτσι, από την προσαρμογή μπορούν να προσδιοριστούν οι τιμές K_A, ΔH και n από ένα και μόνο πείραμα τιτλοδότησης.

Στο διάγραμμα του σχήματος 4.5 φαίνονται οι καμπύλες τιτλοδότησης, όπως προκύπτουν από την εξίσωση (4.20) για τις διάφορες τιμές των παραμέτρων $d(Q)/d\mathrm{X}_{\mathrm{tot}}$ $\left(\text{ή } dq/d[L]_{\mathrm{tot}}\right)$ και X_r (ή $[L]_r$).



Σχήμα 4.5 Καμπύλες σύνδεσης για τις διάφορες τιμές των παραμέτρων $d(Q)/d\mathrm{X}_{\mathrm{tot}}$ $\left(\text{ή } dq/d[L]_{\mathrm{tot}}\right)$ και X_r (ή $[L]_r$), $c = [R]_{\mathrm{tot}} \cdot K_{\mathrm{A}}$[Από την Παραπομπή N° 115].

Ο υπολογιστής του οργάνου διαθέτει λογισμικό που προσπαθεί να βρει την ιδανική καμπύλη για τα πειραματικά σημεία $d(Q)/d\mathrm{X}_{\mathrm{tot}}$ και X_r της τιτλοδότησης. Για πολύ ισχυρή σύνδεση (c = ∞) όλος ο προσδέτης είναι συνδεδεμένος μέχρι να επέλθει κορεσμός κι έτσι προκύπτει η καμπύλη με μορφή παραλληλογράμμου με ύψος ΔH^{o}. Για μέτριας ισχύος σύνδεση με τιμές c μεταξύ 1 και 1000 το σχήμα των ισόθερμων σύνδεσης είναι πολύ ευαίσθητο σε μικρές αλλαγές του c. Η τομή των καμπυλών αυτών στον άξονα $dq/d[L]_{\mathrm{tot}}$ δεν είναι πλέον ίση

με ΔH^{o}, αλλά η παράμετρος αυτή προκύπτει εύκολα από το συνολικό εμβαδό κάτω από την καμπύλη και το σχήμα της. Για πολύ ασθενή σύνδεση (π.χ. c = 0.1) λαμβάνεται μια οριζόντια γραμμή, από την οποία όπως και με την πολύ ισχυρή σύνδεση, προκύπτει λίγη πληροφορία για την ακριβή τιμή της K_A.

Έτσι, μόνο για τιμές c στην περιοχή 1 – 1000 οι ισόθερμες μπορούν να αναλυθούν ώστε να δώσουν ακριβείς τιμές της σταθεράς σύνδεσης K_A. Είναι φανερό ότι από τη σχέση $c = [R]_{\mathrm{tot}} \cdot K_{\mathrm{A}}$ συνδέσεις πρωτεΐνης – προσδέτη με μεγάλο K_A μπορούν να μελετηθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις $[R]_{\mathrm{tot}}$, ενώ αυτές με μικρό K_A χρειάζονται μεγάλες σχετικά συγκεντρώσεις, ώστε η τιμή $[R]_{\mathrm{tot}} \cdot K_{\mathrm{A}}$ να βρίσκεται εντός του παραθύρου 1 – 1000.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ & ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ

5.1 Εισαγωγή

Το κεφάλαιο αυτό καλύπτει όλο το σχετικό υπόβαθρο γύρω από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD) που χρησιμοποιούνται για την υπολογιστική προσομοίωση ατομικών και μοριακών συστημάτων. Δίνεται έμφαση στο πεδίο εφαρμογής των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, *πότε* και *γιατί* πραγματοποιούνται τέτοιου είδους προσομοιώσεις, *πώς* υπολογίζονται τα πεδία δυνάμεων, *πώς* υπολογίζονται μακροσκοπικές ιδιότητες των συστημάτων που υποβάλλονται σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, καθώς επίσης και στις τεχνικές δειγματοληψίας.

Σκοπός των μοριακών μοντέλων (*molecular modeling*) είναι ο υπολογισμός διαφόρων ιδιοτήτων μοριακών συστημάτων, όπως για παράδειγμα πρωτεϊνών, με τη βοήθεια Η/Υ. Το μέγεθος των συστημάτων αυτών καθώς επίσης και η χρονική κλίμακα κατά την οποία λαμβάνουν χώρα ενδιαφέροντα βιολογικά φαινόμενα είναι απαγορευτικά για την κβαντομηχανική μελέτη τους (QM, *Quantum Mechanics*). Η QM περιγράφει τα ηλεκτρόνια των συστημάτων με αποτέλεσμα να πρέπει να θεωρηθεί ένας τεράστιος αριθμός σωματιδίων για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων. Για την εφικτή υπολογιστική προσομοίωση βιολογικών συστημάτων έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι μεταξύ των οποίων και αυτή της μοριακής δυναμικής.

Η μέθοδος MD χρησιμοποιεί ένα εμπειρικό δυναμικό για τον υπολογισμό της ενέργειας ενός συστήματος, το οποίο βασίζεται μόνο στη θέση των πυρήνων αγνοώντας τα ηλεκτρόνια, τα οποία θεωρούνται ότι κινούνται πολύ γρήγορα σε σχέση με τους πηρήνες και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ότι η κίνησή τους ακολουθεί αυτή των πυρήνων (Born-Oppenheimer approximation). Έτσι, για την περιγραφή της δυναμικής του συστήματος, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής βασίζονται στην κλασική μηχανική και για τον υπολογισμό τους,

ολοκληρώνεται η εξίσωση του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα με βάση ένα εμπειρικό δυναμικό για το σύστημα και δίνοντας αρχικές ταχύτητες στο σύστημα. Παράγονται έτσι πληροφορίες για το σύστημα σε μικροσκοπικό επίπεδο. Στη συνέχεια, οι μικροσκοπικές ιδιότητες συνδέονται με παρατηρούμενες μακροσκοπικές ιδιότητες μέσω της στατιστικής μηχανικής.

Η MD είναι σήμερα μια θεμελιωμένη μέθοδος για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων και έχει αποδειχθεί ότι παρέχει ακριβή αποτελέσματα σε πολλές περιπτώσεις. Η επιτυχία της μεθόδου αυτής βασίζεται στην εγκυρότητα των διαφορετικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αυτή. Η εμπειρική συνάρτηση δυναμικής ενέργειας είναι ένα φυσικό μοντέλο που χρησιμοποιείται για την περιγραφή των ενδο- και δια- μοριακών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των πυρήνων. Ακόμη κι όταν χρησιμοποιούνται απλοί νόμοι για τη συνεισφορά τους στη συνάρτηση της ενέργειας, όπως η περίπτωση του νόμου του Hooke, η περιγραφή των ιδιοτήτων του συστήματος είναι ιδιαίτερα ακριβής. Όλες αυτές οι συναρτήσεις που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της ενέργειας του συστήματος καλούνται «πεδίο δυνάμεων» (*force field*) και θα περιγραφούν στις ενότητες που ακολουθούν.

Τέλος, σημειώνεται ότι η μεγάλη πλειονότητα των πειραματικών τεχνικών μετρούν μοριακές ιδιότητες όχι σε ένα μόνο μόριο, αλλά ως μέσες τιμές σε μακροσκοπικά δείγματα. Αυτές μπορεί να είναι χρονικές μέσες τιμές ή μέσες τιμές συνόλων (*ensembles*) ή και τα δύο.

5.2 Μηχανικό πρότυπο

Η μέθοδος της μοριακής μηχανικής χρησιμοποιεί εξισώσεις της κλασικής μηχανικής για τον υπολογισμό της εσωτερικής ενέργειας μορίου που οφείλεται στην τάσης, κάμψη και περιστροφή των δεσμών. Με την περιγραφή αυτή τα ηλεκτρόνια αγνοούνται, όμως ευνοείται η χρήση απλών εκφράσεων για την περιγραφή της αλληλεπίδρασης ατόμων που δε συνδέονται μέσω δεσμού, οπότε απέχουν τουλάχιστον δύο δεσμούς μεταξύ τους, όπως εκείνων των ελκτικών ή απωστικών δυνάμεων van der Waals και των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την τελική γεωμετρία του μορίου.

Πράγματι, το απλούστερο πρότυπο για την περιγραφή των μορίων είναι τα άτομα να θεωρηθούν ως σφαίρες χαρακτηριστικής ακτίνας και οι δεσμοί μεταξύ τους ως ελατήρια.

Για την απλούστερη περίπτωση εφαρμογής ενός πεδίου δυνάμεων, θεωρείται διατομικό μόριο όπου τα άτομα Α και Β απέχουν απόσταση *r*. Η δυναμική ενέργεια μεταξύ των ατόμων Α και Β ενός διατομικού μορίου είναι συνάρτηση της διαπυρηνικής απόστασης *r*. Ο υπολογισμός της δυναμικής ενέργειας σε ένα τυχαίο σημείο *r*, με το ανάπτυγμα της σειράς Taylor ως προς r_{eq}, γίνεται:

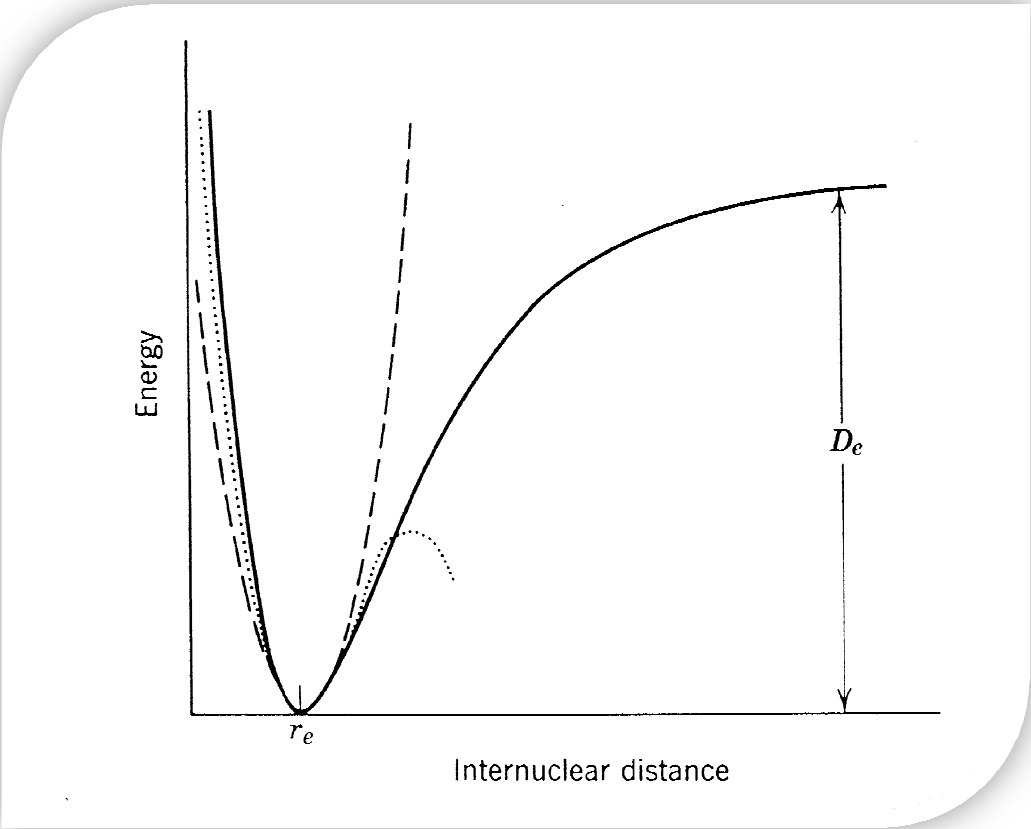
$$U(r) = U(r_{\mathrm{eq}}) + \frac{dU}{dr}|r = r_{\mathrm{eq}}\cdot(r - r_{\mathrm{eq}}) + \frac{d^2U}{2!\,dr^2}|r = r_{\mathrm{eq}}\cdot(r - r_{\mathrm{eq}})^2 + \frac{d^3U}{3!\,dr^3}|r = r_{\mathrm{eq}}\cdot(r - r_{\mathrm{eq}})^3 + \ldots \quad (5.1)$$

όπου r_{eq} το μήκος δεσμού στο ελάχιστο της συνάρτησης (5.1), το οποίο θεωρείται μηδέν, δηλαδή $U(r_{\mathrm{eq}}) = 0$.

Οι δύο πρώτοι όροι είναι μηδενικοί και αν η σειρά (5.1) συμπτυχθεί μετά τον πρώτο μη-μηδενικό όρο, η έκφραση για τη δυναμική ενέργεια γίνεται

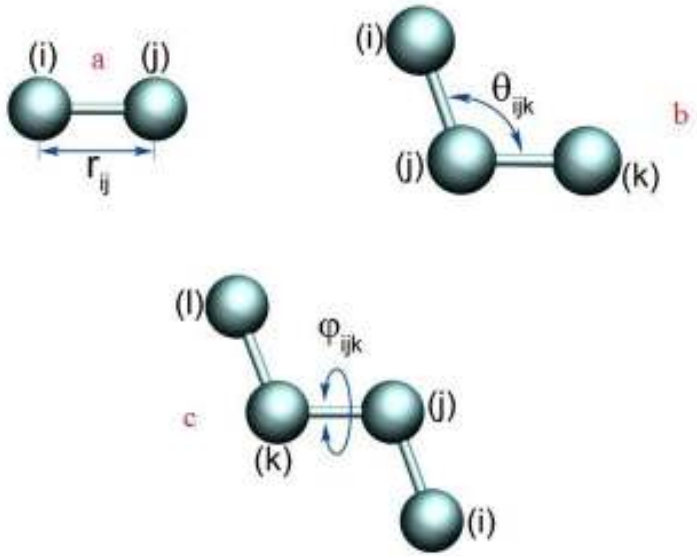
$$U(r) = \frac{1}{2}k_{\mathrm{AB}}\cdot(r_{\mathrm{AB}} - \mathrm{r}_{\mathrm{AB,eq}})^2 \quad (5.2)$$

Η συνάρτηση τάσης δεσμού (5.2) ταυτίζεται με το νόμο του Hooke για ένα ελατήριο, καθώς περιλαμβάνει το γινόμενο της σταθεράς k_{AB} και του τετραγώνου της παραμόρφωσης του μήκους δεσμού (σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.1 Καμπύλη μεταβολής της δυναμικής ενέργειας U(*r*) σε συνάρτηση με τη διαπυρηνική απόσταση και η προσεγγιστική καμπύλη δυναμικού αρμονικού ταλαντωτή με διακεκομμένη γραμμή.

Η γεωμετρία του μορίου, η οποία αντιστοιχεί στο ενεργειακό ελάχιστο, το οποίο καθορίζεται από τα μήκη δεσμών *r*, τις γωνίες δεσμών ϑ και τις δίεδρες γωνίες φ (σχήμα 5.2) είναι διαφορετική από εκείνη της πρότυπης γεωμετρίας ή γεωμετρίας αναφοράς, που καθορίζεται από τις τιμές ισορροπίας των γεωμετρικών στοιχείων του (r_{eq}, ϑ_{eq}, φ_{eq}). Οι τελευταίες τιμές αντιστοιχούν στη γεωμετρία θεμελιώδους κατάστασης μικρών – προτύπων μορίων που προκύπτουν πειραματικά ή από ακριβείς *ab initio* κβαντομηχανικούς υπολογισμούς.



Σχήμα 5.2 Γεωμετρικά στοιχεία τμήματος μορίου, όπου r_{ij} το μήκος δεσμού, θ_{ij} η γωνία δεσμού και ϕ_{ij} η δίεδρη γωνία ή γωνία στροφής του δεσμού k-j.

Γιατί όμως σε ένα μόριο να παρατηρηθεί για παράδειγμα η απόκλιση του μήκους δεσμού μεταξύ δύο ατόμων A και B από την τιμή ισορροπίας $r - r_{eq}$; Σε ένα πολυατομικό μόριο θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλες μορφές μη-δεσμικής αλληλεπίδρασης, όπως για παράδειγμα ηλεκτροστατικές και απωστικές αλληλεπιδράσεις van der Waals μεταξύ ατόμων γειτονικών ομάδων A ··· D, κ.ο.κ. Οι ενέργειες αυτές μπορούν να ωθήσουν τους δεσμούς με τους οποίους συνδέονται τα άτομα να γίνουν μακρύτεροι με σκοπό να αποφευχθεί στερεοχημικός συνωστισμός. Ανάλογες μεταβολές σημειώνονται σε όλα τα γεωμετρικά στοιχεία του μορίου, όμως η απόκλιση από τις τιμές ισορροπίας παρατηρείται κυρίως σε δίεδρες γωνίες –συγκριτικά με τα μήκη και τις γωνίες δεσμών– επειδή οι γωνίες αυτές είναι εύκολο να μεταβληθούν μέσω περιστροφής γύρω από δεσμούς.

Στη δομή χαμηλότερης ενέργειας που προκύπτει, παρατηρείται έτσι η παραμόρφωση γωνιών δεσμού, δίεδρων γωνιών και μηκών δεσμών (*bond strain, angle strain, torsional strain*), δηλαδή η απόκλιση από τις τιμές ισορροπίας r_{eq}, ϑ_{eq}, φ_{eq}. Ως αποτέλεσμα, η αντίστοιχη τιμή της δυναμικής ενέργειας αυξάνεται, όμως οι στερικές ή γενικότερα οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις μειώνονται με αποτέλεσμα την ελάττωση της συνολικής ενέργειας.

Η μέθοδος της μοριακής μηχανικής δεν υπολογίζει την απόλυτη τιμή δυναμικής ενέργειας, αλλά τη διαφορά δυναμικής ενέργειας μεταξύ της γεωμετρίας χαμηλής ενέργειας και της πρότυπης γεωμετρίας. Η ενεργειακή αυτή τιμή ονομάζεται και **ολική στερική ενέργεια** ή **ενέργεια πεδίου δυνάμεων**, U_{MM}.

5.3 Πεδίο δυνάμεων

Η ολική στερική ενέργεια V_{MM} είναι μέτρο της ενδομοριακής τάσης σε σχέση με ένα υποθετικό μόριο με πρότυπη γεωμετρία.

Η V_{MM} μπορεί να υπολογιστεί, όπως φαίνεται από την εξίσωση (5.3), αθροίζοντας τις επιμέρους ενέργειες που απαιτούνται για την παραμόρφωση ή τάση όλων των μήκων δεσμών, γωνιών δεσμών και δίεδρων γωνιών, που συνιστούν την ενέργεια τάσης V_{strain} (*strain energy*) και τις ενέργειες των αλληλεπιδράσεων van der Waals και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των όλων των ατόμων του μορίου, που συνιστούν τη μη δεσμική ενέργεια V_{nb}.

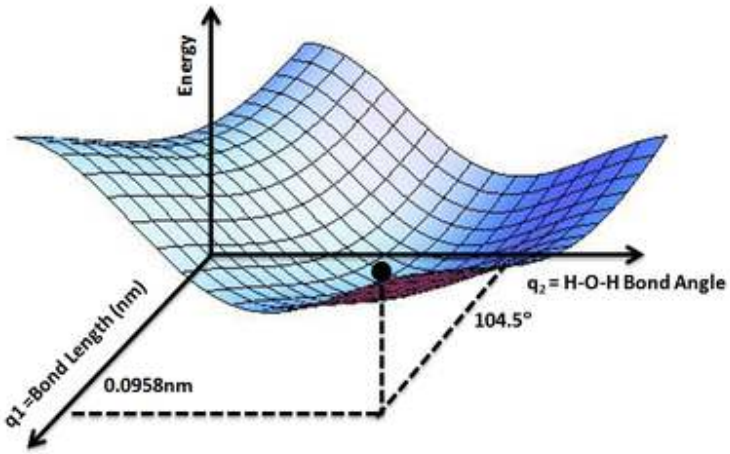
$$V_{\text{MM}} = V_{\text{strain}} + V_{\text{nb}} = \left(V_{\text{strech}} + V_{\text{bend}} + V_{\text{torsn}} + V_{\text{imp}}\right) + \left(V_{\text{vdW}} + V_{\text{el}}\right) + \ldots =$$
$$= \left(\sum_{i}^{r\ \text{bonds}} U_r + \sum_{i}^{s\ \text{angles}} U_\theta + \sum_{i}^{t\ \text{dihedrals}} U_\varphi\right) +$$
$$\sum_{i}^{N\ \text{atoms}} U_{\text{vdW}} + \sum_{i}^{N\ \text{atoms}} U_{\text{el}} + \ldots \qquad (5.3)$$

Για τον υπολογισμό των παραπάνω όρων χρησιμοποιούνται κατάλληλες μαθηματικές εκφράσεις και παράμετροι, όπως για παράδειγμα τιμές ισορροπίας μηκών και γωνιών δεσμών (r_{eq}, ϑ_{eq}, φ_{eq}), δυναμικές σταθερές k, κ.λπ. που συνιστούν το **πεδίο δυνάμεων**.[52,53] Ένα πεδίο δυνάμεων περιλαμβάνει συγκεκριμένους ατομικούς τύπους και παραμέτρους, δηλαδή συγκεκριμένα άτομα και τρόπους σύνδεσης μεταξύ τους, άρα εφαρμόζεται μόνο σε συγκεκριμένες κατηγορίες ενώσεων.

5.4 Επιφάνεια Δυναμικής Ενέργειας

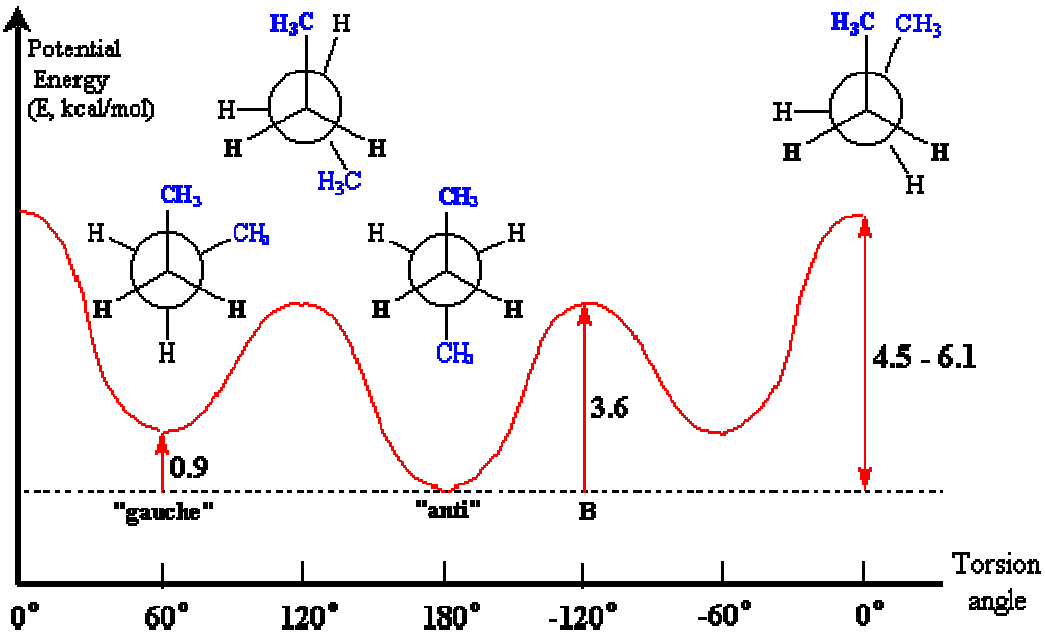
Η Επιφάνεια Δυναμικής Ενέργειας ενός πολυατομικού μορίου είναι μια επιφάνεια 3*M*-6 διαστάσεων, όπου *M*≥3 ο αριθμός των ατόμων, η οποία καθορίζεται από τη δυναμική ενέργεια του συνόλου των ατόμων σε όλες τις δυνατές διευθετήσεις τους. Συνήθως, για την περιγραφή της Επιφάνειας Δυναμικής Ενέργειας επιλέγονται οι 3*M*-6 εσωτερικές συντεταγμένες του μορίου, δηλαδή τα μήκη δεσμών, οι γωνίες δεσμών και οι δίεδρες γωνίες.

Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού μεταβλητών που απαιτούνται για την απεικόνιση των πολυατομικών μορίων είναι πολλές φορές αδύνατη η απεικόνιση της πλήρους PES. Στο σχήμα 5.3 φαίνεται το διάγραμμα της PES για το μόριο του νερού σε συνάρτηση δύο γεωμετρικών παραμέτρων, το μήκος δεσμού q_1 και τη γωνία δεσμού q_2. Το χαμηλότερο σημείο σε μια τέτοια επιφάνεια δυναμικής ενέργειας θα ορίζει και την ενεργειακά σταθερότερη δομή του μορίου νερού.



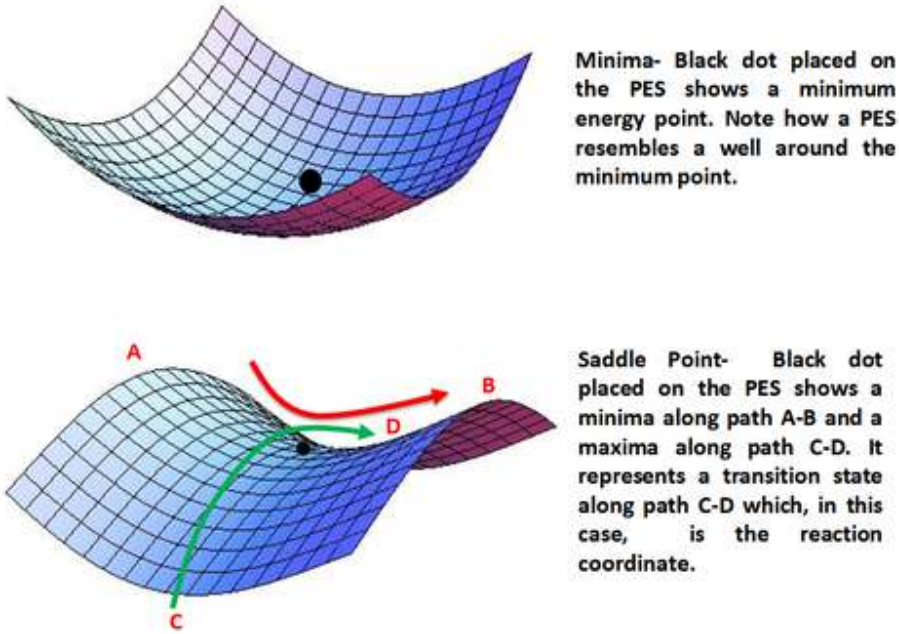
Σχήμα 5.3 Διάγραμμα PES για το μόριο του νερού. Απεικονίζεται το ενεργειακό ελάχιστο που αντιστοιχεί στη βελτιωμένη δομή του νερού με μήκος δεσμού 0.0598 nm και γωνία δεσμού 104.5^{o}.

Η Επιφάνεια Δυναμικής Ενέργειας περιλαμβάνει ακρότατα σημεία – μέγιστα και ελάχιστα – και σημεία καμπής (σχήματα 5.4, 5.5). Το ελάχιστο με τη χαμηλότερη ενέργεια ονομάζεται ολικό ελάχιστο, ενώ τα υπόλοιπα είναι τοπικά ελάχιστα.



Σχήμα 5.4 Καμπύλη δυναμικής ενέργειας του n-βουτανίου ως συνάρτησης της γωνίας στροφής. Διακρίνονται δύο τοπικά ελάχιστα και ένα ολικό.

Ένα σημείο καμπής στην απλούστερη περίπτωση είναι μέγιστο σε μία διάσταση και ελάχιστο στην άλλη, βλ. σχήμα 5.5. Από πλευράς χημείας, τα σημεία καμπής αποτελούν πολλές φορές τα ελάχιστα ενεργειακά φράγματα που συνδέουν τοπικά ελάχιστα μεταξύ τους, δηλαδή ταυτίζονται με μεταβατικές καταστάσεις.



Σχήμα 5.5 Η μαύρη τελεία που βρίσκεται στην PES απεικονίζει ένα ελάχιστο στο μονοπάτι A-B και ένα μέγιστο στο μονοπάτι C-D. Αντιπροσωπεύει μια μεταβατική κατάσταση κατά το μονοπάτι C-D, το οποίο στην περίπτωση αυτή.

5.5 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας ή Βελτιστοποίηση Γεωμετρίας

Στους υπολογισμούς Μοριακής Μηχανικής παράγεται μια αρχική μοριακή γεωμετρία $\mathbf{q}^{(k)}$, στην οποία τα μήκη δεσμών, οι γωνίες δεσμών καθώς και οι δίεδρες γωνίες λαμβάνουν τις τιμές r_{eq}, ϑ_{eq}, φ_{eq}, από τη βάση δεδομένων του πεδίου δυνάμεων. Για αυτήν τη δομή **A** και για οποιαδήποτε άλλη μπορεί να υπολογιστεί μια τιμή στερικής ενέργειας U_{MM} σύμφωνα με την εξίσωση (5.3), με εφαρμογή των εξισώσεων που περιγράφουν τις συνιστώσες της. Για το σημείο A η τιμή της U_{strain} είναι μηδενική, αλλά ο όρος U_{nb} είναι συνήθως πολύ μεγάλος λόγω των έντονων μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων.

Η μεταβολή των 3M-6 εσωτερικών συντεταγμένων (r, ϑ, φ) είναι επιθυμητή ώστε να προκύψει το τοπικό ελάχιστο **M**, στο οποίο ενώ θα αυξηθεί η U_{strain}, ο όρος των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων U_{nb} θα ελαττωθεί τόσο ώστε να επέλθει ελαχιστοποίηση της U_{MM}.

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας ή η βελτιστοποίηση της γεωμετρίας πραγματοποιείται με χρήση κατάλληλων αλγορίθμων. Ο αλγόριθμος ελαχιστοποίησης της ενέργειας μεταβάλλει

τις συντεταγμένες του μορίου και η U_{MM} υπολογίζεται εκ νέου για κάθε τροποποίηση. Η τροποποίηση των συντεταγμένων γίνεται προς την κατεύθυνση της ελαχιστοποίησης της ενέργειας U_{MM}. Με αυτές τις τροποποιήσεις πραγματοποιούνται μικρές μεταβολές των δίεδρων γωνιών καθώς και μήκη και γωνίες δεσμών, που οδηγούν σε σταδιακή μείωση της ενέργειας.

Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης οδηγούν στην εύρεση των τοπικών ακρότατων της PES. Για αυτό εξετάζεται το διάνυσμα $\vec{\mathbf{g}}$ ή grad$U$, που για το σημείο k δίνεται από την εξίσωση (5.4).

$$\vec{\mathbf{g}}^{(k)} = \begin{pmatrix} \dfrac{\partial U^{(k)}}{\partial q_1^{(k)}} \\ \dfrac{\partial U^{(k)}}{\partial q_2^{(k)}} \\ \vdots \\ \dfrac{\partial U^{(k)}}{\partial q_n^{(k)}} \end{pmatrix} \text{ ή}$$

$$\mathrm{grad}U^{(k)} = \frac{\partial U^{(k)}}{\partial q_1^{(k)}}\mathbf{e}_1 + \frac{\partial U^{(k)}}{\partial q_2^{(k)}}\mathbf{e}_2 + \cdots + \frac{\partial U^{(k)}}{\partial q_n^{(k)}}\mathbf{e}_n \quad (5.4)$$

όπου q_i οι 3M-6 συντεταγμένες ή οι 3M καρτεσιανές συντεταγμένες.

Σε ακρότατο $\mathbf{q}^{(k)}$ η πρώτη παράγωγος ως προς κάθε συντεταγμένη $\dfrac{\partial U^{(k)}}{\partial q_n^{(k)}}$ είναι μηδέν, οπότε και το διάνυσμα είναι μηδενικό.

Η βελτιστοποίηση της γεωμετρίας γίνεται αρχικά με έναν αλγόριθμο πρώτης παραγώγου που μελετά την κλίση της καμπύλης της δυναμικής ενέργειας. Όταν η ενέργεια δε μειώνεται περαιτέρω, δηλαδή η ενέργεια συγκλίνει σε μία τιμή, η δομή αντιστοιχεί σε ένα ακρότατο. Αν με την εφαρμογή ενός αλγόριθμου δεύτερης παραγώγου, ο οποίος μελετά την κυρτότητα της καμπύλης δυναμικής ενέργειας, υπάρχει σύγκλιση σε μία τιμή, τότε η

μελετώμενη διαμόρφωση αντιστοιχεί σε τοπικό ελάχιστο ή σημείο καμπής. Για τη διάκριση από τα σημεία καμπής θα πρέπει να μελετηθούν τα πρόσημα όλων των $\frac{\partial^2 U^{(k+1)}}{\partial q_i \partial q_j^{(k+1)}}$.

5.6 Χώρος φάσης και τροχιά

Σύμφωνα με την κλασική μηχανική, η κατάσταση ενός συστήματος μπορεί να προσδιοριστεί πλήρως αν είναι γνωστές οι τρεις συντεταγμένες θέσης και οι τρεις συνιστώσες της ορμής για καθένα από τα *N* σωμάτιδιά του. Αν ένα μοριακό σύστημα αποτελείται από *N* άτομα, ο χώρος των 6*N* μεταβλητών χαρακτηρίζεται ως **χώρος φάσης** του μοριακού συστήματος. Ένα σημείο **X** αυτού του χώρου περιγράφει τη μικροσκοπική η μηχανική κατάσταση του συστήματος σε μια τυχαία χρονική στιγμή, όπως εκφράζει η εξίσωση (5.5)

$$(\mathbf{X})(t) = (\mathbf{q}(t), \mathbf{p}(t)) \qquad (5.5)$$

$$\mathbf{q} = (x_1, y_1,\ z_1, \dots, x_N, y_N, z_N),\ \ \mathbf{p} = \left(p_{x,1}, p_{x,1},\ p_{x,1}, \dots, p_{x,N}, p_{x,N},\ \ p_{x,N}\right) \qquad (5.6)$$

Με την πάροδο του χρόνου και σε δεδομένη θερμοδυναμική κατάσταση, ένα μόριο ή οποιοδήποτε δυναμικό σύστημα, διατρέχει στο χώρο φάσης μια αλληλουχία διαφορετικών σημείων ή στιγμιότυπων ή απεικονίσεων $\mathbf{X}_i(\mathbf{q}_i,\mathbf{p}_i)$ ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των *N* ατόμων. Το σύνολο αυτών των σημείων συνιστούν μια τροχιά στο χώρο φάσης. Τα σημεία αυτά αποτελούν επίσης μέρος ενός συγκεκριμένου στατιστικού συνόλου (*ensemble*) που χαρακτηρίζεται από καθορισμένες θερμοδυναμικές συνθήκες και αποτελεί υποσύνολο του χώρου φάσης. Για παράδειγμα, το σύνολο των απεικονίσεων $\mathbf{X}_i(\mathbf{q}_i,\mathbf{p}_i)$ ενός συστήματος σε θερμοδυναμικές συνθήκες σταθερού αριθμού ατόμων *N*, όγκου *V* και θερμοκρασίας *T*, ονομάζεται στατιστικό σύνολο *NVT* ή κανονικό στατιστικό σύνολο.

5.7 Υπολογισμός απλών θερμοδυναμικών ιδιοτήτων

Οι προσομοιώσεις δίνουν τη δυνατότητα υπολογισμού μιας πληθώρας ιδιοτήτων, όπως για παράδειγμα της ενέργειας, της πίεσης, της θερμοκρασίας, κ.λπ. Η σύγκριση μεταξύ

πειραματικών και υπολογιστικών τιμών για τις ιδιότητες αυτές είναι ένας σημαντικός τρόπος ελέγχου ακρίβειας των αποτελεσμάτων που παράγονται από τις προσομοιώσεις. Από το παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι μέσω των προσομοιώσεων μπορούν να υπολογιστούν θερμοδυναμικές ιδιότητες για συστήματα που δεν υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα ή είναι δύσκολο να μετρηθούν. Στη συνέχεια παρατίθενται οι εξισώσεις υπολογισμού για ιδιότητες που προσδιορίζονται σε ένα κανονικό στατιστικό σύνολο. Η μετατροπή σε ένα άλλο στατιστικό σύνολο είναι πάντα εφικτή μόνο στο όριο ενός απείρως μεγάλου συστήματος.

Α) *Ενέργεια*: Σύμφωνα με την εξίσωση (5.7), η εσωτερική ενέργεια ενός συστήματος προσδιορίζεται ως μέσος όρος συνόλου των ενεργειών των *M* απεικονίσεων που εξετάζονται κατά την προσομοίωση

$$U = \langle E \rangle = \frac{1}{M}\sum_{i}^{M} E_i \quad (5.7)$$

Β) *Πίεση*: Ο προσδιορισμός της πίεσης βασίζεται στο Θεώρημα Clausius και αποδεικνύεται ότι για ένα υγρό ή αέριο σύστημα *N* σωματιδίων, η πίεση *P* δίνεται από την εξίσωση (5.8)

$$P = \frac{1}{V}\left[N k_B T - \frac{1}{3}\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=i+1}^{N} r_{ij}F_{ij} \quad (5.8)\right]$$

Η εξίσωση (5.8) μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον υπολογισμό της πίεσης σε μια προσομοίωση, ενώ οι δυνάμεις υπολογίζονται σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής.

Γ) *Θερμοκρασία*: Σε ένα κανονικό στατιστικό σύνολο *NVT* η θερμοκρασία είναι σταθερή, ενώ σε ένα στατιστικό σύνολο *NVE* κυμαίνεται. Ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας βασίζεται στον υπολογισμό της κινητικής ενέργειας, με την οποία σχετίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (5.9)

$$\sum_{I=1}^{N} \frac{|p_i(t)|^2}{2m_i} = \frac{k_B T}{2}(3N - N_C) \quad (5.9)$$

όπου $\mathbf{p}_i$ και m_i η συνολική ορμή και η μάζα του σωματίου *i*.

Σύμφωνα με το Θεώρημα Ισοκατανομής της Ενέργειας κάθε βαθμός ελευθερίας συνεισφέρει $\frac{k_B T}{2}$. Για *N* σωμάτια, καθένα από τα οποία έχει τρεις βαθμούς ελευθερίας, η κινητική ενέργεια θα είναι ίση με $\frac{3Nk_B T}{2}$. Αν N_c ο αριθμός των τυχόν παρεμποδισμένων βαθμών ελευθερίας, τότε ο συνολικός αριθμός των βαθμών ελευθερίας είναι $(3N - N_C)$ και επειδή η συνολική ορμή του συστήματος εξαναγκάζεται να είναι μηδενική, τότε N_C θα είναι τουλάχιστον 3.

Δ) *Θερμοχωρητικότητα*: Από την παρακολούθηση της θερμοχωρητικότητας συναρτήσει της θερμοκρασίας μπορούν να εντοπιστούν μεταπτώσεις φάσης. Επιπλέον, ο υπολογισμός της θερμοχωρητικότητας επιτρέπει τη σύγκριση με τα πειραματικά δεδομένα, ώστε να ελεγχθεί το πειραματικό μοντέλο στο οποίο βασίζεται το πρωτόκολλο προσομοίωσης. Η θερμοχωρητικότητα ορίζεται από την εξίσωση (5.10)

$$C_V = \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_V \quad (5.10)$$

Ένας από τους τρόπους υπολογισμού της θερμοχωρητικότητας είναι η πραγματοποίηση μιας σειράς προσομοιώσεων σε διαφορετικές θερμοκρασίες και στη συνέχεια ο προσδιορισμός του διαφορικού της εσωτερικής ενέργειας προς τη θερμοκρασία. Η παραγώγιση μπορεί να γίνει αριθμητικά ή αφού προσαρμοστούν τα δεδομένα σε ένα πολυώνυμο να γίνει η παραγώγιση αναλυτικά στην εξίσωση προσαρμογής.

Αποδεικνύεται ακόμη ότι η θερμοχωρητικότητα μπορεί να υπολογιστεί αν αποθηκεύονται οι στιγμιαίες διακυμάνσεις της ενέργειας $\langle E \rangle$ κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, σύμφωνα με την εξίσωση (5.11)

$$C_V = \frac{\langle E^2 \rangle - \langle E \rangle^2}{k_\mathrm{B} T^2} \quad (5.11)$$

5.8 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής συλλέγουν καταστάσεις χαμηλής ενέργειας, από το χώρο φάσης κοντά στην κατάσταση ισορροπίας του συστήματος ενώ αντίθετα καταστάσεις υψηλής ενέργειας σπάνια συλλέγονται αφού έχουν μικρό συντελεστή Boltzmann. Ενώ όμως οι καταστάσεις υψηλής ενέργειας δεν είναι τόσο σημαντικές στον υπολογισμό της εσωτερικής ενέργειας που δίνεται από το παρακάτω ολοκλήρωμα

$$U = \langle U \rangle = \iint E(\mathbf{q}, \mathbf{p}) P\,(\mathbf{q}, \mathbf{p}) d\mathbf{q} d\mathbf{p} \quad (5.12)$$

είναι πολύ σημαντικές στον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας εξαιτίας της εκθετικής μορφής της ενέργειας στην ολοκληρωτέα ποσότητα παρά το γεγονός του χαμηλου συντελεστή Boltzmann για τις περιοχές υψηλής ενέργειας

$$A = \langle A \rangle = k_\mathrm{B} T \ln \iint \exp\left[\frac{E(\mathbf{q}, \mathbf{p})}{k_\mathrm{B} T}\right] P\,(\mathbf{q}, \mathbf{p}) d\mathbf{q} d\mathbf{p} = k_\mathrm{B} T \ln \langle \exp\left[\frac{E(\mathbf{q}, \mathbf{p})}{k_\mathrm{B} T}\right] \rangle \quad (5.13)$$

όπου *U* η εσωτερική ενέργεια και *A* η ελεύθερη ενέργεια κατά Helmholtz του συστήματος.

Οι προσομοιώσεις αυτές προσεγγίζουν με ακρίβεια ιδιότητες όπως η εσωτερική ενέργεια, η θερμοχωρητικότητα, κ.λπ. Ο υπολογισμός των ιδιοτήτων αυτών αποτελεί υπόθεση ρουτίνας για τις προσομοιώσεις MD, σε αντίθεση με ιδιότητες όπως της ελεύθερης ενέργειας ή της εντροπίας που απαιτείται εφαρμογή ιδιαίτερων τεχνικών.

Η μέθοδος της MD χρησιμοποιεί το δεύτερο νόμο του Νεύτωνα, βλ. εξίσωση (5.14). Όπως φαίνεται και από την εξισώσεις (5.15) και (5.16), η μάζα κάθε ατόμου *i* συσχετίζεται με την επιτάχυνση του μοριακού συστήματος *N* ατόμων.

$$m_i \boldsymbol{\alpha}_i = \mathbf{F}_i(t) = \sum_{i \neq j}^{M} \mathbf{F}_j \quad (5.14)$$

$$\frac{d\mathbf{p}_i(t)}{dt} = \frac{\partial V(\boldsymbol{r}_i, \dots, \mathbf{r}_M)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (5.15) \quad \text{ή} \quad \frac{d^2\mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = -\frac{1}{m_i}\frac{\partial V(\boldsymbol{r}_i, \dots, \mathbf{r}_M)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (5.16)$$

Η ολοκλήρωση των εξισώσεων του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα για κάθε άτομο παράγει μια ομάδα διαδοχικών ταχυτήτων και συντεταγμένων θέσης, οι οποίες περιγράφουν τις ατομικές κινήσεις με την πάροδο του χρόνου ή αλλιώς την τροχιά του μοριακού συστήματος. Οι φυσικές συνθήκες των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής είναι το στατιστικό σύνολο *NVE*, οπότε η δειγματοληψία του χώρου φάσης γίνεται υπό σταθερή ενέργεια. Με την κατάλληλη όμως εφαρμογή θερμοστατών, οι προσομοιώσεις πραγματοποιούνται σε άλλα στατιστικά σύνολα όπως *NPT*, *NVT*.

Στην απλή περίπτωση του μονοδιάστατου αρμονικού ταλαντωτή, η αρχική απομάκρυνση και ορμή αντίστοιχα είναι $r(t_0) = b$ και $p(t_0) = 0$. Οι εξισώσεις κίνησης μετά την ολοκλήρωση δίνουν τις εξισώσεις (5.17), (5.18) και (5.19), με την επιτάχυνση α να ισούται με $\alpha = -{kr}/{m}$ και τη δυναμική ενέργεια V να δίνεται από τη συνάρτηση $V(r) = \frac{1}{2}kr^2$.

$$m\frac{d^2r}{dt^2} = -kr \qquad \text{ή} \qquad m\frac{d^2r}{dt^2} + kr = 0 \quad (5.17)$$

$$r(t) = b\cos\left(\sqrt{\frac{k}{m}}t\right) \quad (5.18)$$

$$p(t) = m\frac{dr(t)}{dt} = -A\sqrt{mk}\sin\left(\sqrt{\frac{k}{m}}t\right) \quad (5.19)$$

Για πολυπλοκότερα συστήματα του αρμονικού ταλαντωτή, αναλυτικές εκφράσεις για τη θέση και την ορμή συναρτήσει του χρόνου δύσκολα μπορούν να γραφούν.

Στα πιο ρεαλιστικά συστήματα διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, η δύναμη σε κάθε σωμάτιο αλλάζει κάθε φορά που το σωμάτιο αλλάζει θέση ή κάθε φορά που αλλάζει η θέση των άλλων σωματίων με τα οποία αλληλεπιδρά. Η ολοκλήρωση του δεύτερου νόμου του

Νεύτωνα για κάθε σωμάτιο *i* ενός μοριακού συστήματος *N* ατόμων περιγράφεται με τον πιο απλό τρόπο από τις σχέσεις (5.20) και (5.21)

$$\mathbf{p}_i(t_i) = \mathbf{p}_i(t_0) + \int_{t_0}^{t_i} \boldsymbol{\alpha}_i(t)dt \quad (5.20)$$

$$\mathbf{q}_i(t_i) = \mathbf{q}_i(t_0) + \int_{t_0}^{t_i} \frac{\mathbf{q}_i(t)}{m} dt \quad (5.21)$$

$$\text{και } \boldsymbol{\alpha}_i(t) = - - \frac{1}{m_i} \frac{\partial V(\mathbf{r}_i, \ldots, \mathbf{r}_M)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (5.22)$$

Στόχος της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής[54,55] είναι η αριθμητική ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα, δηλαδή ο υπολογισμός της θέσης και της ορμής του συστήματος (ή της τροχιάς) των *N* ατόμων μετά από χρόνο Δ*t*, αν είναι γνωστές οι προηγούμενες τιμές **q**(*t*), **p**(*t*) και η επιτάχυνση **α**(*t*), σύμφωνα με τις εξισώσεις (5.23) και (5.24)

$$\mathbf{q}(t + \Delta t) = f\big(\mathbf{q}(t), \boldsymbol{\alpha}(t)\big) \quad (5.23)$$

$$\mathbf{p}(t + \Delta t) = f\big(\mathbf{p}(t), \boldsymbol{\alpha}(t)\big) \quad (5.24)$$

Επειδή το δυναμικό είναι συνεχές, οι εξισώσεις της κίνησης απαιτείται να ολοκληρώνονται κατακερματίζοντας τον υπολογισμό σε σειρές πολύ μικρών βημάτων χρόνου. Υπολογίζεται η συνολική δύναμη σε κάθε άτομο στην απεικόνιση στον χρόνο *t* ως διανυσματικό άθροισμα από τις αλληλεπιδράσεις με άλλα άτομα. Από τις δυνάμεις υπολογίζονται οι επιταχύνσεις στα άτομα και μαζί με τα δεδομένα των τρέχουσων θέσεων και ταχυτήτων σε χρόνο *t* παράγονται οι νέες θέσεις και ταχύτητες σε χρόνο *t*+Δ*t*. Η δύναμη σε κάθε χρονικό διάστημα Δ*t* θεωρείται σταθερή. Οι δυνάμεις υπολογίζονται στις νέες θέσεις, οι οποίες παράγουν τις νέες τιμές θέσεων και ταχυτήτων σε χρόνο *t*+2Δ*t,* κ.ο.κ. Η προσομοίωση MD παράγει την τροχιά του μοριακού συστήματος σε κάποια επιλεγμένη θερμοκρασία *T* και για ικανοποιητικό χρόνο, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας ικανοποιητικός αριθμός απεικονίσεων.

Από την τροχιά που παράγεται υπολογίζονται χρονικές μέσες τιμές ιδιοτήτων, σύμφωνα με την έκφραση (5.25)

$$\langle A \rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^{M} A(\mathbf{q}_i, \mathbf{p}_i) \quad (5.25)$$

όπου *M* ο αριθμός των βημάτων.

5.8.1 Προετοιμασία και εκτέλεση προσομοίωσης μοριακής δυναμικής

Για την εκτέλεση της προσομοίωσης MD πρέπει να αποδοθεί στο σύστημα μια αρχική απεικόνιση σε συνθήκες μικροκανονικού συνόλου *NVE*. Οι αρχικές θέσεις $\mathbf{q}_i(t)$ λαμβάνονται από μια δομή που έχει προσδιοριστεί πειραματικά σε στερεά κατάσταση (κρυσταλλογραφία ακτίνων X) ή σε διάλυμα (φασματοσκοπία NMR) ή από ένα τοπικό ελάχιστο που προέκυψε από μια ελαχιστοποίηση ενέργειας χρησιμοποιώντας κάποιον κατάλληλο αλγόριθμο ελαχιστοποίησης και μια υπολογιστική μέθοδο.

Οι αρχικές ορμές $\mathbf{p}_i(t)$ στη συγκεκριμένη θερμοκρασία *T* αποδίδονται τυχαία σε κάθε άτομο, σύμφωνα με την κατανομή μοριακών ταχυτήτων Maxwell-Boltzmann, που δίνει την πιθανότητα $f(\mathbf{v}_{i,x})$ ένα άτομο *i* να έχει την ορμή $p_{i,x}$ στη διεύθυνση *x* στη θερμοκρασία *T*, σύμφωνα με την εξίσωση (5.26)

$$f(\mathbf{v}_{i,x}) = \left(\frac{m_{\boldsymbol{i}}}{2\pi k_{\mathrm{B}} T}\right)^{1/2} \cdot \exp\left[-\frac{m_{\mathrm{i}} \left|\mathbf{v}_{i,x}\right|^2}{2k_{\mathrm{B}} T}\right] \quad (5.26)$$

Είναι κοινή τακτική οι ταχύτητες να ρυθμίζονται ώστε η συνολική ορμή του συστήματος να είναι μηδενική, οπότε η προσομοίωση δειγματίζει απεικονίσεις από ένα σύνολο *NVE**p***. Για προσομοιώσεις υπό κενό, η συνολική ορμή και στροφορμή είναι σταθερή, οπότε μπορούν να επιλεγούν αρχικά μηδενικές και να διατηρούνται έτσι καθώς το σύστημα θα διαδίδεται ενώ υπό περιοδικές συνοριακές συνθήκες (§5.9.1), διατηρείται μόνο η συνολική ορμή και μπορεί να επιλεγεί μηδενική.

Ενώ η ολική θερμοκρασία είναι σταθερή σε ένα κανονικό στατιστικό σύνολο *NVT*, σε ένα μικροκανονικό στατιστικό σύνολο παρουσιάζει διακυμάνσεις. Η εξίσωση (5.27) εκφράζει τη θερμοκρασία *T* σε όρους μέσης κινητικής ενέργειας του συστήματος στο μικροκανονικό στατιστικό σύνολο

$$\sum_{i=1}^{N} \frac{|\mathbf{p}_i(t)|^2}{2m_i} = \frac{k_\mathrm{B}T}{2}(3N - N_c) \quad \text{ή} \quad T(t) = \frac{2}{(3N - N_c)k_\mathrm{B}} \cdot \sum_{i=1}^{N} \frac{|\mathbf{p}_i(t)|^2}{m_i} \quad (5.27)$$

όπου $\mathbf{p}_i$ η συνολική ορμή του σωματίου *i* μάζας m_i και $3N - N_c$ ο συνολικός αριθμός των βαθμών ελευθερίας (εξίσωση (5.9)). Επειδή συνήθως η ορμή «εξαναγκάζεται» να είναι μηδενική, συνήθως είναι $N_c = 3$, επειδή απαλείφονται τρεις βαθμοί ελευθερίας. Για προσομοιώσεις υπό κενό μπορούν να αφαιρεθούν 6 βαθμοί ελευθερίας εφόσον διατηρείται και η συνολική στροφορμή, ενώ για περιοδικές οριακές συνθήκες, βλ. §5.9.1, διατηρείται μόνον η συνολική ορμή σταθερή. Σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής μπορούν να αφαιρεθούν και άλλοι βαθμοί ελευθερίας.

Διαφορίζοντας την εξίσωση (5.22), σε κάθε σημείο *t*, *t*+Δ*t* υπολογίζεται η επιτάχυνση $\boldsymbol{\alpha}_i$ ή η συνολική δύναμη $\mathbf{F}_i$ που δρα σε κάθε άτομο από την αλληλεπίδρασή του με άλλα άτομα. Με τη μέθοδο της μοριακής μηχανικής, δηλαδή την εφαρμογή ενός πεδίου δυνάμεων είναι δυνατοί οι υπολογισμοί αυτοί, οπότε η δύναμη σε ένα άτομο περιλαμβάνει συνεισφορές από όρους όπως η τάση δεσμών, γωνιών δεσμών, δίεδρων γωνιών και μη-δεσμικών αλληλεπιδράσεων. Μέσω του κανόνα της αλυσίδας πραγματοποιείται η μετατροπή των παραγώγων που περιλαμβάνουν τους παραπάνω όρους από τις εσωτερικές συντεταγμένες σε καρτεσιανές για να χρησιμοποιηθούν από τη MD. Η δύναμη μεταξύ δύο ατόμων υπολογίζεται μόνο μια φορά.

Μετά την προετοιμασία του συστήματος μπορεί να αρχίσει η προσομοίωση που έχει ως βασικά στάδια τη φάση εξισορρόπησης και παραγωγής.

Αρχικά, το πρώτο στάδιο μιας προσομοίωσης MD είναι η φάση εξισορρόπησης που έχει ως σκοπό να φέρει το σύστημα σε ισορροπία ξεκινώντας από την αρχική δομή. Κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης παρακολουθούνται διάφοροι παράμετροι μαζί με τις

απεικονίσεις. Όταν αυτές οι παράμετροι αποκτήσουν σταθερές τιμές, τότε μπορεί να αρχίσει η φάση παραγωγής κατά την οποία υπολογίζονται οι θερμοδυναμικές ιδιότητες και άλλα δεδομένα. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για να χαρακτηριστεί πότε το σύστημα έχει φθάσει σε ισορροπία εξαρτώνται σε κάποιο βαθμό από το σύστημα που προσομοιώνεται, αλλά γενικά περιλαμβάνουν την κινητική, δυναμική και ολική ενέργεια, τις ταχύτητες, τη θερμοκρασία και την πίεση.

Όπως αναφέρθηκε, η κινητική και δυναμική ενέργεια κυμαίνονται σε ένα μικροκανονικό στατιστικό σύνολο, αλλά η ολική ενέργεια παραμένει σταθερή. Οι συνιστώσες των ταχυτήτων περιγράφονται από μια κατανομή Maxwell-Boltzmann και η κινητική ενέργεια κατανέμεται ισοδύναμα και στις τρεις διευθύνσεις *x, y* και *z* (Θεώρημα Κατανομής Ενέργειας). Είναι επιθυμητό η φάση εξισορρόπησης να πραγματοποιείται υπό σταθερή θερμοκρασία, π.χ. στο στατιστικό σύνολο NVT μπορεί να ρυθμίζεται η θερμοκρασία μέσω των ταχυτήτων, βλ. εξίσωση (5.27). Κατά τη διάρκεια της παραγωγής η θερμοκρασία μπορεί και να είναι μεταβλητή του συστήματος. Για παράδειγμα, όταν είναι επιθυμητή η προσομοίωση MD μιας πρωτεΐνης σε διάλυμα, αρχικά μόνον ο διαλύτης με τα τυχόν αντισταθμιστικά ιόντα υποβάλλονται σε ελαχιστοποίηση ενέργειας κατά την οποία η διαλυμένη ουσία κρατείται ακλόνητη στην αρχική της διαμόρφωση. Στη συνέχεια ο διαλύτης και τα ιόντα υποβάλλονται σε MD αρχίζοντας με κάποιο μεγαλύτερο αρμονικό περιορισμό για τη διαλυμένη ουσία και μειώνοντάς τον σταδιακά. Η φάση αυτή της εξισορρόπησης πρέπει να είναι εκτενής ώστε να επιτρέψει στα μόρια του διαλύτη να επαναδιευθετηθούν πλήρως ως προς τη διαλυμένη ουσία. Προκειμένου να γίνει αυτό με την προσομοίωση MD, η διάρκεια της φάσης εξισορρόπησης του διαλύτη πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τον χρόνο χαλάρωσης του διαλύτη, όπου ένα μόριο νερού για να «χάσει τη μνήμη» σχετικά με τον αρχικό του προσανατολισμό είναι ~ 10 ps. Ακολουθεί ελαχιστοποίηση ενέργειας ολόκληρου του συστήματος (διαλυμένη ουσία και διαλύτης) μειώνοντας σταδιακά τους αρμονικούς περιορισμούς στη διαλυμένη ουσία.

Στη φάση παραγωγής σε ένα μικροκανονικό στατιστικό σύνολο *NVE* οι ταχύτητες και επομένως η θερμοκρασία αποτελούν μεταβλητές του συστήματος, ενώ αν γίνει σε στατιστικό σύνολο *NVT* η θερμοκρασία είναι σταθερή. Διάφορες ιδιότητες υπολογίζονται και

αποθηκεύονται στη φάση διάδοσης για τη μετέπειτα επεξεργασία. Είναι συνήθης επίσης, η αποθήκευση θέσεων, ενεργειών και ταχυτήτων των απεικονίσεων του συστήματος σε τακτικά χρονικά διαστήματα από τις οποίες μπορούν να υπολογιστούν άλλες ιδιότητες μετά το πέρας της προσομοίωσης.

5.9 Ρυθμίσεις κατά την προσομοίωση χημικών φαινομένων

Για την προσομοίωση και εξήγηση χημικών φαινομένων σε μεγάλα συστήματα εφαρμόζονται διάφορες ρυθμίσεις για την τήρηση σωστών συνθηκών προσομοίωσης και τον περιορισμό του υπολογιστικού κόστους.

5.9.1 Περιοδικές Συνοριακές Συνθήκες και Αποστάσεις Αποκοπής

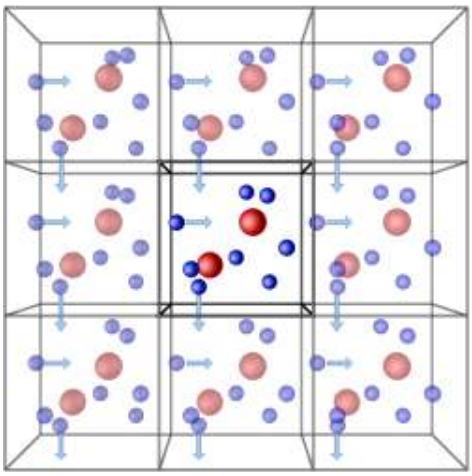
Α) *Περιοδικές Συνοριακές Συνθήκες*: Σε μια προσομοίωση, εξαιτίας των περιορισμών του υπολογιστικού κόστους, αναπόφευκτα το μέγεθος του συστήματος είναι τόσο μικρό ώστε τα επιφανειακά φαινόμενα να συνεισφέρουν σημαντικά στον προσδιορισμό των ιδιοτήτων του συστήματος. Όταν δε οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι μεγάλες, η παραπάνω κατάσταση είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Με την εφαρμογή PBC είναι δυνατή η εκτέλεση της προσομοίωσης ενός συστήματος, χρησιμοποιώντας ένα μικρό αριθμό σωματιδίων, με τέτοιον τρόπο ώστε αυτά να υπόκεινται σε δυνάμεις που υπάρχουν στο χύμα ρευστό σύστημα. Ένα σύστημα PBC μπορεί να αποτελείται από ένα κουτί, για παράδειγμα κυβικό που να αναπαράγεται προς όλες τις διευθύνσεις. Εξαιτίας της εφαρμογής αποστάσεων αποκοπής για τον προσδιορισμό των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων, το κουτί της προσομοίωσης είναι αρκετό να περιβάλλεται από μία ομάδα κύβων που στις δύο διαστάσεις είναι 8 και στις τρεις 26.

Υπάρχουν διάφορα σχήματα κουτιών προσομοιώσεων εκτός του κυβικού, όπως το εξαγωνικό πρίσμα, το κολοβό οκτάεδρο, το ρομβικό δωδεκάεδρο και το ρομβοεξαγωνικό δωδεκάεδρο. Είναι σύνηθες η επιλογή του σχήματος του κουτιού προσομοίωσης να αντανακλά τη γεωμετρία του συστήματος. Για παράδειγμα, για σφαιρικά μόρια επιλέγεται το ρομβικό οκτάεδρο και το ρομβικό δωδεκάεδρο. Γενικά τα πιο συνήθη σχήματα κουτιού προσομοίωσης είναι αυτά του κύβου/παραλληλεπιπέδου και του κολοβού οκταέδρου.

Ας περιγραφεί στη συνέχεια πως η εφαρμογή PBC παράγει ένα σύστημα με συμπεριφορά ίδια με του χύμα ρευστού, απαλλαγμένου από επιφανειακά φαινόμενα και με το μικρότερο δυνατό υπολογιστικό κόστος. Αν η τροχιά ενός ατόμου το βγάλει εκτός των ορίων του κουτιού προσομοίωσης, αυτό αντικαθίσταται από ένα σωμάτιο ενός περιοδικού αντιτύπου, που εισάγεται στο κουτί προσομοίωσης από την αντίθετη πλευρά (σχήμα 5.6). Με τον τρόπο αυτό οι PBC διατηρούν τη μάζα, των αριθμό των σωματίων και τη συνολική ενέργεια στο κουτί προσομοίωσης.

Παρόλα αυτά απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην εφαρμογή περιοδικών συνοριακών συνθηκών σε συστήματα που δεν είναι περιοδικά. Οι συνθήκες PBC εφαρμόζονται συνήθως στην περιγραφή υγρών ή όταν ενδιαφέρει κυρίως η περιγραφή της διαλυμένης ουσίας που περιβάλλεται από μόρια διαλύτη.



Σχήμα 5.6 Σχηματική αναπαράσταση της ιδέας των Περιοδικών Συνοριακών Συνθηκών.

Όμως, πόσο μεγάλο πρέπει να είναι το κουτί προσομοίωσης; Η απάντηση στο ερώτημα αυτό είναι ότι το μέγεθος του κουτιού προσομοίωσης καθορίζεται με βάση την εμβέλεια των μη-δεσμικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος ή την απόσταση αποκοπής. Έτσι, οι διαστάσεις του κουτιού πρέπει να αντιστοιχούν τουλάχιστον στη μεγαλύτερη απόσταση αποκοπής, ειδάλλως κάποιες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις θα προσμετρώνται τουλάχιστον εις διπλούν, δηλαδή μια φορά εντός του κουτιού και μια φορά εντός του επόμενου περιοδικού αντιτύπου. Πρακτικά, το μέγεθος του κουτιού πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερο από την

απόσταση αποκοπής, επειδή οι αλληλεπιδράσεις είναι ενεργές, εφόσον το σύστημα θεωρείται μη περιοδικό και ομογενές. Για την προσομοίωση ενός βιομορίου σε αραιό διάλυμα, το μέγεθος του κουτιού προσομοίωσης συνίσταται να είναι τέτοιο ώστε να περιλαμβάνει το μέγεθος του μορίου και επιπλέον δυο φορές τη μεγαλύτερη απόσταση αποκοπής.

Β) *Αποστάσεις αποκοπής*: Αντικειμενικά το πιο απαιτητικό από άποψης υπολογιστικού κόστους κομμάτι μιας μοριακής δυναμικής είναι ο υπολογισμός των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων στη συνάρτηση της δυναμικής ενέργειας, π.χ. οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι δυνάμεις van der Waals. Η εξίσωση (5.28) δίνει την ατομιστική περιγραφή της απόστασης αποκοπής για τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις στη συνάρτηση της ενέργειας

$$U_{\mathrm{nb}} = \sum_{i,j} \omega_{ij} S(r_{ij}) \left[\underbrace{-\frac{A_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}}}_{vdWEnergy} + \underbrace{\frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}}}_{Coulomb\ Energy} \right] \quad (5.28)$$

όπου r_{ij} η απόσταση μεταξύ των ατόμων *i* και *j*, $S(r_{ij})$ ρυθμιστική συνάρτηση (*switching function*) και ω_{ij} είναι παράμετροι ζύγισης, με $0 \leq \omega_{ij} \leq 1$, και εξαρτώνται από τον αριθμό των δεσμών μεταξύ των ατόμων *i* και *j*.

Η συνάρτηση $S(r)$ μπορεί να είναι διαφορετική για τους όρους των δυνάμεων van der Waals από εκείνη των ηλεκτροστατικών όρων. Σε αυτήν την περίπτωση η εξίσωση (5.28) τροποποιείται κατάλληλα ώστε να περιλαμβάνει τους δύο όρους $S_1(r)$ και $S_2(r)$. Για παράδειγμα στο CHARMM, χρησιμοποιείται η ίδια ρυθμιστική συνάρτηση τόσο για τις δυνάμεις van der Waals όσο για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Coulomb, ενώ χρησιμοποιούνται διαφορετικές συναρτήσεις μετατόπισης.

Για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals η επιλογή απόστασης αποκοπής δεν παρουσιάζει πρόβλημα, αφού το δυναμικό Lennard-Jones ελαττώνεται γρήγορα με την απομάκρυνση εξαιτίας της εξάρτησης r^{-6} της αλληλεπίδρασης διασποράς. Η τιμή που συνήθως χρησιμοποιείται για τη σχετική απόσταση R_c είναι μεταξύ (8 – 12) Å.

Ωστόσο για τις μακράς εμβέλειας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, η απόσταση αποκοπής πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερη. Ενώ συνήθως ως ελάχιστη τιμή χρησιμοποιείται R_c = 10 Å, υπάρχει η αντίληψη ότι οποιαδήποτε απόσταση αποκοπής θα οδηγήσει σε σφάλμα. Έχει λοιπόν προταθεί, ότι κατά την προσομοίωση πρωτεϊνών, λιπιδικών μεμβρανών, κ.λπ, η απόσταση αποκοπής να είναι τουλάχιστον (15 – 16) Å.

Γ) *Ηλεκτροστατικές Αλληλεπιδράσεις*: Εξαιτίας του μεγάλου υπολογιστικού κόστους για τον υπολογισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων κατά Coulomb, με την παράλειψή τους για απόσταση αποκοπής R_c ~ 10 Å , το υπολογιστικό κόστος μειώνεται.

Παρόλα αυτά, η χρήση της αποκοπής των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων δεν είναι απαραίτητο ότι μειώνει εντυπωσιακά το χρόνο υπολογισμού κι αυτό γιατί για κάθε ζεύγος ατόμων πρέπει να κριθεί αν είναι αναγκαίος ο υπολογισμός των ενεργειών αλληλεπίδρασης. Έτσι, ο υπολογισμός $N(N-1)$ αποστάσεων απαιτεί ισοδύναμο χρόνο με αυτόν που απαιτεί ο υπολογισμός της ενέργειας.

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, ο υπολογισμός των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων γίνεται με τη βοήθεια δημιουργίας κατάλληλων μη δεσμικών γειτόνων για κάθε άτομο σε απόσταση ίση με R_c.[56] Η ανανέωση των καταλόγων των μη δεσμικών γειτόνων για κάθε άτομο γίνεται περίπου ανά 10 ή 20 χρονικά βήματα μοριακής δυναμικής με τη βοήθεια του κατάλληλου αλγορίθμου. Ωστόσο, η συχνότητα ανανέωσης των καταλόγων πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην είναι ούτε μεγάλη –οπότε η διαδικασία δεν είναι αποτελεσματική– αλλά ούτε και μικρή, ώστε να προκύπτουν σφάλματα στον υπολογισμό των δυνάμεων και ενεργειών από άτομα που κινούνται στιγμιαία εντός της περιοχής που ορίζει η απόσταση αποκοπής.

Στην περίπτωση μεγάλων μοριακών συστημάτων, πλεονεκτεί η χρήση αποκοπής ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με βάση την ομάδα και όχι το φορτίο. Τα μεγάλα μόρια χωρίζονται σε ομάδες ατόμων, όπως για παράδειγμα πολωμένες ομάδες αμινοξέων για πρωτεΐνες και πεπτίδια, έτσι ώστε κάθε ομάδα να έχει κατά προτίμηση μηδενικό φορτίο. Με τον τρόπο αυτό εξετάζεται η απόσταση οποιουδήποτε ζεύγους ατόμων στις δύο ομάδες ή η απόσταση μεταξύ δύο κατάλληλα επιλεγμένων επισημαντήρων ατόμων από κάθε ομάδα ως

προς την απόσταση R_c. Έτσι, οι διάφορες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δεν εξαρτώνται από την απόσταση.

Επειδή η αποκοπή της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης επιφέρει ασυνέχειες στη δυναμική ενέργεια στην περιοχή κοντά στην απόσταση αποκοπής, έχουν προταθεί ρυθμιστικές συναρτήσεις για αποκοπή με βάση το άτομο ή την ομάδα, σε λογισμικά όπως το Gromacs ή το Gromos.[57] Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τον υπολογισμό ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, όπως είναι η μέθοδος αθροισμάτων Ewald, η μέθοδος πεδίου αντίδρασης, ενώ για τον υπολογισμό των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων ο αλγόριθμος πολύποδου κυψελίδας.[58]

Δ) *Πόλωση*: Για τον προσδιορισμό ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ο υπολογισμός φορτίου – φορτίου είναι ιδιαίτερα αποδοτικός επειδή γίνεται ανά ζεύγη. Φυσικά, μια πιο ρεαλιστική εξέταση ενός συστήματος είναι εκείνη η προσομοίωση που λαμβάνει υπόψη της την πόλωση ενός συστήματος. Με τον τρόπο αυτό, διαφορετικές περιοχές θα έχουν και διαφορετικές τοπικές πολωσιμότητες και άρα οι διπολικές ροπές συγκεκριμένων ομάδων θα μεταβάλλονται τοπικά. Στην αύξηση της υπολογιστικής ισχύος αποδίδεται η ολοένα και αυξανόμενη εκτέλεση προσομοιώσεων που περιλαμβάνουν την πολωσιμότητα, τόσο για τα μόρια του διαλύτη όσο για όλα τα μόρια.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω και τις σημαντικές προσπάθειες στην εισαγωγή της πολωσιμότητας σε πεδία δυνάμεων –μέσω αντικατάστασης των πάγιων ατομικών φορτίων με φορτία που διακυμαίνονται βάσει το τοπικό περιβάλλον–[59,60] δεν είναι ξεκάθαρο αν πρέπει να υιοθετείται ο «ρεαλισμός» ενός πολώσιμου μοντέλου για τη βελτίωση της ακρίβειας των υπολογισμών. Για παράδειγμα, η ερευνητική ομάδα του Jorgensen δεν υποστηρίζει την ενσωμάτωση της πόλωσης, δείχνοντας ότι οι ιδιότητες των υγρών και διαλυμάτων μπορούν να αναπαραχθούν από πεδία δυνάμεων πάγιων φορτίων, που αρχικά έδιναν λανθασμένες προβλέψεις, αν δοθεί προσοχή στην παραμετροποίηση.[61,62]

Ε) *Προσομοίωση Φαινομένων Διαλύτη:* Πολλές φορές η επίδραση του διαλύτη σε μια προσομοίωση χρειάζεται να περιγραφεί με ρητή ή ατομιστική αναπαράσταση του κάθε μορίου (*explicit solvent*).

Το απλούστερο μοντέλο ατομιστικής περιγραφής των μορίων του διαλύτη βασίζεται στη μοριακή μηχανική. Αναμφισβήτητα ο πιο σημαντικός διαλύτης είναι το νερό και για το λόγο αυτό ο μεγαλύτερος αριθμός προτύπων ΜΜ που έχει διατυπωθεί περιγράφει το νερό.

Υπάρχουν διάφορα μοντέλα νερού τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν είτε με βάση το αν η δομή του μορίου διαλύτη είναι ακλόνητη ή ευκίνητη είτε με βάση το συνολικό αριθμό των θέσεων αλληλεπίδρασης του νερού με ένα άλλο μόριο νερού ή με ένα μόριο διαλυμένης ουσίας, είτε ακόμη με το αν περιλαμβάνουν φαινόμενα πόλωσης.

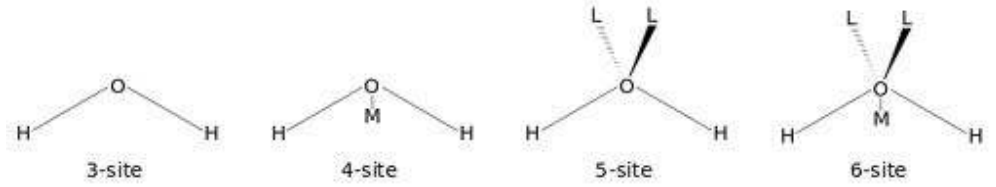
Το πιο διαδεδομένο μοντέλο περιλαμβάνει τη θεώρηση του νερού ως ακλόνητη σφαίρα Lennard-Jones, μέσα στην οποία υπάρχουν δύο φορτία ίσης και αντίθετης τιμής προς μίμηση της διπολικής ροπής του.

Λίγο πιο περίπλοκες ακλόνητες αναπαραστάσεις περιλαμβάνουν τον ορισμό ίσων θετικών ατομικών φορτίων στα άτομα υδρογόνου και την τοποθέτηση ενός αρνητικού φορτίου στη θέση του οξυγόνου ή σε κατάλληλη θέση στον άξονα συμμετρίας ή την τοποθέτηση ίσων αρνητικών φορτίων στις περιοχές ζευγών ηλεκτρονίων (σχήμα 5.7). Κάθε μοντέλο περιλαμβάνει ένα δυναμικό αλληλεπίδρασης των μορίων νερού.

Με τη διαφοροποίηση της θέσης και της τιμής των αρνητικών φορτίων και των διάφορων παραμέτρων του δυναμικού που υπάρχει από μοντέλο σε μοντέλο επιτυγχάνεται η μίμηση της διπολικής ροπής και της γεωμετρίας πρότυπων μοριακών συστημάτων.

Τέτοια απλά μοντέλα με προσεκτική παραμετροποίηση αποδίδουν εξαιρετικά ως προς την πρόβλεψη πολλών ιδιοτήτων του υγρού νερού, όπως η πυκνότητα, η θερμότητα ατμοποίησης, η θερμοχωρητικότητα, η συμπιεστότητα, κ.λπ.

Από αυτά τα μοντέλα νερού τα πιο επιτυχημένα είναι τα διαμοριακά δυναμικά 3- και 4-,5- θέσεων αλληλεπίδρασης (TIP3P, TIP4P, TIP5P), που αναπτύχθηκαν από τον Jorgensen και περιλαμβάνουν 3- και 4- σημειακά φορτία, αντίστοιχα, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.7.[62–64] Κατά την εξέλιξη του TIP3P στο μοντέλο TIP5P βελτιώθηκε η γεωμετρία του διμερούς νερού και λήφθηκε μια πιο τετραεδρική γεωμετρία του διαλύτη, δηλαδή των συσσωματωμάτων του νερού, ώστε υπολογίστηκαν για παράδειγμα καλύτερα οι συναρτήσεις ακτινικής κατανομής και η θερμοκρασία μέγιστης πυκνότητας.



Σχήμα 5.7 Μοντέλα νερού 3-, 4-, 5- και 6- θέσεων αλληλεπίδρασης. Στο μοντέλο 4-θέσεων τοποθετείται όχι στο άτομο του οξυγόνου, αλλά σε ένα τεχνητό άτομο M επί της διχοτόμου της γωνίας H-O-H. Στο μοντέλο 5- θέσεων τοποθετούνται αρνητικά φορτία στα τεχνητά άτομα L, τα οποία αναπαριστούν τα μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων του οξυγόνου σύμφωνα με την τετραεδρική γεωμετρία του μορίου του νερού. Για το μοντέλο 3- θέσεων χρειάζονται 3×3=9 αποστάσεις για την αλληλεπίδραση κάθε ζεύγους μορίων νερού, δηλαδή κάθε άτομο του ενός μορίου με κάθε άτομο του άλλου. Αντίστοιχα, για το μοντέλο 4-θέσεων χρειάζονται 10 αποστάσεις στον υπολογισμό, δηλαδή κάθε φορτισμένη θέση ενός μορίου αλληλεπιδρά με κάθε φορτισμένη θέση ενός άλλου και υπάρχει επιπλέον η αλληλεπίδραση O-O, (3×3) + 1 = 10. Ανάλογα, για το μοντέλο 5- θέσεων χρειάζονται 17 αποστάσεις, (4×4) + 1 = 17 και για το μοντέλο 6- θέσεων 26, (5×5) + 1 = 26.

Το δυναμικό για τα μοντέλα TIP3P και TIP4P δίνεται από την εξίσωση (5.29)

$$V_{\mathrm{nb}} = V_{\mathrm{el}} + V_{\mathrm{vdW}} = \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} + \frac{\mathrm{A}}{r_{\mathrm{OO}}^{12}} - \frac{\mathrm{B}}{r_{\mathrm{OO}}^{12}} \quad (5.29)$$

όπου q_i, q_j τα μερικά φορτία, r_{ij} η απόσταση μεταξύ των θέσεων των φορτίων A και B είναι παράμετροι του όρου του δυναμικού Lennard-Jones, το οποίο εφαρμόζεται μόνο για την αλληλεπίδραση των ατόμων οξυγόνου.

Η μορφή και οι διάφοροι παράμετροι διατυπώθηκαν κατά την προσαρμογή με αποτελέσματα *ab initio* κβαντομηχανικών υπολογισμών σε διμερή, τριμερή ή υψηλότερης τάξης συσσωματώματα νερού και βελτιώθηκαν από τις τιμές των μακροσκοπικών ιδιοτήτων του νερού που λαμβάνονται μετά από προσομοιώσεις Monte Carlo. Τα μοντέλα TIP*n*P είναι **μεταβιβάσιμα** (*transferable*), δηλαδή είναι συμβατά με διάφορα πεδία δυνάμεων και μεθόδους.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμη και τα πιο εξελιγμένα μοντέλα δεν αναπαράγουν τέλεια όλες τις μακροσκοπικές ιδιότητες του νερού και ότι κατά την επιλογή ενός μοντέλου στις προσομοιώσεις πρέπει να ληφθεί υπόψη η ακρίβεια υπολογισμού καθώς

και το υπολογιστικό κόστος που αυξάνεται με τον αριθμό των θέσεων αλληλεπίδρασης (σχήμα 5.7). Το μοντέλο τριών θέσεων αλληλεπίδρασης βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής εξαιτίας της απλότητάς του και του μειωμένου υπολογιστικού κόστους που επιτρέπει.

Οι ερευνητικές ομάδες των Berendsen και Gunsteren δημοσίευσαν ένα άλλο μοντέλο τριών θέσεων για τη δομή του νερού, το SPC.[65] Το μοντέλο αυτό προσθέτει μια διόρθωση μέσης πολικότητας στη δυναμική ενέργεια

$$V_{\text{polarization}} = \frac{1}{2}\sum_{i}\frac{(\mu-\mu^{0})^{2}}{\alpha_{i}} \quad (5.30)$$

όπου μ η διπολική ροπή του πολωμένου μορίου νερού στο διαλύτη, μ^0 η διπολική ροπή του απομονωμένου μορίου νερού και α_i η ισοτροπική σταθερά πολωσιμότητας ίση με $1.68\cdot10^{-40}$ F·m. Η παραπάνω διόρθωση προσθέτει 1.25 kcal/mol στη συνολική ενέργεια εξαιτίας του ότι τα φορτία στο μοντέλο είναι σταθερά. Βελτίωση του μοντέλου έχει δημοσιευτεί.[66]

Για τους μη πολικούς διαλύτες η προσέγγιση του διαλύτη ως σφαίρα LJ είναι συνήθως λιγότερο επιτυχημένη. Ελάττωση του χρόνου προσομοίωσης μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας αναπαραστάσεις UA (*United Atom*) για τα άτομα του άνθρακα και τα συνδεδεμένα υδρογόνα. Ωστόσο η πλέον επιτυχημένη παραμετροποίηση οργανικών διαλυτών έχει πραγματοποιηθεί ως μέρος του πεδίου δυνάμεων OPLS του Jorgensen και περιλαμβάνει αλκάνια, αρωματικές ενώσεις, τετραχλωράνθρακα, χλωροφόρμιο, φουράνιο, n-οκτανόλη και πυρρόλιο σε αναπαραστάσεις UA και AA (All Atom). Όπως και για το νερό, έτσι και οι παράμετροι των μοντέλων αυτών των διαλυτών βελτιστοποιούνται από τη σύγκριση των μακροσκοπικών ιδιοτήτων του διαλύτη με πειραματικές τιμές.

Υπάρχουν επίσης και αδρανοποιημένα μοντέλα νερού, ευκίνητα μοντέλα νερού και μοντέλα που βασίζονται σε πολώσιμα πρότυπα, η περιγραφή των οποίων ξεφεύγει από το σκοπό της διπλωματικής αυτής εργασίας.

5.10 Σύγκλιση προσομοίωσης με βάση τον υπολογισμό της τιμής RMSD

Για να επιτευχθεί η σύγκλιση μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής, εξ ορισμού πρέπει να έχουν προστεθεί στο δείγμα τόσα σημεία ώστε να καλύπτεται πλήρως ο χώρος φάσης του συστήματος, δηλαδή η δειγματοληψία να είναι εργοδική. Τότε η χρονική μέση τιμή της μελετώμενης ιδιότητας στο επιλεγμένο δείγμα σημείων του διαμορφωτικού χώρου συμπίπτει με τη μέση τιμή που προκύπτει αν ληφθούν υπόψη όλα τα σημεία του χώρου φάσης. Αν κι αυτή η θέση είναι απλή, η σύγκλιση όπως ορίστηκε παραπάνω είναι αδύνατη να αποδειχτεί.

Για το λόγο αυτό, πρακτικά, στατιστική σύγκλιση θεωρείται ότι επιτυγχάνεται σε μια προσομοίωση MD, όταν οι μέσες τιμές όλων των μελετώμενων ιδιοτήτων $\langle A \rangle$ εμφανίζονται προσεγγιστικά ότι δε μεταβάλλονται με την επιπλέον συλλογή σημείων του χώρου φάσης. Η απόδειξη, λοιπόν, της σύγκλισης μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής είθισται να γίνεται δίνοντας τα γραφήματα μιας ή δύο ιδιοτήτων συναρτήσει του χρόνου, όπου διακρίνεται ότι μετά από κάποιο χρόνο η τιμή της μελετώμενης ιδιότητας παραμένει σταθερή.

Για παράδειγμα κατά την προσομοίωση μακρομορίων παρακολουθείται η τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής του τετραγώνου της απόκλισης (RMSD) της υπολογιστικής δομής από μια πειραματική γεωμετρία, η οποία έχει προκύψει από δεδομένα κρυσταλλογραφίας X ή φασματοσκοπίας NMR.

Η τιμή RMSD για ένα στιγμιότυπο ορίζεται από την εξίσωση (5.31)

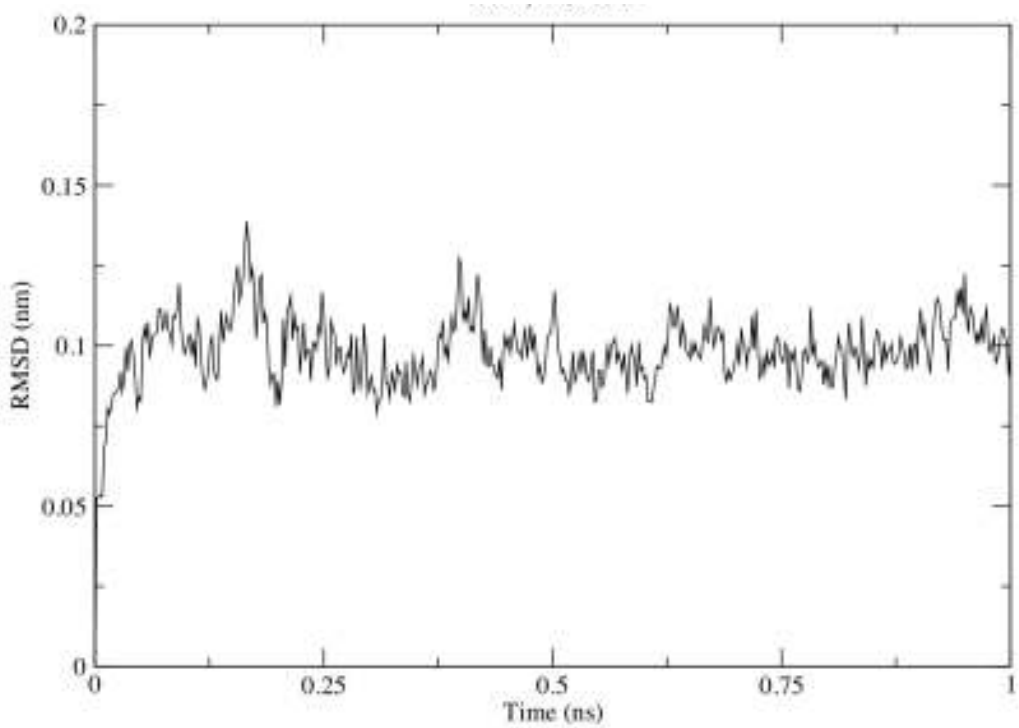
$$\mathrm{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}\left(r_{i,sim} - r_{i,\mathrm{exp\,t}}\right)^2}{N}} \quad (5.31)$$

όπου *N* ο αριθμός των ατόμων στο μακρομόριο και οι θέσεις *r* προσδιορίζονται σε ένα σύστημα συντεταγμένων που έχει ως αρχή το κέντρο μάζας, ενώ οι κύριες ροπές αδράνειας του μορίου βρίσκονται επί των καρτεσιανών αξόνων (η υπολογιστική και η πειραματική δομή έχουν τέλεια υπερτεθεί πριν τον υπολογισμό της τιμής RMSD).

Με τον υπολογισμό της τιμής RMSD επιτυγχάνονται ταυτόχρονα τόσο η εκτίμηση της σύγκλισης μιας προσομοίωσης όσο και η εκτίμηση του πόσο «όμοιες» είναι η πειραματική με την υπολογιστική δομή μεταξύ τους.

Σημειώνεται ότι στη βιβλιογραφία, όσον αφορά τη μέτρηση της τιμής RMSD, συχνά αναφέρεται μόνο ο αριθμός της τιμής και σπάνια δίνεται το γράφημα της σύγκλισης, όπως για παράδειγμα στο σχήμα 5.8. Ωστόσο, η τιμή της απόκλισης ως προς τη μέση τιμή της, σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση (5.31), είναι σημαντική ποσότητα και πρέπει να αναφέρεται. Αυτό αληθεύει για όλες τις αναμενόμενες τιμές που προκύπτουν από μια προσομοίωση. Διάφορες προσεγμένες μέθοδοι ανάλυσης σφάλματος των μέσων τιμών που προκύπτουν από προσομοιώσεις έχουν δημοσιευτεί.[67]

Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη των υπολογιστών έχει σημειωθεί ανάλογη αύξηση του χρόνου διάρκειας των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής που φτάνουν σήμερα μέχρι και μερικά *μ*s. Παρόλα αυτά, ένα μοριακό σύστημα μπορεί να συγκλίνει στατιστικά, αλλά να μη συγκλίνει στη δομή ισορροπίας, επειδή η προσομοίωση έχει παγιδευτεί σε μια μετασταθή κατάσταση του συστήματος ζωής μεγαλύτερου του χρόνου προσομοίωσης. Για αυτό ένας τρόπος ελέγχου είναι η συνέχιση της προσομοίωσης για μεγαλύτερο χρόνο, αν κι αυτό δεν είναι πάντα εφικτό εξαιτίας της αύξησης του υπολογιστικού κόστους. Εναλλακτικά, πραγματοποιούνται μία ή περισσότερες προσομοιώσεις με διαφορετικές αρχικές συνθήκες του συστήματος και ελέγχεται εάν υπάρχει κοινή σύγκλιση. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να ληφθούν εντελώς διαφορετικές τροχιές που στατιστικά δεν είναι όμοιες με την αρχική.



Σχήμα 5.8 Διάγραμμα RMSD ως προς τον σκελετό (backbone) μιας πρωτεΐνης μετά από προσομοίωση MD διάρκειας 1 ns.

Φυσικά και η παραπάνω μέθοδος –όπως επίσης και άλλες μέθοδοι– δεν εγγυάται την πραγματοποίηση μιας εργοδικής δειγματοληψίας του χώρου φάσης, ακόμα κι αν στο χρόνο προσομοίωσης οι τιμές διαφόρων ιδιοτήτων φαίνεται να συγκλίνουν. Έτσι, ο καλύτερος τρόπος για να εκτιμηθεί η αξία των προβλέψεων από μια προσομοίωση είναι η σύγκριση με πειραματικά δεδομένα καλής ποιότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{ο}

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΑΡΑΞΗΣ ΜΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙΣ ΚΑΤΑΤΑΞΗΣ

(Molecular Docking Calculations with Scoring Functions)

6.1 Σκοπός της μοριακής προσάραξης

Σκοπός των υπολογισμών μοριακής προσάραξης με προσεγγιστικές συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας είναι η πρόβλεψη σύνδεσης ενός φαρμακομορίου με τον υποδοχέα και η εκτίμηση της συγγένειας σύνδεσης παρέχοντας ένα μέτρο της διαμοριακής ενέργειας αλληλεπίδρασης προσδέτη – υποδοχέα. Επειδή οι ενεργειακές συναρτήσεις είναι προσεγγιστικές, οι υπολογισμοί μοριακής προσάραξης χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση διαφορών στην ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης μεταξύ προσδετών παρόμοιας ή διαφορετικής δομής και την κατάταξή τους κατά το δυνατόν αξιόπιστα και γρήγορα.[68]

6.2 Αλγόριθμοι μοριακής προσάραξης

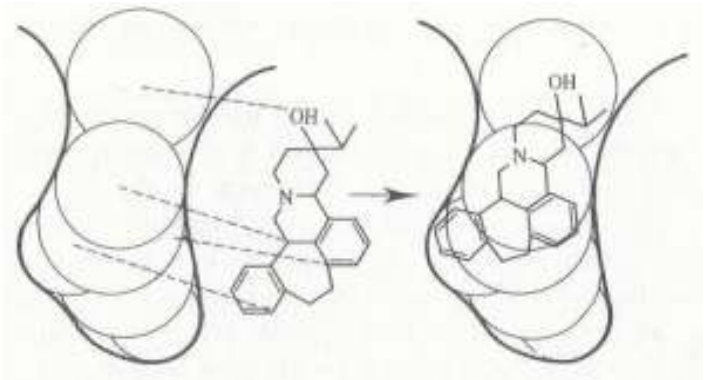
Επειδή κάθε μόριο έχει έξι βαθμούς μεταφορικής και περιστροφικής ελευθερίας, το πρόβλημα της μοριακής προσάραξης γίνεται πιο απλό αν χρησιμοποιηθούν άκαμπτες δομές για κάθε μόριο, χωρίς να χρησιμοποιηθούν βελτιστοποιήσεις γεωμετρίας. Τα μόρια τοποθετούνται κοντά το ένα στο άλλο και εκτιμώνται οι ενέργειες αλληλεπίδρασης.

Αν υπάρχει γνώση του αναμενόμενου τρόπου σύνδεσης, όπως για παράδειγμα αν υπάρχει κρυσταλλογραφική δομή ενός προσδέτη της ίδιας οικογένειας, το πρόβλημα προσάραξης μπορεί να αντιμετωπιστεί χειροκίνητα με τις κινήσεις να οδηγούνται μέσω αλληλεπίδρασης με τα γραφικά του υπολογιστή. Ωστόσο επειδή μελέτες έχουν δείξει ότι ακόμη και παρόμοιοι αναστολείς μπορούν να έχουν εντελώς διαφορετικούς προσανατολισμούς προσάραξης, είναι προτιμότερη η εφαρμογή αυτόματων αλγορίθμων προσάραξης που προσφέρουν μεγαλύτερες δυνατότητες από την εμπειρική χειροκίνηση.

6.2.1 Αλγόριθμοι άκαμπτης προσάραξης (*rigid docking*)

Οι αλγόριθμοι που έχουν αναπτυχθεί ταξινομούνται βάσει του αριθμού των βαθμών ελευθερίας που αγνοούν. Έτσι, στην περίπτωση των αλγορίθμων «άκαμπτης προσάραξης» μεταβάλλουν τους έξι βαθμούς μεταφορικής και περιστροφικής ελευθερίας των προσδετών ως προς τον υποδοχέα, τοποθετώντας τα αλληλεπιδρώντα μόρια σε κοντινές επαφές και εκτιμώντας τις μη-δεσμικές ενέργειες αλληλεπίδρασης, όπως είναι οι ηλεκτροαστατικές, van der Waals, δεσμοί υδρογόνου, κ.λπ, συνήθως μέσω ενός πεδίου δυνάμεων.

Ένας τέτοιος αλγόριθμος είναι ο DOCK που αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του Kuntz[69] και σχεδιάστηκε να εντοπίζει μόρια με μεγάλη συμπληρωματικότητα ως προς την περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα. Αρχικά μέσω του λογισμικού DOCK παράγεται μια ομάδα επικαλυπτόμενων σφαιρών διαφόρων ακτινών, καθεμία από τις οποίες εφάπτεται με την περιοχή πρόσδεσης σε δύο σημεία, βλ. σχήμα 6.1. Στη συνέχεια, τα άτομα του προσδέτη «προσαρμόζονται» στα κέντρα των σφαιρών με σκοπό την εύρεση ενός συνόλου διατάξεων του προσδέτη, όπου όλες οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων του θα είναι ισοδύναμες με τις αντίστοιχες αποστάσεις των κέντρων των σφαιρών. Ακολουθεί προσαρμογή των ατόμων με τα κέντρα των σφαιρών με ελάχιστα τετράγωνα για την εύρεση καλύτερων προσανατολισμών σύνδεσης (σχήμα 6.1). Τέλος, οι προσανατολισμοί ελέγχονται ως προς την ύπαρξη μη αποδεκτών στερεοχημικών συγκρούσεων μεταξύ προσδετών και υποδοχέα και υπολογίζεται η ενέργεια αλληλεπίδρασης και βαθμολογείται (*scoring*) η συγκεκριμένη διάταξη σύνδεσης. Οι προσανατολισμοί με τη μεγαλύτερη βαθμολογία (*score*) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση.



Σχήμα 6.1 Περιοχή σύνδεσης υποδοχέα που αναπαρίσταται ως σύνολο επικαλυπτόμενων σφαιρών. Ο αλγόριθμος DOCK βασίζεται στη βέλτιστη προσαρμογή των ατόμων του προσδέτη με τα κέντρα των σφαιρών, οπότε το μόριο τοποθετείται στην περιοχή πρόσδεσης.

6.2.2 Αλγόριθμοι ευπροσάρμοστης προσάραξης (*flexible docking*)

Στους αλγόριθμους αυτούς λαμβάνονται υπόψη όλοι οι βαθμοί ελευθερίας. Ωστόσο οι περισσότεροι από αυτούς διατηρούν άκαμπτο τον υποδοχέα και μεταβάλλουν μόνον τους βαθμούς ελευθερίας των προσδετών.

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι ανάλυσης του διαμορφωτικού χώρου ενσωματώνονται σε κάποιο στάδιο στον αλγόριθμο προσάραξης π.χ. η μέθοδος Monte Carlo χρησιμοποιείται στην εκτέλεση υπολογισμών μοριακής προσάραξης σε συνδυασμό με εικονική πυράκτωση (*simulated annealing*).[70] Έτσι, σε κάθε βήμα Monte Carlo η διαμόρφωση του προσδέτη αλλάζει και στη συνέχεια υπολογίζεται η ενέργεια αλληλεπίδρασης του προσδέτη με την περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα.

Ακόμη, στο λογισμικό *Glide* χρησιμοποιούνται πολλαπλά βήματα φιλτραρίσματος και διαδοχικής βελτιστοποίησης του προσανατολισμού πρόσδεσης. Αρχικά, πραγματοποιείται μια εξαντλητική έρευνα του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη. Ο έλεγχος αυτός του διαμορφωτικού χώρου επιτρέπει την ομαδοποίηση των διαμορφομερών χαμηλής ενέργειας και η πρόσδεση κάθε ομάδας με τον υποδοχέα ελέγχεται προσεγγιστικά χρησιμοποιώντας ένα μαλακό δυναμικό αλληλεπίδρασης που επιτρέπει για παράδειγμα τις πολύ κοντινές επαφές van der Walals. Με τον τρόπο αυτόν, ο αριθμός των προσανατολισμών του προσδέτη μειώνεται σε κάποιες εκατοντάδες. Στη συνέχεια, ελαχιστοποιείται η ενέργεια των επιλεγμένων προσανατολισμών με το OPLS-AA και οι καλύτεροι προσανατολισμοί

υποβάλλονται σε προσομοίωση Monte Carlo. Τέλος, ελέγχεται η πρόσδεση στις βελτιστοποιημένες δομές με βάση τη συνάρτηση Glide, SP ή XP (βλ. §6.2.4).[71,72]

Τα προγράμματα GOLD[73] και AutoDock[74] χρησιμοποιούν γενετικούς αλγόριθμους. Στους αλγόριθμους αυτούς χρησιμοποιούνται «χρωμοσωμικοί» κώδικες των εσωτερικών συντεταγμένων (π.χ. δίεδρες γωνίες) και των συντεταγμένων προσανατολισμού του προσδέτη εντός της περιοχής σύνδεσης του υποδοχέα.[75–77] Αρχικά, δημιουργείται ένας πληθυσμός πιθανών λύσεων *μ*, που αντιστοιχεί σε τυχαία επιλογή συντεταγμένων. Ο προσανατολισμός και οι εσωτερικές συντεταγμένες μεταβάλλονται όπως εξελίσσονται οι πληθυσμοί των λύσεων. Ο νέος πληθυσμός επιλέγεται βάσει τυχαίου ανασυνδυασμού του «χρωμοσώματος» συντεταγμένων και τη βαθμολογία κάθε προηγούμενης διάταξης πρόσδεσης της ένωσης που γίνεται με μια συνάρτηση καταλληλότητας ή συνάρτηση βαθμολογίας (*fitness* or *scoring function*). Τέτοιες είναι οι τιμές των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων ενός πεδίου δυνάμεων MM. Τέλος, οι απόγονοι πληθυσμοί εξελίσσονται σε καλύτερες λύσεις μέχρι συγκλίσεως.

6.2.3 Συναρτήσεις βαθμολογίας

Οι συναρτήσεις βαθμολογίας έχουν ως στόχο την προσεγγιστική πρόβλεψη της σχετικής ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης ενός φαρμακομορίου με τον υποδοχέα. Οι αλγόριθμοι προσάραξης, γενικά, παράγουν ένα μεγάλο αριθμό λύσεων που πρέπει να αξιολογηθούν από κάποια από τις συναρτήσεις αυτές. Φυσικά κάποιοι από τους προσανατολισμούς πρόσδεσης που προβλέπονται μέσω των αλγορίθμων αυτών απορρίπτονται αμέσως, επειδή περιλαμβάνουν στερεοχημικές συγκρούσεις με την πρωτεΐνη. Επομένως, αξιολογούνται οι υπόλοιπες λύσεις.

Διακρίνονται δύο γενικές περιπτώσεις εφαρμογής των συναρτήσεων βαθμολογίας. Η μία αφορά φαρμακομόρια με γνωστές σταθερές σύνδεσης και το πώς αυτά συνδέονται με τον υποδοχέα, ενώ η άλλη την πρόσδεση ενός συνόλου μορίων που ανήκουν σε μια βιβλιοθήκη. Έτσι, αν στην πρώτη περίπτωση η συνάρτηση βαθμολογίας μπορεί να αναπαράγει τον προσανατολισμό πρόσδεσης που μοιάζει περισσότερο με την πειραματική δομή του διαμοριακού συμπλόκου, το αποτέλεσμα χρησιμοποιείται στο να γίνουν κατανοητές οι σχέσεις δομής – δράσης. Στη δεύτερη περίπτωση, η συνάρτηση βαθμολογίας καλείται να εντοπίσει

όσο το δυνατόν ακριβέστερα το «σωστό» τρόπο σύνδεσης ενός προσδέτη, και να κατατάξει τους διάφορους προσδέτες ως προς τη συγγένεια σύνδεσης. Εδώ οι υπολογισμοί προσάραξης έχουν σκοπό την εικονική δοκιμασία ενώσεων από βάσεις δεδομένων (*Virtual Screening*), δηλ. το φιλτράρισμα μεγάλου συνόλου ενώσεων και τον εντοπισμό προσδετών ως πιθανές ενώσεις – οδηγούς.

6.2.4 Συναρτήσεις πεδίου δυνάμεων και εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολογίας

Από την εξέταση μεγάλου αριθμού κρυσταλλογραφικών δομών συμπλόκων πρωτεϊνών με προσδέτες έχει βρεθεί ότι οι βέλτιστοι προσανατολισμοί σύνδεσης αντιστοιχούν στον καλύτερο συνδυασμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου. Ενώ τα παραπάνω δύο είδη αλληλεπιδράσεων είναι τα πιο συνηθισμένα, υπάρχουν και άλλα είδη αλληλεπιδράσεων που έχουν εντοπιστεί μετά από ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού κρυσταλλογραφικών δομών συμπλόκων και περιλαμβάνουν ασθενείς δεσμούς υδρογόνου C-H···Y (Y = N, O, Ar, κ.λπ), ελκτικές αλληλεπιδράσεις C=O ή Ar···X (X = F, Cl, Br, I), κ.λπ.[78] Οι αλληλεπιδράσεις αυτές συχνά αυξάνουν σημαντικά τη συγγένεια σύνδεσης.

Οι πιο σημαντικές ενεργειακές συνεισφορές για την κάλυψη της μη πολικής επιφάνειας του υποδοχέα είναι πιθανώς οι ελκτικές δυνάμεις διασποράς μεταξύ των ατόμων του προσδέτη και του υποδοχέα, καθώς και η απομάκρυνση διατεταγμένων μορίων νερού από την περιοχή σύνδεσης στην περιοχή του περιβάλλοντα χύμα διαλύτη. Η ακριβής προσομοίωση αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί να είναι αρκετή για να προβλέψει τον τρόπο σύνδεσης πολλών από τους προσδέτες υψηλής συγγένειας.

Με βάση λοιπόν τη φαρμακοχημική διαίσθηση, η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης μπορεί να γραφεί εμπειρικά ως άθροισμα όρων που συνεισφέρουν στην πρόσδεση.[79,80] Η εξίσωση (6.1.) περιγράφει την εμπειρική αυτή έκφραση της ενέργειας πρόσδεσης

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{solvent} + \Delta G_{conf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{t/r} + \Delta G_{vib} \quad (6.1)$$

Ακολουθεί σύντομη επεξήγηση των όρων του παραπάνω αθροίσματος.

$\Delta G_{solvent}$: Η συνεισφορά των φαινομένων στα οποία συμμετέχει ο διαλύτης. Αυτά περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις διαλύτη – προσδέτη, διαλύτη – πρωτεΐνης και διαλύτη – διαμοριακού συμπλόκου. Η συνεισφορά αυτή αφορά στην ενθαλπική και εντροπική μεταβολή, δηλαδή το ενεργειακό κόστος μεταφοράς των δύο μορίων προσδέτη και πρωτεΐνης από το διαλύτη στην κατάσταση συμπλόκου.

ΔG_{conf}: Οι διαμορφωτικές αλλαγές της πρωτεΐνης και του προσδέτη που προκύπτουν από το σχηματισμό του συμπλόκου. Σε πολλές περιπτώσεις η πρωτεΐνη δεν αλλάζει σε σημαντικό βαθμό διαμόρφωση μετά την πρόσδεση του προσδέτη. Αυτό είναι ιδιαίτερα επιθυμητό δεδομένου ότι πολλές μέθοδοι υπολογισμού προσάραξης υποθέτουν ότι ο υποδοχέας είναι άκαμπτος. Ο προσδέτης, αντίθετα, μετέρχεται από ένα σύνολο διαμορφώσεων σε διάλυμα σε μια κύρια διαμόρφωση στην κατάσταση πρόσδεσης. Η ενέργεια που πρέπει να δαπανηθεί, μετά από διάφορες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ενεργειακού κόστους για τη μετάβαση αυτή του προσδέτη από τη σημαντικότερη διαμόρφωσή του στο διάλυμα στη διαμόρφωση πρόσδεσης, είναι ~ 3 kcal/mol.[81]

ΔG_{int}: Ελεύθερη ενέργεια λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων συμπεριλαμβανομένων των δεσμών υδρογόνου και των δυνάμεων van der Waals.

ΔG_{rot}: Η απώλεια ελεύθερης ενέργειας που προέρχεται από το «πάγωμα» των περιστροφών γύρω από τους δεσμούς για την πρωτεΐνη και του προσδέτη. Η τιμή αυτή οφείλεται κυρίως στη μείωση της τιμής της εντροπίας. Ο απλούστερος τρόπος για τον υπολογισμό του ενεργειακού αυτού κόστους είναι να θεωρηθεί ότι υπάρχουν τρεις καταστάσεις για κάθε περιστρεφόμενο δεσμό, trans και ±Gauche, οδηγώντας σε ένα κόστος ελεύθερης ενέργειας ~ 0.7 kcal/mol για κάθε περιστρεφόμενο δεσμό στους 298 K.

$\Delta G_{t/r}$: Η απώλεια μεταφορικής και περιστροφικής ενέργειας, η οποία προέρχεται από τη σύνδεση της πρωτεΐνης και του προσδέτη σε ένα διαμοριακό σύμπλοκο. Η τιμή θεωρείται

σταθερή για όλους τους προσδέτες και κατά συνέπεια αγνοείται όταν κανείς ενδιαφέρεται για τη σχετική ικανότητα σύνδεσης διαφορετικών προσδετών.

ΔG_{vib}: Η ελεύθερη ενέργεια που οφείλεται στις μεταβολές των δονητικών καταστάσεων. Η συνεισφορά αυτή είναι δύσκολο να υπολογιστεί και συνήθως αγνοείται.

Η ενέργεια αποδιαλύτωσης ($\Delta G_{solvent}$) αποτελεί μαζί με τη ΔG_{int} τους δυο σημαντικότερους όρους των παραπάνω συνεισφορών. Πιο απλά, η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης προκύπτει από τη διαφορά δύο μεγάλων ποσοτήτων, της ενέργειας αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης – προσδέτη και της ενέργειας απομάκρυνσης του διαλύτη από την επιφάνεια επαφής υποδοχέα – προσδέτη ή αλλιώς της μεταφοράς των δύο μορίων από το διάλυμα στην κατάσταση συμπλόκου.[80]

Στις **συναρτήσεις πεδίου δυνάμεων**, ο όρος ΔG_{int} περιγράφεται με μια συνάρτηση μοριακής μηχανικής. Οι συναρτήσεις αυτές βασίζονται στο φυσικοχημικό μοντέλο του πεδίου δυνάμεων, ενώ διαφέρουν κυρίως στον προσδιορισμό των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.

Στις **εμπειρικές συναρτήσεις**, αντίθετα, κάθε όρος της εξίσωσης (6.1) δεν περιγράφεται με κάποια συναρτησιακή μορφή που έχει φυσική βάση. Η τιμή κάθε όρου και ο βαθμός συμμετοχής του προσδιορίζεται μόνο από την προσαρμογή του με πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιώντας μεθόδους παλινδρόμησης, επίσης γνωστές και ως συναρτήσεις που βασίζονται στην παλινδρόμηση (*regression – based scoring functions*). Στη συνέχεια ακολουθεί περιγραφή κάποιων βασικών συναρτήσεων πεδίου δυνάμεων και εμπειρικών συναρτήσεων που χρησιμοποιούνται από τα τρέχοντα προγράμματα υπολογισμών μοριακής προσάραξης.[82,83]

6.2.4.1 Συναρτήσεις πεδίου δυνάμεων

Οι συναρτήσεις αυτές είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες – καθώς είναι οι πρώτες που διατυπώθηκαν – βασίζονται δε σε απλούς όρους ΜΜ και περιγράφουν αλληλεπιδράσεις στην αέρια φάση.

Οι συναρτήσεις αυτές περιγράφουν μόνο τον όρο ΔG_{int} ή ορισμένες φορές οι όροι MM μπορούν να αποτελούν μόνον ένα τμήμα της εξίσωσης (6.1) σε συνδυασμό με όρους που αφορούν στην ελεύθερη ενέργεια διάλυσης και σε συνεισφορές από δονητικές, περιστροφικές και μεταφορικές εντροπίες που σχετίζονται με τους όρους $\Delta G_{solvent}$, ΔG_{rot}, $\Delta G_{t/r}$ της εξίσωσης (6.1), αντίστοιχα.[82,83]

Ένα παράδειγμα τέτοιας συνάρτησης βαθμολογίας αποτελεί η **GoldScore,**[73] που χρησιμοποιείται από το λογισμικό GOLD περιέχει επίσης όρους MM όπως φαίνεται στην εξίσωση (6.2). Ο όρος σύμπλεξης ($V_{complex}$) ή V_{vdW} υπολογίζεται με βάση ένα παραμετροποιημένο δυναμικό Lennard-Jones 8-4, το οποίο επιτρέπει την πλησιέστερη προσέγγιση των σφαιρών van der Waals σε σχέση με το 12-6.

$$\begin{aligned}\Delta G_{bind} \cong V_{interaction} &= V_{complex} + V_{H-bond} + V_{internal} \\ &= \sum_{protein}\sum_{ligand}\left(\frac{A_{ij}}{d_{ij}^{8}} - \frac{B_{ij}}{d_{ij}^{4}}\right) + \sum_{protein}\sum_{ligand}\left[(V_{da} + V_{ww}) - (V_{dw} + V_{aw})\right] \\ &+ \left\{\sum_{ligand}\left(\frac{C_{ij}}{d_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{d_{ij}^{6}}\right) + \sum_{ligand}\frac{1}{2}V\left[1 + \frac{n}{|n|}\cos(|n|\omega)\right]\right\} \quad (6.2)\end{aligned}$$

Ως εκ τούτου, το δυναμικό van der Waals 8-4 του λογισμικού GOLD ευνοεί τον ευκολότερο σχηματισμό κοντινών επαφών μεταξύ υδρόφοβων ομάδων συγκριτικά με το 12-6.

Ο υπολογισμός του δεύτερου όρου βασίζεται στον προσδιορισμό του δυναμικού ζεύγους $V_{pair} = (V_{da} + V_{ww}) + (V_{dw} + V_{aw})$, το οποίο αφορά στην ενέργεια που σχετίζεται με τη μεταφορά της ομάδας δότη και δέκτη από το διάλυμα – που αλληλεπιδρούν με το νερό – στην κατάσταση της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης μέσω δεσμών υδρογόνου ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οπότε εκτοπίζονται τα μόρια νερού.

Η ενέργεια V_{da}είναι άθροισμα δυναμικών Lennard-Jones 8-4 κατάλληλα ρυθμισμένων για αυτήν την αλληλεπίδραση, από όλα τα ζεύγη δότη – δέκτη του συμπλόκου. Η εσωτερική στερική ενέργεια του προσδέτη περιλαμβάνει ένα δυναμικό διασποράς – άπωσης Lennard-

Jones 12-6 κι ένα δυναμικό στρέψης από το πεδίο δυνάμεων Tripos. Η συνάρτηση βαθμολογίας αρχικά βαθμονομήθηκε ώστε να μπορεί να αναπαράγει τις θέσεις και προσανατολισμούς πρόσδεσης για 100 σύμπλοκα πρωτεΐνης – προσδέτη.

6.2.4.2 Εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολογίας

Εξαιτίας της προσεγγιστικής φύσης του προτύπου MM, οι συναρτήσεις βαθμολογίας που αποτελούνται από όρους πεδίων δυνάμεων δεν αποδίδουν σε όλες τις περιπτώσεις.[84] Για το λόγο αυτό καταβλήθηκε προσπάθεια βελτίωσης των αποτελεσμάτων με τις εμπειρικές συναρτήσεις βαθμολογίας. Στις συναρτήσεις αυτές οι διάφοροι όροι της εξίσωσης (6.1) καθώς και οι σχετικές συνεισφορές τους (βάρη) δεν προσδιορίζονται μέσω μιας συνάρτησης, αλλά έχουν τιμές αναφοράς, οι οποίες προσδιορίζονται από την προσαρμογή με συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα.[82,83] Αυτό που μεταβάλλεται από σύστημα σε σύστημα είναι το ποσοστό συμμετοχής κάθε όρου.

Μια ενδιαφέρουσα εμπειρική συνάρτηση βαθμολογίας προτάθηκε αρχικά από τον Böhm, που προσπάθησε να βρει γραμμική εξάρτηση μεταξύ της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης και μιας ποικιλίας όρων και παραμέτρων που προτάθηκε ότι σχετίζονται με τη συνολική ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης και μπορούν να υπολογιστούν γρήγορα.[85] Η εξίσωση (6.3) περιλαμβάνει όλους τους όρους που περιγράφουν τους δεσμούς υδρογόνου, τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις, τις λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις και το ενεργειακό κόστος λόγω ακινητοποίησης των εσωτερικών βαθμών ελευθερίας του προσδέτη (μείωση εντροπίας)

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_0 + \Delta G_{hb} \cdot \sum_{H-bonds} f(\Delta R, \Delta\alpha) + \Delta G_{ionic} \cdot \sum_{ionic\ interactions} f(\Delta R, \Delta\alpha) + \\ + \Delta G_{lipo} \left| A_{lipo} \right| + \Delta G_{rot} NROT \quad (6.3)$$

όπου ΔG_0είναι σταθερά, ανεξάρτητη του συστήματος, που αντιστοιχεί στην αλλαγή της μεταφορικής και περιστροφικής ελεύθερης ενέργειας, αντίστοιχος του όρου $\Delta G_{t/r}$ στην εξίσωση (6.1).

ΔG_{hb}: Αντιστοιχεί στη συνεισφορά από έναν ιδανικό δεσμό υδρογόνου και πολλαπλασιάζεται με μια συνάρτηση ποινής $f(\Delta R, \Delta\alpha)$ η οποία περιγράφει μεγάλες αποκλίσεις του δεσμού υδρογόνου από την ιδανική γεωμετρία. Δ*R* είναι η απόκλιση από την πρότυπη απόσταση ~ (1,8 – 1.9) Å για δεσμό υδρογόνου. Δ*α* είναι η απόκλιση από την πρότυπη γωνία των 180°. Για τους δεσμούς υδρογόνου X – H···Y, το μήκος δεσμού κυμαίνεται μεταξύ (2.5 – 3.2) Å και η γωνία δεσμού υδρογόνου μεταξύ 130° – 180° και σπάνια είναι μικρότερη των 120°.

Ανάλογη γεωμετρική εξάρτηση εμφανίζεται και στις ιοντικές αλληλεπιδράσεις που περιγράφονται από τον τρίτο όρο της εξίσωσης (6.3).

ΔG_{lipo}: Η συνεισφορά από λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις, το μέγεθος των οποίων θεωρείται ανάλογο της επιφάνειας A_{lipo} του υποδοχέα που καλύπτεται από τον προσδέτη, δηλαδή της επιφάνειας επαφής μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη.

ΔG_{rot}: Η απώλεια ελεύθερης ενέργειας που οφείλεται στο «πάγωμα» της περιστροφής των δεσμών του φαρμακομορίου λόγω πρόσδεσης με τον υποδοχέα. Η τιμή αυτή πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών του προσδέτη *NROT*.

Από τη βιβλιογραφία ανακτήθηκαν οι πειραματικές τιμές σταθερών σύνδεσης για 45 σύμπλοκα πρωτεΐνης – προσδέτη και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης για τον προσδιορισμό των παραμέτρων της εξίσωσης (6.4) ώστε να αναπαράγονται οι σταθερές σύνδεσης και οι θέσεις – προσανατολισμοί πρόσδεσης. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν από την ανάλυση αυτή, $\Delta G_{hb} = -1.2\ \mathrm{kcal/mol}$, $\Delta G_{ionic} = -2.0\ \mathrm{kcal/mol}$, $\Delta G_{lipo} = -0.04\ \mathrm{kcal/mol}$, $\Delta G_{rot} = +0.3\ \mathrm{kcal/mol}$, $\Delta G_0 = +1.3\ \mathrm{kcal/mol}$, βρίσκονται κοντά με αυτές που προσδιορίστηκαν με άλλες μεθόδους, με εξαίρεση την ΔG_0 για την οποία είναι αποδεκτή μια τιμή στο διάστημα μεταξύ 7 και 11 kcal/mol. Το μοντέλο αναπαράγει τις πειραματικές σταθερές πρόσδεσης με τυπική απόκλιση 1.7 kcal/mol. Σημειώνεται ότι η εκθετική σχέση μεταξύ ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης και σταθεράς ισορροπίας σημαίνει ότι αλλαγή 1.4 kcal/mol στην ελεύθερη ενέργεια αντιστοιχεί σε 10 φορές αλλαγή στη σταθερά σύνδεσης. Η συνάρτηση βαθμολογίας (6.4) αναφέρεται ως LUDI2 στο λογισμικό Cerius2.

Η παραπάνω ανάλυση προκάλεσε τη διεξαγωγή ανάλογων μελετών που περιλαμβάνουν κάποιες τροποποιήσεις τόσο στις παραμέτρους, στους όρους της εξίσωσης (6.4) και στις πηγές δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μορφής της συνάρτησης όσο και στις στατιστικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν για την εξαγωγή της.[86–88] Έτσι, προέκυψε η συνάρτηση βαθμολογίας του λογισμικού FlexX ή συνάρτηση F-score του λογισμικού Sybyl,[89] η συνάρτηση **ChemScore** που διατυπώθηκε από τον Eldridge και είναι διαθέσιμη στο πρόγραμμα GOLD[87] και οι συναρτήσεις του *Glide* SP και XP.[71,72]

Ένα πιθανό πρόβλημα που σχετίζεται με τις εμπειρικές συναρτήσεις είναι ότι έχουν διατυπωθεί με βάση προσδέτες που συνδέονται πολύ ισχυρά με τον υποδοχέα, ενώ οι υπολογισμοί μοριακής προσάραξης εφαρμόζονται ολοένα και περισσότερο για την αρχική εύρεση προσδετών από μεγάλες βιβλιοθήκες ενώσεων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις – οδηγοί. Το μεγαλύτερο, ωστόσο, μειονέκτημα των εμπειρικών συναρτήσεων είναι ότι η κατασκευή τους βασίστηκε σε συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα, οπότε η εφαρμογή τους σε πολύ διαφορετικά σύμπλοκα να συνεπάγεται πιθανόν μεγάλα σφάλματα.

Η μορφή της εξίσωσης (6.1) είναι γενική όπως έχει ήδη αναφερθεί. Τα περισσότερα συνήθη λογισμικά ταχέων υπολογιστικών μεθόδων προσάραξης, όπως είναι το GOLD ή το Autodock, παραλείπουν από την εξίσωση (6.1) έναν αριθμό όρων που σχετίζονται με συγκεκριμένα φαινόμενα κατά τον υπολογισμό της ενέργειας σύνδεσης και η βαθμολογία είναι σε μεγάλο βαθμό προσεγγιστική. Παραδείγματος χάριν, μια από τις διαδικασίες που συνήθως αγνοείται είναι η απομάκρυνση μορίων του διαλύτη γύρω από τις επιφάνειες του υποδοχέα και προσδέτη που έρχονται σε επαφή. Ομοίως αγνοείται και η απώλεια εντροπίας κατά τη σύνδεση.

Η διατύπωση των περισσότερων ταχέων μεθόδων προσάραξης είχε ως αρχικό στόχο να λειτουργήσουν ως ένα απλό φίλτρο για τη συμπίεση μιας ευρείας βάσης δεδομένων σε μια απλά μεγάλη βάση δεδομένων στην οποία θα μπορούσαν να εφαρμοστούν πιο βελτιωμένες τεχνικές για τον εντοπισμό πιθανών ενώσεων – οδηγών. Νεότερες συναρτήσεις βαθμολογίας περιλαμβάνουν διορθώσεις των παραλείψεων των ενεργειακών όρων που σχετίζονται με την απομάκρυνση του διαλύτη πριν τον σχηματισμό του συμπλόκου.[90]

6.2.4.3 Στατιστικές συναρτήσεις βαθμολογίας

Οι στατιστικές συναρτήσεις (*statistical or knowledge – based scoring functions*) βασίζονται στη γνώση στατιστικών δεδομένων. Η συναρτησιακή τους μορφή διατυπώνεται βάσει π.χ. της γνώσης κατανομής ή της συχνότητας ύπαρξης αποστάσεων μεταξύ συγκεκριμένων ζευγών ατόμων σε πειραματικές δομές προσδέτη – πρωτεΐνης.[82,83] Αφού, λοιπόν, περιγραφούν οι πιθανότερες αποστάσεις μικρής εμβέλειας μεταξύ προσδέτη και πρωτεΐνης στις πειραματικές δομές, κατασκευάζονται ελεύθερες ενέργειες διατομικής αλληλεπίδρασης, των οποίων η άθροιση δίνει μια εκτίμηση της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης.

Χρησιμοποιώντας π.χ. τον φορμαλισμό του Sippl,[91] με τη γνώση της συχνότητας ή πιθανοτικής κατανομής των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων *i* και *j*, μπορούν να κατασκευαστούν τα εξαρτώμενα της απόστασης δυναμικά μέσης δύναμης (*potentials of mean force*) ή ζευγωτά δυναμικά $\Delta W_{ij}(r)$, σύμφωνα με τις εξισώσεις (6.4) και (6.5)

$$\Delta W_{ij}(r) = W_{ij}(r) - W(r) = -\ln\frac{g_{ij}(r)}{g(r)} \quad (6.4)$$

$$g(r) = \sum_i \sum_j g_{ij}(r) \quad (6.5)$$

όπου $g_{ij}(r)$ η κανονικοποιημένη ακτινική συνάρτηση κατανομής για τα άτομα τύπου *i, j,* που η μεταξύ τους απόσταση βρίσκεται στο διάστημα $[r, r + dr]$ και $g(r)$ η κανονικοποιημένη μέση ακτινική συνάρτηση κατανομής για οποιαδήποτε άτομα στο διάστημα $[r, r + dr]$. Η τελευταία αφορά στην κατάσταση στο διάλυμα πριν τον σχηματισμό του συμπλόκου με τον προσδέτη και περιλαμβάνει όλη την «μη ειδική» πληροφορία, η οποία είναι κοινή για όλα τα ζεύγη ατόμων που υπάρχουν στο περιβάλλον της πρωτεΐνης. Η επιλογή της είναι κρίσιμη και διαφέρει στα διάφορα δυναμικά.

Σύμφωνα με την εξίσωση (6.4), η αμιγής στατιστική προτίμηση $\Delta W_{ij}(r)$ προκύπτει ως διαφορά της μέσης στατιστικής προτίμησης W_{ij} των ατομικών τύπων *i, j* από αυτήν της κατάστασης αναφοράς W. Για τον υπολογισμό των παραπάνω δυναμικών έχουν οριστεί διάφοροι ατομικοί τύποι, ανάλογοι με αυτούς των πεδίων δυνάμεων, όπως π.χ. C.3 (sp^3 – C), C.2 (sp^2 – C), C.ar (για αρωματικούς άνθρακες), C.cat (άνθρακας ενωμένος με γουανιδομάδα), O.3 (sp^3 – O), O.2 (sp^2 – O), O.co2 (οξυγόνο καρβονυλικού ανιόντος), κ.ά. Πολλοί από αυτούς τους ατομικούς τύπους έχουν διατυπωθεί για την περιγραφή επαφών δότη – δέκτη δεσμού υδρογόνου από σχετικές κατανομές.

Οι Muege – Martin ανέπτυξαν το **δυναμικό βαθμολογίας μέσης δύναμης** (PMFScore),[92] που δίνεται από την εξίσωση (6.6), με βάση τις κρυσταλλικές δομές 697 συμπλόκων πρωτεΐνης – προσδέτη

$$\Delta W = \sum_{l_j}^{ligand} \sum_{k_i}^{protein} \Delta W_{ij}(r_{ij}) \quad (6.6)$$

όπου το δυναμικό μέσης δύναμης $\Delta W_{ij}(r_{ij})$ ορίζεται βάσει της εξίσωσης (6.4).

Για το πρόβλημα προσάραξης, το άτομο *i* ανήκει στην πρωτεΐνη και καταγράφονται τα κατάλληλα δυναμικά $\Delta W_{ij}(r)$ για αποστάσεις με μέγιστο τα 12 Å, ώστε να συμπεριλαμβάνονται έμμεσα τα φαινόμενα του διαλύτη στις επιφάνειες προσδέτη – πρωτεΐνης – αν και οι ειδικές αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση περιορίζονται σε αποστάσεις ~ 6 Å. Χρησιμοποιούνται 16 πρωτεϊνικοί ατομικοί τύποι και 34 ατομικοί τύποι προσδέτη. Η συνάρτηση PMFScore έχει ενσωματωθεί στο λογισμικό CK4 και στο Cerius2 και προβλέπει ικανοποιητικά πειραματικές απόλυτες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης για 77 σύμπλοκα προσδέτη – πρωτεΐνης.

Όπως διακρίνεται από τις εξισώσεις (6.4) – (6.6), στην ενέργεια πρόσδεσης δεν περιλαμβάνονται συνεισφορές όπως οι διαμορφωτικές αλλαγές και η μείωση της εντροπίας εξαιτίας του περιορισμού της περιστροφικής και μεταφορικής κίνησης, επειδή οι συνεισφορές αυτές αλληλοαναιρούνται κατά τη σύγκριση δύο διαφορετικών προσανατολισμών πρόσδεσης. Ακόμη, δεν περιλαμβάνονται ενεργειακοί όροι που σχετίζονται με τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως οι δυνάμεις van der Waals και τα δυναμικά στρέψης, επειδή οι

σχετικές διαμορφωτικές μεταβολές θεωρείται ότι συνεισφέρουν στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης λιγότερο από 3 kcal/mol.[81]

Το δυναμικό **ASP**[93] είναι δυναμικό ατόμου – ατόμου, προέκυψε από μια βάση δεδομένων πρωτεϊνών – προσδετών και μπορεί να συγκριθεί με το παραπάνω δυναμικό βαθμολόγησης.

Συμπερασματικά, οι πληροφορίες για τη συχνότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των προσδετών και της πρωτεΐνης συλλέγονται αναλύοντας τις υπάρχουσες δομές προσδέτη – πρωτεΐνης της τράπεζας δεδομένων πρωτεϊνών κι αυτά τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για να προκύψουν τα στατιστικά δυναμικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^{Ο}

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

(Free Energy Perturbation Calculations)

7.1 Εισαγωγή

Η ελεύθερη ενέργεια θεωρείται συχνά ως η πιο σημαντική ποσότητα στη θερμοδυναμική. Ο ακριβής προσδιορισμός της ελεύθερης ενέργειας, όπως επίσης και της εντροπίας είναι πολύ δύσκολος ιδιαιτέρως για συστήματα όπως είναι τα υγρά ή τα εύκαμπτα μακρομόρια. Τα συστήματα αυτά έχουν πολλές απεικονίσεις $\mathbf{X}_i(\mathbf{q}_i,\mathbf{p}_i)$ χαμηλής ενέργειας, που χωρίζονται με ενεργειακά φράγματα χαμηλής ενέργειας. Για πολύπλοκα συστήματα, ο προσδιορισμός με ακρίβεια της ελεύθερης ενέργειας με τη βοήθεια προσομοιώσεων MD ή MC δεν είναι εφικτός. Οι προσομοιώσεις αυτές δε συλλέγουν επαρκές δείγμα περιοχών υψηλής ενέργειας που έχουν σημαντική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια λόγω του εκθετικού όρου $exp\frac{E(\mathbf{q},\mathbf{p})}{k_{\mathrm{B}}T}$, βλ. εξίσωση (5.13, §5.8). Για το λόγο αυτό, οι συνήθεις προσομοιώσεις οδηγούνται σε φτωχή σύγκλιση και ανακριβείς τιμές. Όμως, σε μια χημική ή βιοχημική μεταβολή ενδιαφέρουν οι αλλαγές στις τιμές των θερμοδυναμικών συναρτήσεων και όχι οι απόλυτες τιμές τους κι αυτό μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα λόγω αλληλοαναίρεσης σφαλμάτων.

7.2 Μέθοδος Διαταραχών Ελεύθερης Ενέργειας

Έστω ότι για δύο συστήματα A και B πρέπει να υπολογιστεί η διαφορά ελεύθερης ενέργειας με προσομοίωση των συστημάτων κάτω από τις ίδιες συνθήκες, π.χ. ίσο αριθμό μορίων διαλύτη, ίδιο μέγεθος περιοδικού κουτιού προσομοίωσης, κ.λπ.

Σε ένα κανονικό στατιστικό σύνολο, *N* διακρίσιμων σωματίων, η ελεύθερη ενέργεια Helmholtz *A* δίνεται από την εξίσωση (7.1) που περιγράφει ξεκάθαρα τον πιθανοτικό χαρακτήρα προσδιορισμού της ελεύθερης ενέργειας *A*:

$$A = \langle A \rangle = k_B T \ln \frac{1}{Q_{NVT}}$$

$$= k_B T \ln \left[\iint e^{\frac{E(\mathbf{q},\mathbf{p})}{k_B T}} P(\mathbf{q},\mathbf{p}) d\mathbf{q} d\mathbf{p} \right]$$

$$= k_B T \ln \langle e^{\frac{E(\mathbf{q},\mathbf{p})}{k_B T}} \rangle \qquad (7.1)$$

όπου $P(\mathbf{q},\mathbf{p})$ η πιθανότητα να βρεθεί το σύστημα σε ένα σημείο του χώρου φάσης.

Από πλευράς προσομοίωσης, με βάση την εξίσωση (7.1) η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια για την πορεία A $\longrightarrow$ B μπορεί να υπολογιστεί από τις μέσες τιμές $\langle exp \frac{E(\mathbf{q},\mathbf{p})}{k_B T} \rangle$ των συνόλων που προκύπτουν κατά τη διάρκεια προσομοιώσεων MD ή MC από τη δειγματοληψία σημείων M_A του συστήματος A και M_B του συστήματος B, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτουν οι ισότητες (7.2)

$$\langle A \rangle_B - \langle A \rangle_A = k_B T \ln \langle e^{\frac{E_i}{k_B T}} \rangle_B - k_B T \ln \langle e^{\frac{E_i}{k_B T}} \rangle_A$$

$$= k_B T \ln \left(\frac{1}{M_B} \sum_i^{M_B} e^{\frac{E_i}{k_B T}} \right) - k_B T \ln \left(\frac{1}{M_A} \sum_i^{M_A} e^{\frac{E_i}{k_B T}} \right)$$

$$= k_B T \ln \left(\frac{\langle e^{E_i / k_B T} \rangle_A}{\langle e^{E_i / k_B T} \rangle_B} \right) \quad (7.2)$$

όπου E_i η συνολική ενέργεια κάθε στιγμιότυπου ή απεικόνισης ως άθροισμα δυναμικής και κινητικής ενέργειας.

Από την παραπάνω εξίσωση γίνεται αντιληπτό ότι οι μέσες τιμές των συνόλων δεν προσδιορίζονται ως προς τις συνολικές ενέργειες, αλλά ως προς την εκθετική μορφή των συνολικών ενεργειών και είναι εκφρασμένες ως πολλαπλάσια του $k_B T$. Επιπλέον, προσδιορίζεται ο λόγος των αναμενόμενων τιμών, που είναι ίσος με τον αντίστροφο της σταθεράς ισορροπίας για την πορεία A $\longrightarrow$ B. Με αυτόν τον τρόπο, η σημασία των σφαλμάτων στον προσδιορισμό των μέσων τιμών μειώνεται. Παρόλα αυτά η σύγκλιση των αναμενόμενων τιμών είναι αργή και άλλες φορές μη-εφικτή, με τις χαμηλές πιθανότητες των σημείων υψηλής ενέργειας να μετατρέπονται σε σημαντικές εκθετικές συνεισφορές στη

συνάρτηση κατανομής. Όμως, αν τα συστήματα A και B έχουν μικρή διαφορά, τότε η εξίσωση (7.2) οδηγεί στην εξίσωση Zwanzig[94] (7.3), μέσω της οποίας προσεγγίζεται το πρόβλημα και στην οποία βασίζεται ο υπολογισμός διαταραχών ελεύθερης ενέργειας (FEP, Free Energy Perturbation).

$$\Delta A = \langle A \rangle_{\mathrm{B}} - \langle A \rangle_{\mathrm{A}} = k_{\mathrm{B}}T\ln\langle e^{(E_{\mathrm{B}} - E_{\mathrm{A}})/k_{\mathrm{B}}T} \rangle_{\mathrm{A}} \qquad (7.3)$$

όπου έχει αυθαίρετα επιλεγεί ότι η δειγματοληψία έγινε ως προς το σύνολο των απεικονίσεων που λήφθηκαν με προσομοίωση του συστήματος A, από την οποία προσδιορίστηκε η μέση τιμή συνόλου $\langle exp\left[(E_{\mathrm{B}} - E_{\mathrm{A}})/k_{\mathrm{B}}T\right]\rangle$. Ανάλογα μπορεί να υπολογιστούν οι στατιστικές μέσες τιμές που προκύπτουν από την προσομοίωση του συστήματος B.

Ο παραπάνω φορμαλισμός της θερμοδυναμικής διαταραχής προσφέρει μερικά τεράστια πλεονεκτήματα σε σχέση με την εξίσωση (7.2). Ένα από τα πιο σημαντικά είναι ότι όλες οι συνεισφορές στην ενέργεια από αλληλεπιδράσεις διαλύτη – διαλύτη αλληλοαναιρούνται στην ενεργειακή διαφορά επειδή τα σύνολα είναι παρόμοια. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές σε σχέση με τις αλληλεπιδράσεις διαλυμένης ουσίας – διαλύτη, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των μορίων του διαλύτη. Επιπροσθέτως, οι συνεισφορές της κινητικής ενέργειας στους υπολογισμούς αυτούς αλληλοαναιρούνται και η διαφορά ολικής ενέργειας $E_{\mathrm{B}} - E_{\mathrm{A}}$ της εξίσωσης (7.3) γράφεται ως διαφορά δυναμικής ενέργειας, βλέπε εξίσωση (7.4).

$$\Delta A = \langle A \rangle_{\mathrm{B}} - \langle A \rangle_{\mathrm{A}} = k_{\mathrm{B}}T\ln\langle e^{\frac{V_{\mathrm{B}(\mathbf{q})} - V_{\mathrm{A}(\mathbf{q})}}{k_{\mathrm{B}}T}} \rangle_{\mathrm{A}} \quad (7.4)$$

Αν όμως τα συστήματα A και B δεν επικαλύπτονται στο χώρο φάσης τότε η διαφορά ελεύθερης ενέργειας που υπολογίζεται με βάση την (7.4) δε θα είναι ακριβής, διότι δε θα επικαλύπτεται αντιπροσωπευτικά ο χώρος φάσης του συστήματος B κατά την προσομοίωση του συστήματος A. Πιο συγκεκριμένα, το πρόβλημα προκύπτει όταν η διαφορά ενέργειας

μεταξύ των δύο καταστάσεων είναι πολύ μεγαλύτερη από k_BT: $|V_B - V_A| >> k_B$T, βλ. σχέση (7.2).

Σε αυτήν την περίπτωση για να ληφθούν ακριβέστερες προσεγγίσεις της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας μπορεί να εισαχθεί μια κατάσταση 1 που είναι ενδιάμεση των A και B, οπότε ο υπολογισμός της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας βασίζεται στην έκφραση (7.5).

$$\Delta A = \langle A \rangle_B - \langle A \rangle_A = (\langle A \rangle_B - \langle A \rangle_1) + (\langle A \rangle_1 - \langle A \rangle_A) =$$
$$= k_B T \ln \langle e^{V_B - V_1 / k_B T} \rangle + k_B T \ln \langle e^{V_1 - V_A / k_B T} \rangle \quad (7.5)$$

Αν οριστεί η περιοχή 1 ώστε να επικαλύπτεται ικανοποιητικά με τις περιοχές A και B, τότε οι υπολογισμοί θερμοδυναμικής διαταραχής μεταξύ της κατάστασης A και 1, και μεταξύ 1 και B, βελτιώνουν τελικά τη δειγματοληψία του χώρου φάσης της κατάστασης B και λαμβάνεται πιο αξιόπιστη τιμή διαφοράς ελεύθερης ενέργειας. Μια προφανής ενέργεια είναι η χρήση πολλαπλών ενδιάμεσων καταστάσεων για τη μετάβαση από το σύστημα A στο σύστημα B. Είναι πολύ καίριας σημασίας να τονιστεί εδώ ότι όλοι οι ενδιάμεσοι όροι αλληλοαναιρούνται ακριβώς, με αποτέλεσμα τη δυνατή χρήση όσων ενδιάμεσων καταστάσεων χρειάζεται για να ληφθούν καλές επικαλύψεις των χώρων φάσης και κατά συνέπεια αξιόπιστες τιμές της ζητούμενης διαφοράς ελεύθερης ενέργειας.

7.3 Μεταβλητή σύζευξης *λ* – Σταδιοποίηση υπολογισμού διαταραχών ελεύθερης ενέργειας

Για να πραγματοποιηθεί ένας αξιόπιστος υπολογισμός FEP, ο μετασχηματισμός μεταξύ δύο καταστάσεων, μπορεί να χωριστεί σε «μικρά βήματα» χρησιμοποιώντας μια σταθερά σύζευξης *λ* με τιμές στο διάστημα [0,1].

Η σταδιοποίηση αυτή μπορεί να επιτευχθεί μέσω εφαρμογής του παρακάτω συνδυαστικού δυναμικού μέσω μιας μεταβλητής σύζευξης *λ*.

Η εξίσωση (7.6) χρησιμοποιείται από την προσέγγιση όπου κατά τον υπολογισμό συνυπάρχουν και οι δύο τοπολογίες που αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον, χωρίς όμως να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

$$V(\lambda) = \lambda V_B + (1-\lambda)V_A = \lambda V_B + V_A - \lambda V_A \qquad (7.6)$$

Το ποσοστό συμμετοχής κάθε τοπολογίας αλλάζει κατά την πρόοδο του υπολογισμού σύμφωνα με την εξίσωση (7.6). Οι ενδιάμεσες αποστάσεις που αντιστοιχούν σε τιμές λ μεταξύ [0,1] δεν έχουν φυσική σημασία. Από αυτήν προκύπτει η εξίσωση (7.7):

$$\Delta V = V(\lambda) - V_A = \lambda(V_B - V_A) \qquad (7.7)$$

Τα βήματα μήκους dλ μπορούν να έχουν το ίδιο εύρος και για κάθε τιμή του λ μεταξύ του 0 και του 1 πραγματοποιείται μια προσομοίωση MC ή MD. Η φάση εξισορρόπησης γίνεται στην τιμή λ και ακολουθεί η φάση παραγωγής, όπως σε κάθε υπολογισμό MD, κατά την οποία συλλέγονται οι τιμές $V_{\lambda+d\lambda} - V_\lambda$. Η διαφορά ελεύθερης ενέργειας προσδιορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση Zwanzig, που γράφεται για τη μεταβολή $\lambda \longrightarrow \lambda + d\lambda$, με τη μορφή (7.8)

$$\langle A\rangle_{\lambda+d\lambda} - \langle A\rangle_\lambda = k_B T \ln\langle e^{\frac{V_{\lambda+d\lambda}-V_\lambda}{k_B T}}\rangle_\lambda \quad (7.8)$$

Το αναπόφευκτο κόστος για την επιθυμητή και αναπόφευκτη σταδιοποίηση αντιστοιχεί στην εκτέλεση ν προσομοιώσεων αντί της μίας (όπου ν ο αριθμός των βημάτων $\lambda \in [0,1]$). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται διάστημα – διάστημα μέχρι η τιμή του λ από 0 να φτάσει 1, οπότε όλες οι ελεύθερες ενέργειες κατά Helmholtz κάθε διαστήματος αθροίζονται, με το άθροισμα να αντιστοιχεί στη μεταβολή A $\longrightarrow$ B. Έτσι, η σχέση (7.4) για τέτοια πρωτόκολλα FEP γενικεύεται στην εξίσωση (7.9)

$$\Delta A = \langle A\rangle_B - \langle A\rangle_A = \sum_{\lambda=0}^{1} k_B T \ln\langle e^{\frac{V_{\lambda+d\lambda}-V_\lambda}{k_B T}}\rangle_\lambda \quad (7.9)$$

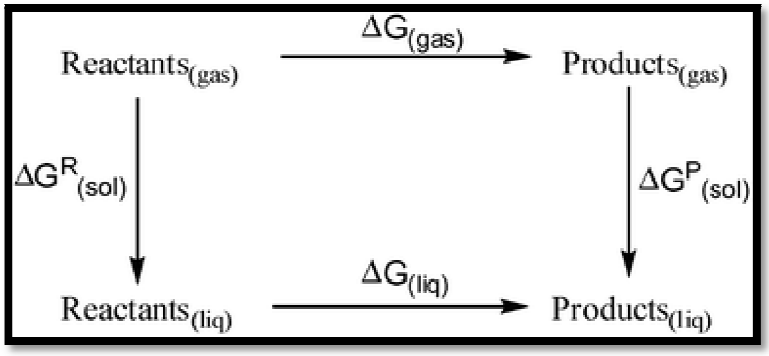
Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι αντί της δημιουργίας νέων συνόλων στην κατεύθυνση $\lambda \longrightarrow \lambda + d\lambda$, η οποία ονομάζεται **πρόσθια δειγματοληψία** (forward sampling), είναι το ίδιο εύκολος ο προσδιορισμός διαφοράς ελεύθερης ενέργειας για την **αντίστροφη δειγματοληψία** $\lambda \longrightarrow \lambda - d\lambda$ (backward sampling). Ενώ, θεωρητικά, η μεταβολή ελεύθερης

ενέργειας για την πορεία A ⟶ B, θα έπρεπε να έχει ακριβώς αντίθετη τιμή από αυτήν που υπολογίζεται για την πορεία B ⟶ A, αυτό σπάνια παρατηρείται στην πράξη. Η διαφορά μεταξύ απόλυτων τιμών $\Delta A_{\mathrm{A}\to\mathrm{B}}$ αφορά στην υστέρηση της μεθόδου και αποτελεί ένα πολύ απλό μέτρο των σφαλμάτων της μεθόδου.

7.4 Κύκλοι Ελεύθερης Ενέργειας

Ο υπολογισμός FEP της ελεύθερης ενέργειας μιας μεταβολής παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες και υπεισέρχεται συχνά σε μεγάλα σφάλματα, όπως για παράδειγμα ο υπολογισμός της διαφοράς στις ελεύθερες ενέργειες διάλυσης (ΔG_{sol}) δύο μορίων στον ίδιο διαλύτη. Η εισαγωγή μιας διαλυμένης ουσίας σε ένα κουτί νερού που έχει επέλθει ισορροπία είναι αρκετά δύσκολη, επειδή ανεξάρτητα από το μέγεθος dλ του πρώτου βήματος, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εισαγωγής των ατόμων της διαλυμένης ουσίας σε περιοχές που οδηγούν σε αφύσικα υψηλές ενέργειες, με αποτέλεσμα το δείγμα να είναι φτωχό. Έτσι, στον υπολογισμό FEP των απόλυτων ελεύθερων ενεργειών για καθένα από τα δύο μόρια, που σχετίζεται με τη διαταραχή που περιγράφει τη μεταφορά του μορίου από την αέρια φάση στο κουτί του νερού, θα υπεισέρχονται μεγάλα σφάλματα. Ως αποτέλεσμα αυτού, το σφάλμα της διαφοράς μεταξύ των δύο απόλυτων (προτύπων) ελεύθερων ενεργειών διάλυσης μπορεί να είναι ακόμη μεγαλύτερο.

Συχνά, προβλήματα που προκύπτουν από σημαντικές πρακτικές δυσκολίες της προσομοίωσης για τον υπολογισμό μιας διαφοράς ελεύθερης ενέργειας, μπορούν να αποφευχθούν μέσω της χρήσης ενός **Θερμοδυναμικού Κύκλου** ή **Κύκλου Ελεύθερης Ενέργειας** (σχήμα 7.1).[95]



Σχήμα 7.1 Κύκλος υπολογισμού μεταβολής ελεύθερης ενέργειας σε διάλυμα. Οι κάθετες γραμμές του κύκλου αντιστοιχούν σε ελεύθερες ενέργειες διάλυσης σε ένα διαλύτη, ενώ οι οριζόντιες σε χημικές μεταβολές. Η διαφορά μεταξύ των κάθετων ποσοτήτων πρέπει να είναι ίση με τη διαφορά των οριζόντιων ποσοτήτων $\Delta G_{(liq)} - \Delta G_{(gas)} = \Delta G^{P}_{(sol)} - \Delta G^{R}_{(sol)}$.

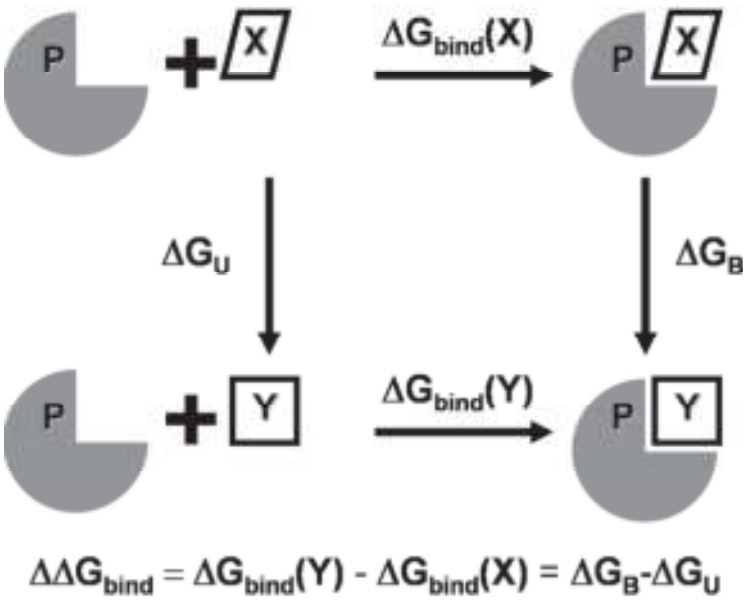
Εξαιτίας της καταστατικής φύσης της ελεύθερης ενέργειας η συνολική μεταβολή της σε έναν πλήρη θερμοδυναμικό κύκλο είναι μηδέν, οπότε για τον κύκλο του παραπάνω σχήματος, ισχύει: $\Delta G_{(liq)} - \Delta G_{(gas)} = \Delta G^{P}_{(sol)} - \Delta G^{R}_{(sol)}$.

Σύμφωνα με μελέτη της ερευνητικής ομάδας του Jorgensen για τη διαφορά στις ελεύθερες ενέργειες διάλυσης της μεθανόλης και του αιθανίου,[96] έγινε η υπόθεση ότι οι αλλαγές στη συνιστώσα της κινητικής ενέργειας κατά τη μετάλλαξη στην αέρια φάση και κατά τη μετάλλαξη στο διάλυμα αλληλοαναιρούνται. Έτσι, δε χρειάζεται ο υπολογισμός των ορμών ή κινητικών ενεργειών, με αποτέλεσμα το μέγεθος του προβλήματος του χώρου φάσης να ελαττώνεται κατά παράγοντα 2. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην §7.2, η απλούστευση αυτή ακολουθείται σε όλους τους σχετικούς μοντέρνους υπολογισμούς που γίνονται με προσομοιώσεις MC ή MD, οπότε προσδιορίζονται μόνο οι διαφορές στη δυναμική ενέργεια μεταξύ των «μεταλλαγμένων» δομών.

Αρκετά μεγάλο, όμως, ενδιαφέρον για την υπολογιστική χημεία παρουσιάζουν πορείες που περιλαμβάνουν τη δυναμική ισορροπία μεταξύ μορίων που συνδέονται με μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις. Είναι γνωστό ότι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης κατά Gibbs σχετίζεται με τη σχέση $\Delta G_{bind} = -RT\ln K$. Αν χρειάζεται να υπολογιστεί η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης δύο διαφορετικών προσδετών X και Y (ή υποστρωμάτων S_1 και S_2), με το μόριο του υποδοχέα P (ή του ενζύμου E), ΔG_U και ΔG_B, ο υπολογισμός καθεμιάς από τις ΔG_U και ΔG_B υπόκειται σε μεγάλα σφάλματα, γιατί περιλαμβάνει τη μεταφορά των διακριτών μορίων του

προσδέτη και του υποδοχέα σε κατάσταση διαμοριακού συμπλόκου Χ – Ρ και Υ – Ρ. Κατά την πορεία ο υποδοχέας, ο προσδέτης και ο διαλύτης υφίσταται μεγάλες αναδιατάξεις, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η αποτελεσματική δειγματοληψία του χώρου φάσης. Για το λόγο αυτό, το πρόβλημα της διαφοράς στις ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης $\Delta G_X - \Delta G_Y$ (ή $\boldsymbol{\Delta\Delta G_{bind}}$), επιλύεται με τη χρήση ενός θερμοδυναμικού κύκλου.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 7.2, η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια $\Delta\Delta G_{bind}$ υπολογίζεται από τη διαφορά $\Delta\Delta G_{bind} = \Delta G_B - \Delta G_U = \Delta G_Y - \Delta G_X$. Οι μεταλλάξεις του προσδέτη Χ στον Υ, τόσο σε διάλυμα όσο και εντός του υποδοχέα, που αντιστοιχούν στις μεταβολές ελεύθερης ενέργειας ΔG_B και ΔG_U, αντίστοιχα, είναι μη πραγματικές και δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν εργαστηριακά. Με τη χρήση, όμως, της υπολογιστικής μεθόδου FEP, οι μεταβολές αυτές μπορούν να περιγραφούν πιο αξιόπιστα και με ακρίβεια, συγκριτικά με τις πραγματικές μεταβολές που περιλαμβάνουν αλλαγές στην ελεύθερη ενέργεια ΔG_U και ΔG_B. Η ακρίβεια της FEP αυξάνει όπως αναλύθηκε ειδικά αν οι δομές των προσδετών Χ και Υ είναι παρόμοιες, διότι στην παραδοχή ότι οι καταστάσεις Α και Β είναι παρόμοιες βασίζεται η προσέγγιση της εξίσωσης Zwanzig.



Σχήμα 7.2 Θερμοδυναμικός Κύκλος για τον υπολογισμό της σχετικής ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης. Με Ρ συμβολίζεται η πρωτεΐνη, Χ και Υ είναι δύο διαφορετικοί προσδέτες. Η ενέργεια σύνδεσης δίνεται από τη σχέση $\Delta\Delta G_{bind} = \Delta G_{bind}(Y) - \Delta G_{bind}(X) = \Delta G_B - \Delta G_U$ [Από την Παραπομπή Ν^o 102].

Για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης των προσδετών πραγματοποιούνται δύο σειρές μεταλλάξεων, για τη σταδιακή μετατροπή του προσδέτη X στον Y στην αδέσμευτη κατάσταση στο νερό και στην κατάσταση συμπλόκου με το βιομόριο. Η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης υπολογίζεται ως $\Delta\Delta G_{bind} = \Delta G_Y - \Delta G_X$.[97,98]

7.5 Εφαρμογές Κύκλων Ελεύθερης Ενέργειας

Όπως, έχει ήδη αναφερθεί, μια ελκυστική εφαρμογή είναι η πρόβλεψη των σχετικών ελεύθερων ενεργειών σύνδεσης αναστολέων βιολογικών μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, το DNA, κ.λπ. Χρησιμοποιούνται δύο ξεχωριστοί υπολογισμοί FEP, όπου προσδιορίζεται η διαφορά ελεύθερης ενέργειας της μετάλλαξης του προσδέτη X προς τον Y σε διάλυμα και εντός του υποδοχέα. Στη συνέχεια παρατίθενται δύο παραδείγματα εφαρμογής κύκλων ενέργειας, όπως απαντώνται στη βιβλιογραφία:

Α) Μια πρώιμη υπολογιστική εργασία[99] αναφερόταν στη μελέτη δύο αναστολέων της θερμολυσίνης, ένα ένζυμο που διασπά τους αμιδικούς δεσμούς σε πεπτίδια και πρωτεΐνες, με γενικό τύπο Z-G^p(X)-L-Leu-L-Leu. Οι πειραματικές τιμές των σταθερών σύνδεσης ήταν 9.1 nM (X = NH) και 9 μM (X = O, δηλαδή το πρώτο μόριο έχει χίλιες φορές καλύτερη πρόσδεση. Η διαφορά αυτή στις σταθερές σύνδεσης αντιστοιχεί σε 4.1 kcal/mol. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι δύο αναστολείς συνδέονται περίπου στην ίδια θέση. Προσομοιώσεις FEP έδωσαν διαφορά ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης περίπου 4.2 kcal/mol, που βρίσκεται σε πολύ καλή συμφωνία με το πειραματικό αποτέλεσμα.

Β) Οι ερευνητικές ομάδες των Α. Κολοκούρη και Ζ. Κούρνια, το 2012, δημοσίευσαν μια μελέτη[100] με υπολογισμούς ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης σε μια σειρά παραγώγων της αμανταδίνης και της ριμανταδίνης στον διαμεμβρανικό δίαυλο της πρωτεΐνης M2 του ιού της influenza. Εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας του ιού στον άνθρωπο, έναντι στα εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα αμανταδίνη και ριμανταδίνη, υπάρχει επιτακτική ανάγκη εύρεσης νέων αντιικών φαρμάκων. Για το λόγο αυτό, η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των παραγώγων της αμανταδίνης θα μπορούσε να βοηθήσει την ανάπτυξη νέων αναστολέων. Έτσι, συνδυάζοντας υπολογισμούς διαταραχών ελεύθερης ενέργειας με προσομοιώσεις μοριακής

δυναμικής (FEP/MD), ήταν δυνατό να αιτιολογηθεί η θερμοδυναμική προέλευση της προτίμησης σύνδεσης των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων στον πόρο A/M2TM. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής είχαν υψηλή συσχέτιση (R^2 = 0.85) με τα πειραματικά δεδομένα, το οποίο δείχνει ότι η μέθοδος αυτή έχει προγνωστική αξία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση υποψήφιων φαρμάκων που προσδένονται σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι αν είναι γνωστή η σταθερά σύνδεσης ενός αναστολέα, μπορεί να προσδιοριστεί με σχετική ακρίβεια με τη μέθοδο FEP, η σταθερά σύνδεσης ενός άλλου αναστολέα ανάλογης δομής.

Η ιδέα για τον υπολογισμό FEP της μετατροπής ενός μορίου X σε ένα άλλο Y[96] και της εφαρμογής της μεθόδου FEP σε υπολογισμούς πρόσδεσης[101] διατυπώθηκε είκοσι χρόνια πριν από τον Jorgensen. Μέχρι το 2000 περίπου, οι υπολογισμοί FEP έβρισκαν κυρίως εφαρμογή στην επιβεβαίωση πειραματικών δεδομένων για μικρό αριθμό αναστολέων εξαιτίας του υψηλού υπολογιστικού κόστους. Σήμερα, εξαιτίας της εξέλιξης στην υπολογιστική ισχύ, οι υπολογισμοί FEP δείχνουν ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν χρησιμοποιούνται και για το σχεδιασμό φαρμακομορίων με βάση τη δομή του υποδοχέα (structure-based design, de novo design).

7.6 Περιορισμοί, τεχνικά χαρακτηριστικά και αστοχίες των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας

Αν και τυπικά αυστηροί, οι υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας μπορούν να αποτύχουν για πολλούς λόγους στην πράξη.[102] Η αποτελεσματική χρήση του μοριακού σχεδιασμού απαιτεί την κατανόηση των περιορισμών των υπαρχόντων πρωτοκόλλων, τα οποία σε γενικές γραμμές, εκδηλώνονται επηρεάζοντας την πιστότητα (*precision*) ή την ακρίβεια (*accuracy)*. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται εν συντομία κάποια τεχνικά σημεία και θα σημειωθούν κάποιες εξελίξεις που χαρακτηρίζουν τους υπολογισμούς ελεύθερης ενέργειας.[103]

1) Οι υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας με *λ*-προσομοιώσεις βασίζονται σε θεμέλια της στατιστικής μηχανικής. Μια μέθοδος *λ*-προσομοίωσης είναι περίπλοκη από τεχνικής πλευράς και πολύ απαιτητική υπολογιστικά κατά την εφαρμογή της σε συστήματα που

περιλαμβάνουν οργανικά και βιολογικά μόρια, αφού κάθε υπολογισμός περιλαμβάνει αρκετές προσομοιώσεις με ενδιάμεσα δυναμικά.

2) Τα σφάλματα που προκύπτουν προέρχονται από ανακρίβειες στη διατύπωση του χρησιμοποιούμενου δυναμικού, το οποίο είναι συνήθως ένα δυναμικό πεδίου δυνάμεων.
3) Δυστυχώς, η δειγματοληψία της κατάστασης Α και η δειγματοληψία του χώρου φάσης του συστήματος Β δεν καλύπτεται πάντα και ο υπολογισμός αξιόπιστων τιμών ελεύθερης ενέργειας δεν είναι πάντα εφικτός.[104]
4) Ένα σημαντικό μειονέκτημα των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας, στις περισσότερες προσομοιώσεις πολύπλοκων συστημάτων, είναι η απουσία ουσιαστικού τρόπου ανάλυσης του σφάλματος που προέρχεται από ανεπαρκή σάρωση του χώρου φάσης. Προσομοιώσεις, όπως για παράδειγμα με τη μέθοδο FEP, αποτελούνται από 10 ή περισσότερες επιμέρους προσομοιώσεις, των οποίων τα σφάλματα αναμένεται να σχετίζονται στενά και να συναθροίζονται στο συνολικό σφάλμα. Επιπροσθέτως, το κόστος σε χρόνο αυτών των προσομοιώσεων είναι τόσο μεγάλο που είναι πολλές φορές αδύνατο μία προσομοίωση είτε να εκτελεστεί με μεγαλύτερη διάρκεια ώστε να εκτιμηθεί η σύγκλιση της ελεύθερης ενέργειας είτε η επανεκτέλεση της προσομοίωσης με διαφορετικές αρχικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό, συχνά, εκτελείται η προσομοίωση με πρόσθια και αντίστροφη δειγματοληψία και εκτιμάται η υστέρηση του διαγράμματος FEP ή η διαφορά στις τιμές των ελευθέρων ενεργειών ως κάτω όριο του σφάλματος.
5) Από πλευράς φορμαλισμού πολλά χαρακτηριστικά των υπολογισμών FEP προσφέρονται περισσότερο για την κωδικοποίηση στον υπολογιστή ενός σχήματος δειγματοληψίας MC παρά ενός σχήματος MD. Παρόλα αυτά όταν οι προσομοιώσει MC εφαρμόζονται σε μεγάλα εύκαμπτα μόρια δίνουν ανεπαρκή αποτελέσματα , επειδή οι περισσότερες κινήσεις απορρίπτονται ως μη ενεργειακά ευνοϊκές, με αποτέλεσμα οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής να είναι η συνηθέστερη επιλογή.
6) Ενώ οι περισσότερες πειραματικές μετρήσεις γίνονται υπό σταθερή πίεση και όχι υπό σταθερό όγκο, στο κεφάλαιο αυτό έγινε η θεμελίωση της μεθόδου υπολογισμού

μεταβολών της ελεύθερης ενέργειας Helmholtz και όχι κατά Gibbs, όπου συνήθως αναφέρονται η πλειοψηφία των θερμοδυναμικών δεδομένων. Επειδή ο συνολικός αριθμός σωματιδίων σε μια προσομοίωση ελεύθερης ενέργειας παραμένει σταθερός, η μεταβολή του όγκου του κλειστού συστήματος είναι μηδενική, δηλαδή $P\Delta V = 0$, και άρα οι μεταβολές στις ελεύθερες ενέργειες Helmholtz και Gibbs ταυτίζονται. Στην περίπτωση, όμως, που αυτό δεν ισχύει πρέπει να γίνουν και οι κατάλληλες προσαρμογές.

7) Πριν από τον υπολογισμό πρέπει να προσδιοριστεί το βήμα dλ, που αντιστοιχεί στη σταθερά σύζευξης *λ*. Τυπικά το dλ τίθεται σε μια σταθερή τιμή κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Είναι σημαντικό να υπάρχει ικανοποιητική επικάλυψη μεταξύ των διαδοχικών καταστάσεων *λ* και λ + dλ, ώστε να ληφθούν αξιόπιστες τιμές. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρά βήματα dλ, όταν η ελεύθερη ενέργεια μεταβάλλεται γρήγορα και μεγάλα βήματα όταν αλλάζει πιο αργά. Σε αυτή την αρχή βασίζεται η μέθοδος των **δυναμικά τροποποιημένων παραθύρων**, όπου η τιμή της κλίσης της καμπύλης ελεύθερης ενέργειας ως προς *λ* χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η τιμή dλ για την επόμενη προσομοίωση *λ* + dλ.

8) Πολλοί υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας περιλαμβάνουν ως διαταραχή του αλχημικού μετασχηματισμού τη διατάραξη από ένα μόριο σε ένα άλλο. Αυτό συνεπάγεται ότι η μοριακή τοπολογία των δύο μορίων αλλάζει, δηλαδή υπάρχουν διαφορετικά άτομα σε κάθε μόριο, τα άτομα συνδέονται με διαφορετικούς τρόπους, κ.λπ. Παράδειγμα μιας τέτοιας μετατροπής είναι η μετατροπή του αιθανίου σε μεθανόλη ($CH_3CH_3 \longrightarrow CH_3OH$). Για το λόγο αυτό, για την περιγραφή του συστήματος χρησιμοποιείται το συνδυαστικό δυναμικό μέσω της **μονής** ή **δυαδικής τοπολογίας** (*single or dual topology coupling)*.[102]

α) Στην προσέγγιση μονής τοπολογίας οι παράμετροι των πεδίων δυνάμεων των προσδετών Χ και Υ παρεμβάλλονται συνήθως γραμμικά. Για να είναι εφικτή η σύζευξη απλής τοπολογίας, οι δύο προσδέτες έχουν διαφορετικό αριθμό ατόμων και προστίθενται «εικονικά» (*dummy*) άτομα, στον ένα ή και στους δύο προσδέτες, τα οποία δε συνεισφέρουν στη δυναμική ενέργεια.

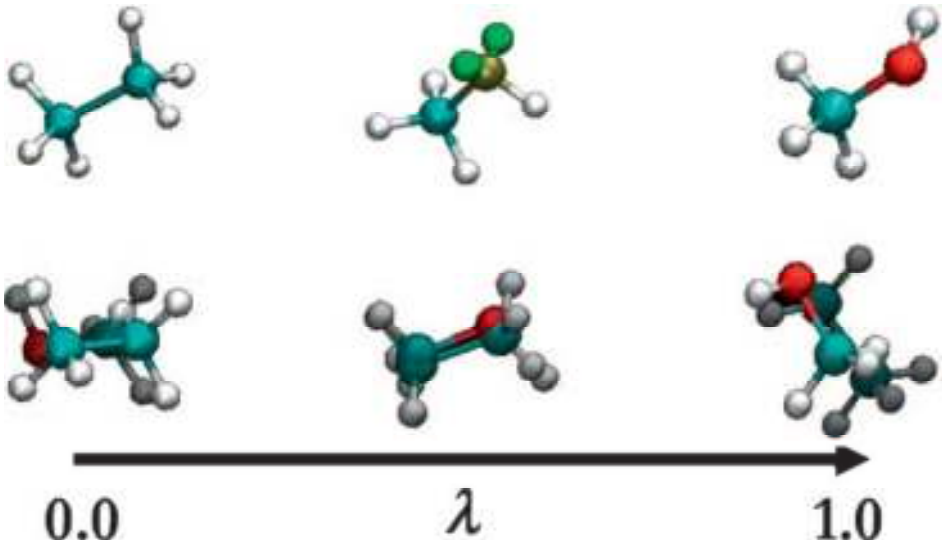
β) Από την άλλη μεριά, στην προσέγγιση δυαδικής τοπολογίας, οι προσδέτες Χ και Υ προσομοιώνονται ταυτόχρονα, αλλά δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και η ενέργεια αλληλεπίδρασής τους με την πρωτεΐνη και τα άτομα του διαλύτη κλιμακώνεται από (1 – *λ*) και *λ*, αντίστοιχα. Στο σχήμα 7.3 φαίνονται οι προσεγγίσεις απλής και δυαδικής τοπολογίας για τη μετατροπή του αιθανίου σε μεθανόλη.

Τυπικά, ένας υπολογισμός ελεύθερης ενέργειας με την προσέγγιση απλής τοπολογίας συγκλίνει πιο γρήγορα, αλλά συχνά δεν είναι πρακτικό να διατυπωθεί ένας τέτοιος υπολογισμός αν οι προσδέτες Χ και Υ είναι δομικά ανόμοιοι, στην οποία περίπτωση πρέπει να προτιμάται η προσέγγιση δυαδικής τοπολογίας. Σε αυτό το σημείο, διευκρινίζεται ότι ανόμοιοι είναι εκείνοι οι προσδέτες που διαφέρουν σημαντικά σε μέγεθος ή σχήμα, που καταλαμβάνουν διαφορετικές περιοχές της περιοχής πρόσδεσης ή εκείνοι που ναι μεν είναι ισοστερείς, αλλά αξιοσημείωτα διαφέρουν στη μοριακή σύνδεση/τοπολογία.

9) Κατά την εφαρμογή της προσέγγισης δυαδικής τοπολογίας προκύπτουν μεγάλα σφάλματα από την κακή συμπεριφορά της συνάρτησης για συγκεκριμένο *λ*, που μπορεί να αντιμετωπιστεί επιτρέποντας διαφορετικά μονοπάτια μετάλλαξης, όπως περιγράφει η εξίσωση (7.10) ως γενικευμένη μορφή της εξίσωσης (7.6).

$$V(\lambda) = \lambda^n V_B + (1-\lambda)^n V_A \quad (7.10)$$

Όπως δημοσιεύθηκε από την ερευνητική ομάδα του van Gunsteren,[105] το πρόβλημα της κακής συμπεριφοράς του δυναμικού μπορεί να αντιμετωπιστεί αν στην παραπάνω εξίσωση το *n* είναι τουλάχιστον 4.



Σχήμα 7.3 Πάνω: Προσέγγιση απλής τοπολογίας για τη μετατροπή ενός μορίου αιθανίου σε ένα μόριο μεθανόλης. Δύο άτομα υδρογόνα συρρικνώνονται σταδιακά (ανοιχτό πράσινο) και τελικά εξαφανίζονται σε ακτίνα van der Waals του ατόμου οξυγόνου του μορίου της μεθανόλης. Κάτω: Στην προσέγγιση δυαδικής τοπολογίας τα δύο μόρια προσομοιώνονται ταυτόχρονα. Οι ενέργειες αλληλεπίδρασης μεταξύ του περιβάλλοντος και των μορίων της μεθανόλης και του αιθανίου ρυθμίζονται από το *λ*, όπως φαίνεται από τη σταδιακή αλλαγή του χρώματος [Από την Παραπομπή N° 102].

10) Οι υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στον προσδιορισμό της διαφοράς στη συγγένεια σύνδεσης ενός συνόλου προσδετών με τον υποδοχέα τους.[98,100,]

Στο πεδίο αυτό αποτελεί την ακριβέστερη μέθοδο, αλλά οι υπολογισμοί είναι αποδεδειγμένα πολύ απαιτητικοί υπολογιστικά. Για να εξαχθεί το αποτέλεσμα $\Delta\Delta G_{bind}$ μεταξύ δύο προσδετών X και Y, πρέπει να υπολογιστούν πολλαπλές τιμές ελεύθερης ενέργειας για τα ενδιάμεσα στάδια, και κάθε τιμή ΔG με τη σειρά της απαιτεί πλήρη δειγματοληψία των βαθμών ελευθερίας πρωτεϊνών, συμπλόκων και του διαλύτη. Ως γενικός κανόνας, σχετικές τιμές ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης για παρόμοιους προσδέτες απαιτούν περίπου 10 προσομοιώσεις ενδιάμεσων σταδίων, με κάθε προσομοίωση να διαρκεί περίπου μία ημέρα. Για τις ερευνητικές ομάδες στη βιομηχανία, σχετικά με την εφαρμογή των υπολογισμών διαφορών ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης ως εργαλείο πρόβλεψης, επικρατεί ο κανόνας πως αν ένας υπολογισμός απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο για ένα υποψήφιο φαρμακοφόρο από αυτόν

που απαιτεί η σύνθεση και ο φαρμακολογικός έλεγχος, τότε δεν πραγματοποιείται. Έτσι, οι υπολογισμοί αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται σε ακαδημαϊκά εργαστήρια, αλλά δεν έχουν ακόμη διαδεδομένη χρήση στη φαρμακευτική βιομηχανία.

11) Παρόλο που η ατομιστική περιγραφή των μορίων του διαλύτη αντιστοιχεί στη χημικά ακριβή περιγραφή του, απαιτεί για μια πρωτεΐνη τη θεώρηση χιλιάδων μορίων νερού με αποτέλεσμα το τεράστιο υπολογιστικό κόστος για υπολογισμούς ελεύθερης ενέργειας. Επιπλέον, επειδή η εξισορρόπηση των μορίων νερού στην περιοχή πρόσδεσης είναι δύσκολη, ειδικά όταν η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε μόρια νερού, είναι δυνατή η εκτέλεση υπολογισμών FEP ή TI με λανθασμένη αρχική κατανομή των μορίων νερού, που έχει δειχτεί ότι μπορεί να επηρεάσει δραματικά τα αποτελέσματα.[106] Για τον περιορισμό του υπολογιστικού κόστους έχουν αναπτυχθεί σχήματα FEP ή TI σε συνδυασμό με συνεχή μοντέλα διάλυσης.[107,108]

12) Μετά από όσα παρουσιάστηκαν στην §5.4 για τη δυσκολία στον υπολογισμό απόλυτων ελεύθερων ενεργειών διάλυσης, πρόσφατα έχει σημειωθεί πρόοδος στο θέμα υπολογισμού ελεύθερων ενεργειών διάλυσης[109] και σύνδεσης.[110]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^{Ο}

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ (*UDORN & WEYBRIDGE*) ΤΗΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM)

8.1 Αντιδραστήρια – διαλύτες

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διατίθενται στην αγορά από τις εταιρίες Sigma-Aldrich, Merck, Alfa, CBL Patras, Novabiochem. Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων είναι μεγαλύτερη από 98% (εκτός εάν δηλώνεται διαφορετικά) και δεν καθαρίστηκαν περαιτέρω. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε κατά την πεπτιδική σύνθεση παρασκευάσθηκε στο Ινστιτούτο «Ραδιοϊσοτόπων & Ραδιοδιαγνωστικών Παραγώγων» του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», ενώ η σύνθεσή τους πραγματοποιήθηκε στο «Δημόκριτο» και στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α. του Αναπλ. Καθηγητή Α. Κολοκούρη.

8.2 Καθαρισμός προϊόντων και έλεγχος καθαρότητας

Μετά την απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη, ακολούθησε λυοφιλοποίηση και καθαρισμός του με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, σύστημα Waters HPLC (Pump 600 E, ανιχνευτής UV-484) εφοδιασμένη με στήλη 7 10 Nucleosil C18 [(12.7×250) mm ID, Macherey – Nagel]. Ο ανιχνευτής UV ρυθμίστηκε στα 200 nm. Η ροή της έκλουσης ήταν 3 mL/min και η μεταβολή του συστήματος έκλουσης (*gradient*) φαίνεται στον Πίνακα 8.1. Επιλέχθηκε σύστημα έκλουσης πλούσιο σε AcCN επειδή τα πεπτίδια M2TM είναι πολύ λιπόφιλα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

Διαλύτης (A): 0.05 %v/v TFA σε H_2O και Διαλύτης (B): 90:10 AcCN:(A)

Για την παρασκευή των διαλυτών αυτών χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό, το οποίο παραλήφθηκε από συσκευή Barnstead EASY pure UV.

Πίνακας 8.1: Μεταβολή σύστασης του συστήματος έκλουσης της ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC. Ο διαλύτης (A) ήταν 0.05 %v/v TFA σε NaCl 0.1 M, ενώ ο (B) 90 %v/v CH_3CN σε 10 % v/v (A).

Χρόνος (min)	%A	%B
0	75	25
4	60	40
5	60	40
120	0	100
127	0	100
129	100	0

Εν συνεχεία, ο έλεγχος καθαρότητας του πεπτιδίου, που παραλήφθηκε από την ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, πραγματοποιήθηκε με αναλυτική RP-HPLC της Waters (Pump 616 E, 996 PDA) σε θερμοκρασία δωματίου. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Symmetry 300 RP C4 [5 μm, (4.6×250) mm ID], η ταχύτητα ροής της ανάλυσης ήταν 1 mL/min, ενώ η μεταβολή της σύστασης του συστήματος έκλουσης φαίνεται στον Πίνακα 8.2. Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε στα 220 nm και 280 nm.

Πίνακας 8.2: Μεταβολή σύστασης του συστήματος έκλουσης της αναλυτικής RP-HPLC. Ο διαλύτης (A) ήταν 0.05 %v/v TFA σε NaCl 0.1 M, ενώ ο (B) 90 %v/v CH_3CN σε 10 % v/v (A).

Χρόνος (min)	%A	%B
0	80.00	20.00
1	80.00	20.00
30	20.00	80.00
33	100.00	0.00
35	80.00	20.00
40	80.00	20.00

8.3 Χαρακτηρισμός των προϊόντων

Για την ταυτοποίηση των πεπτιδίων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία μάζας.

Τα φάσματα μάζας λήφθηκαν σε φασματόμετρο ESI Navigator Finnigan και η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε με το φασματόμετρο μάζας ιονισμού μέσω λεκτροψεκασμού (ESI-MS)

Finnigan AQA Thermoquest στο Ινστιτούτο «Ραδιοϊσοτόπων & Ραδιοδιαγνωστικών Παραγώγων» του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».

8.4 Γενική πορεία πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης

Παρακάτω περιγράφεται η γενική πορεία σύνθεσης που ακολουθήθηκε κατά τη σύνθεση τόσο της αλληλουχίας Udorn όσο και της αλληλουχίας Weybridge.

Βήμα 1°: Τοποθετείται σε σύριγγα, ζυγισμένη ποσότητα ρητίνης GAMP 0305075020. Η ειδική αυτή σύριγγα αποτελείται στο κάτω μέρος της από ηθμό που χρησιμεύει στη συγκράτηση της ρητίνης.

Βήμα 2°: **Προσθήκη συνδέτη**

Ακολουθεί η προσθήκη του συνδέτη, βλ. (σχήμα 3.7, §3.4.2). Ο συνδέτης που χρησιμοποιήθηκε είναι μια βενζυδρυλαμίνη [*Rink amide linker* ή 4-(*R*,*S*)-1-(9*H*-φλουορεν-9-υλο)μεθοξυφορμαμιδο-2,4-διμεθοξυβενζυλοφαινοξυοξικό οξύ]. Με τη χρήση αυτού του ενδιάμεσου μορίου συνδέτη, τα πεπτίδια θα συντεθούν με κατεύθυνση από το C-τελικό προς το N-τελικό άκρο και η αμινομάδα θα είναι Fmoc προστατευμένη. Αρχικά, η ρητίνη διογκώνεται προσθέτοντας CH_2Cl_2 (2×1min) και DMF (5×1min). Η ποσότητα του συνδέτη που απαιτείται, μαζί με την ποσότητα Oxyma διαλυμένο σε DMF – που απαιτείται για τη σύζευξη – προστίθενται σε φιαλίδιο σύζευξης. Ακολούθως, προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα DIC και το διάλυμα τοποθετείται στο ψυγείο για 4 min. Εν συνεχεία, το διάλυμα αναρροφάται με τη σύριγγα και αφήνεται να αντιδράσει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Σημειώνεται ότι πριν την αντίδραση σύζευξης εξάγεται μικρή ποσότητα ρητίνης από τη σύριγγα σύζευξης με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την παρουσία ελεύθερων αμινομάδων (δοκιμασία *Kaiser*, βλ. αναλυτικά Βήμα 7°).

Βήμα 3°: Ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης με DMF (5×1min) και εν συνεχεία πραγματοποιείται έλεγχος ελεύθερων αμινομάδων (βλ. Βήμα 7°). Εάν ο έλεγχος αυτός είναι αρνητικός είναι ένδειξη ότι ο συνδέτης έχει συμπλεχθεί επιτυχώς με τη ρητίνη.

Βήμα 4°: **Απομάκρυνση Fmoc προστατευτικής ομάδας**

Προστίθεται διάλυμα πιπεριδίνης 20% v/v σε DMF σε ποσότητα τέτοια ώστε να καλύπτει τη ρητίνη σε διπλάσιο όγκο και το διάλυμα αναδεύεται για 10 min. Στη συνέχεια το διάλυμα της αποπροστασίας διηθείται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Ο έλεγχος της αποπροστασίας γίνεται με φασματοφωτόμετρο με τη λάμπα να είναι ρυθμισμένη στα 301 nm, που απορροφά η Fmoc ομάδα, βλ. (σχήμα 3.8, §3.4.3).

Μετά το τέλος της αποπροστασίας η ρητίνη εκπλύνεται (10×1 min) με DMF και λαμβάνεται δείγμα για έλεγχο ελεύθερων αμινομάδων (δοκιμασία *Kaiser*, βλ. αναλυτικά Βήμα 7°).

Βήμα 5°: **Ζύγισμα και Αγκυροβόληση (*anchoring*) πρώτου αμινοξέος**

Σε διαφορετικά φιαλίδια σύζευξης ζυγίζονται η ποσότητα του αμινοξέος που απαιτείται καθώς και η απαιτούμενη ποσότητα του Oxyma. Ακολούθως στο φιαλίδιο που περιέχει το Oxyma προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα του διαλύτη DMF. Εν συνεχεία προστίθεται το διάλυμα του Oxyma στο αμινοξύ και το διάλυμα τοποθετείται σε παγόνερο για 10 min. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται η υπολογισμένη ποσότητα DIC και τοποθετείται σε παγόνερο για ακόμη 4 min προς αποφυγή ρακεμίωσης του σχηματιζόμενου εστέρα. Μετά το πέρας των 4 min, το διάλυμα αναρροφάται με τη σύριγγα και αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (σχήμα 3.9, §3.4.4).

Βήμα 6°: Σταματώντας την ανάδευση, το πολυμερές εκπλύνεται (5×1 min) DMF και λαμβάνεται δείγμα για δοκιμασία *Kaiser.*

Βήμα 7°: **Δοκιμασία νινυδρίνης (**ή **δοκιμασία *Kaiser*)** και **δοκιμασία χλωρανίλης (*Chloranil test*)**

Στους δοκιμαστικούς σωλήνες που έχει τοποθετηθεί ποσότητα του πολυμερούς μετά την αποπροστασία και τη σύζευξη, αντίστοιχα, τοποθετούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια με σειρά I, II και III και σε αναλογία 2:1:1. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε αμμόλουτρο στους 100°C για 5 min και ακολούθως παρατηρείται αν υπάρχουν μπλε

χρωματισμένες σφαίρες ρητίνης, που οφείλονται στην ένωση του σχήματος 8.1.[111] Στη δοκιμασία αυτή δίνουν αρνητικώς εσφαλμένη (*false negative*) ένδειξη τα αμινοξέα σερίνη, ασπαραγίνη και ασπαρτικό οξύ, εκ των οποίων η σερίνη και το ασπαρτικό οξύ υπάρχουν στα συντιθέμενα πεπτίδια. Για το λόγο αυτό στις περιπτώσεις αυτές πραγματοποιείται η δοκιμασία χλωρανίλης σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 min, όπου παρατηρείται αν σχηματίζεται διάλυμα χρώματος πράσινο.[112,113]

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμασία νινυδρίνης είναι:

Kaiser I: 20 g καθαρής φαινόλης σε 5 mL απόλυτης EtOH.

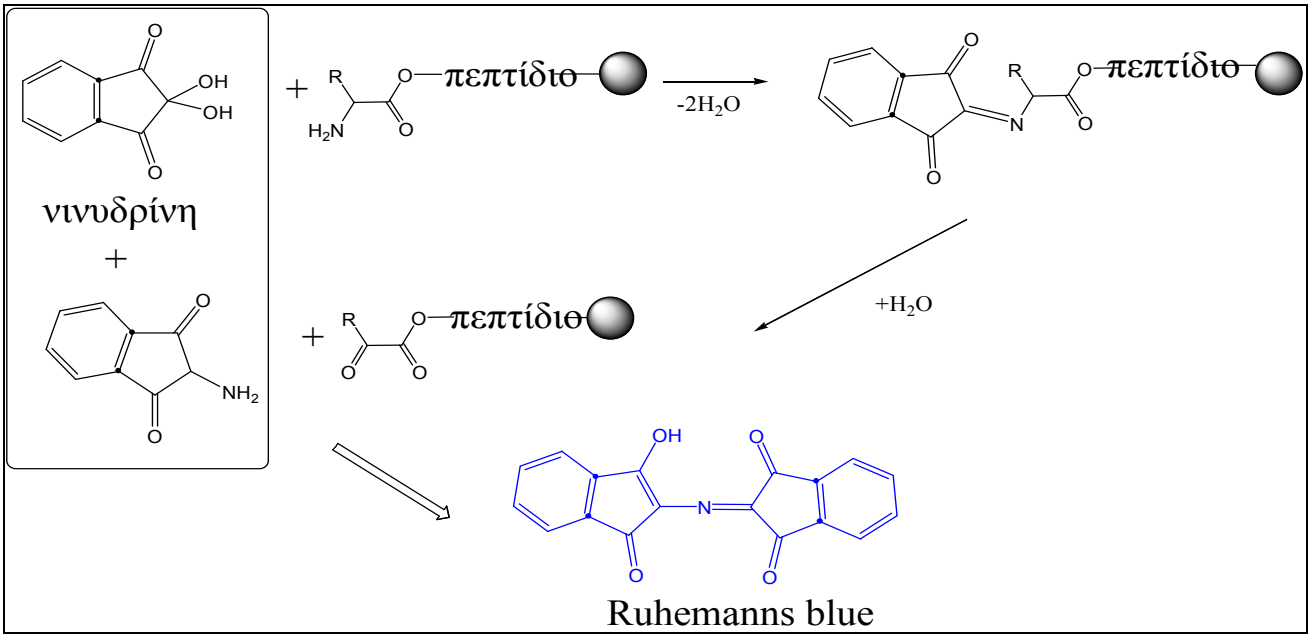
Kaiser II: 200 μL υδατικού διαλύματος 0.0001 M KCN σε 10 mL πρόσφατα απεσταγμένης πυριδίνης πάνω από νινυδρίνη.

Kaiser III: 500 mg καθαρής νινυδρίνης σε 10 mL απόλυτης EtOH.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία χλωρανίλης είναι:

Chloranil I: 2% v/v π-χλωρανίλης σε DMF

Chloranil II: 2% v/v ακεταλεδεΰδη σε DMF



Σχήμα 8.1 Αντιδράσεις που πραγματοποιούνται με την πεπτιδορητίνη κατά την προσθήκη των αντιδραστηρίων *Kaiser* προς σχηματισμό της ένωσης που δίνει το χαρακτηριστικό μπλε του Ruhemanns κατά την παρουσία ελεύθερων αμινομάδων.

<u>Βήμα 8°:</u> Αν η δοκιμασία νινυδρίνης ήταν αρνητική (ή της χλωρανίλης που το αμινοξύ που προστέθηκε ήταν Fmoc-Ser ή Fmoc-Asp), δηλαδή δεν έδειξε την παρουσία ελεύθερων αμινομάδων, η διαδικασία συνεχίζεται με τη σύζευξη του δεύτερου αμινοξέος, επαναλαμβάνοντας τα βήματα 4 – 7, τόσες φορές όσα τα εναπομείναντα αμινοξέα μέχρι την ολοκλήρωση της σύνθεσης.

Αν ωστόσο η δοκιμασία αυτή έδειξε την παρουσία ελεύθερων αμινομάδων, τότε <u>χωρίς</u> να αποπροστατευθεί το αμινοξύ που μόλις προστέθηκε, πραγματοποιείται διπλή σύζευξη (*double coupling*) προσθέτοντας ποσότητα αμινοξέος ίση με τη μισή που είχε αρχικά υπολογισθεί, επαναλαμβάνοντας το βήμα 5. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται νέα δοκιμασία νινυδρίνης (ή χλωρανίλης για τα σχετικά αμινοξέα). Εάν η δοκιμασία αυτή δε δώσει αυτή τη φορά παρουσία ελεύθερων αμινομάδων, τότε η πορεία σύνθεσης επαναλαμβάνεται όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Από τα προηγούμενα γίνεται αντιληπτό ότι η δοκιμασία *Kaiser* αποτελεί και ποσοτικό έλεγχο της σύζευξης παρόλο που αυτός δεν είναι απαραίτητος σε μια πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης ρουτίνας.[114] Διαφορετικά

πραγματοποιείται ακετυλιώση των αμινομάδων (*capping*) που δεν αντέδρασαν, γιατί διαφορετικά θα προέκυπταν μίγματα πεπτιδίων διαφορετικών αλυσίδων.

Για την ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει DMF:Ac_2O:DIEA σε αναλογία 1:1:1, το οποίο προστίθεται στη ρητίνη και το διάλυμα αναδεύεται για διάστημα (20 – 30) min. Στη συνέχεια, ακολουθεί διήθηση του διαλύματος ακετυλίωσης και έκπλυση (5×1 min) DMF πριν την προσθήκη του επόμενου αμινοξέος.

Βήμα 9°: Μετά την προσθήκη του τελευταίου αμινοξέος, ακολουθεί αποπροστασία της τελευταίας Fmoc προστατευτικής ομάδας, ξήρανση της ρητίνης με (7×1 min) DCM, (2×1 min) πετρελαϊκό αιθέρα και αφήνεται σε αντλία κενού για περίπου 10 min. Ακολουθεί αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη.

Βήμα 10°: **Αποκοπή πεπτιδίου από τη ρητίνη (*Cleavage*)**

Η επιλογή του μίγματος κοπής γίνεται με βάση την αμινοξική αλληλουχία των πεπτιδίων. Το μίγμα αποκοπής προστίθεται στη ρητίνη με το πεπτίδιο και το σύστημα αφήνεται να αντιδράσει για 2 ώρες (σχήμα 3.10, §3.4.5). Μετά το πέρας των 2 ωρών η ρητίνη διηθείται και το μίγμα αντίδρασης λαμβάνεται σε σφαιρική φιάλη. Στη συνέχεια, η ρητίνη εκπλύνεται (2×) με μικρή ποσότητα TFA και τα υγρά έκπλυσης συλλέγονται σε σφαιρική φιάλη.

Το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώνεται υπό κενό και στη συνέχεια στη σφαιρική φιάλη προστίθεται διαιθυλαιθέρας. Το συνολικό διήθημα αφήνεται μερικά λεπτά στον πάγο προς καταβύθιση του πεπτιδίου και ακολουθεί μια σειρά τεσσάρων φυγοκεντρήσεων οπότε το ακατέργαστο πεπτίδιο παραλαμβάνεται ως άμορφο ίζημα.

Το ακατέργαστο πεπτίδιο ξηραίνεται σε ξηραντήρα υψηλού κενού υπεράνω P_2O_5 για 18 ώρες. Ακολουθεί καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC (RP-HPLC, *Reverse Phase – High Pressure Liquid Chromatography*) και λυοφιλοποίηση των κλασμάτων που συλλέχθηκαν με το καθαρό πεπτίδιο.

8.5 Σύνθεση του 25-πεπτιδίου Udorn (WT)

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε με βάση τη στρατηγική Fmoc. Η σύνθεση του πεπτιδίου, αλληλουχίας Udorn έγινε σύμφωνα με την παρακάτω αλληλουχία

$$S^{22}\,S^{23}\,D^{24}\,P^{25}\,L^{26}\,V^{27}\,V^{28}\,A^{29}\,A^{30}\,S^{31}\,I^{32}\,I^{33}\,G^{34}\,I^{35}\,L^{36}\,H^{37}\,L^{38}\,I^{39}\,L^{40}\,W^{41}\,I^{42}\,L^{43}\,D^{44}\,R^{45}\,L^{46}$$

8.5.1 Απαιτούμενες ποσότητες

Χρησιμοποιήθηκε ρητίνη ποσότητας 300 mg με χωρητικότητα (*capacity*) 0.5 mmol/g. Για την αποπροστασία κάθε αμινοξέος από την Fmoc προστατευτική ομάδα χρησιμοποιήθηκαν (3 mL/300 mg ρητίνης) διαλύματος πιπεριδίνης 20% v/v σε DMF.

Οι απαιτούμενες ποσότητες των προστιθέμενων αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης φαίνονται στον Πίνακα 8.3 και αντιστοιχούν σε 0.7 mmol αυτών. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν (101 mg, 0.7 mmol) Oxyma pure και (0.7 mmol, 138 μL) DIC. Η απαιτούμενη ποσότητα DMF για την ενεργοποίηση κάθε αμινοξέος ήταν ίση με 2.8 mL. Επισημαίνεται ότι όλες οι ποσότητες των αμινοξέων, διαλύτη DMF, DIC και Oxyma pure που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης αντιστοιχούν σε 4 eq ως προς τη χωρητικότητα της ρητίνης. Στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε ακετυλίωση των αμινομάδων που δεν αντέδρασαν χρησιμοποιήθηκαν 450 μL από DMF, Ac_2O και DIEA, ενώ για τη δοκιμασία νινυδρίνης (βλ. Βήμα 7°, §8.4) οι ποσότητες είναι σε σταγόνες.[111]

Πίνακας 8.3 Απαιτούμενες ποσότητες Fmoc αμινοπροστατευμένων αμινοξέων για τη σύνθεση του 25-πεπτιδίου M2TM αλληλουχίας Udorn (22 – 46) της πρωτεΐνης M2. Οι ποσότητες αντιστοιχούν σε 4 eq αμινοξέος για ρητίνη χωρητικότητας 0.5 mmol/g. Σε παρένθεση αναγράφεται η προστατευτική ομάδα της πλευρικής ομάδας R του αμινοξέος.

Αμινοξέα	Ποσότητες αμινοξέων
Fmoc-Leu-OH	236 mg
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	433 mg
Fmoc-Asp(^{t}Bu)-OH	275 mg
Fmoc-Ile-OH	236 mg
Fmoc-Trp-OH	284 mg
Fmoc-His(Trt)-OH	412 mg
Fmoc-Gly-OH	198 mg
Fmoc-Ser(^{t}Bu)-OH	255 mg
Fmoc-Ala-OH	219 mg
Fmoc-Val-OH	226 mg
Fmoc-Pro-OH	283 mg

8.5.2 Αποκοπή του πεπτιδίου Udorn από τη ρητίνη

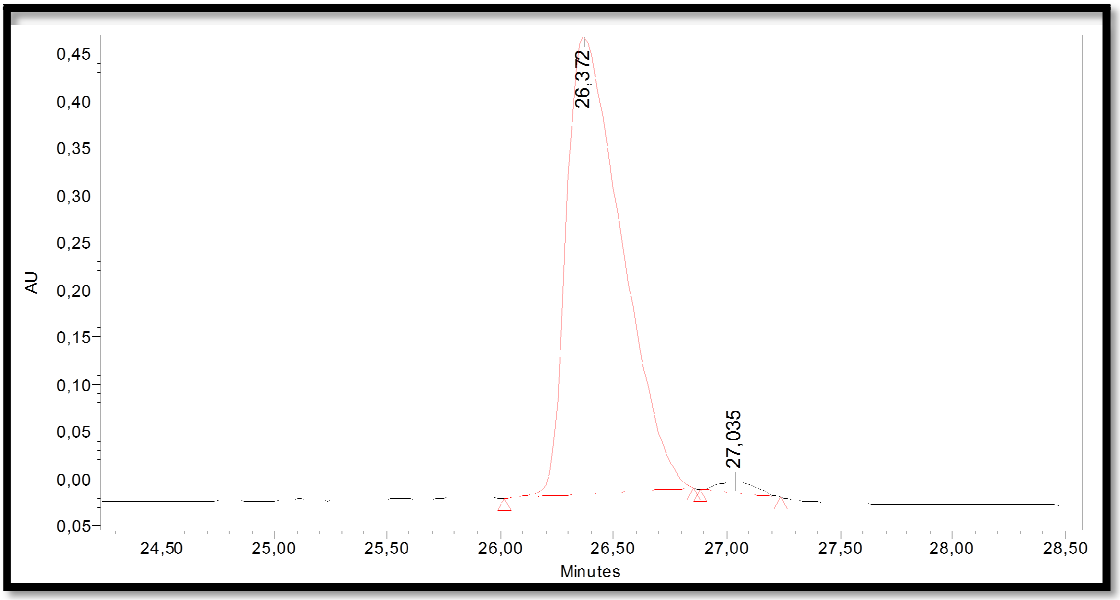
Για το συγκεκριμένο πεπτίδιο χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω μίγμα αποκοπής TFA/H_2O/TIPS σε αναλογία 95:2.5:2.5 (v/v/v). Για μεγαλύτερη ακρίβεια παρασκευάσθηκαν 200 μL μίγματος αποκοπής και λήφθησαν τα 100 μL. Το μίγμα αποκοπής προστίθεται στη ρητίνη – πεπτίδιο και το σύστημα αφήνεται να αντιδράσει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 2 ωρών, προστίθενται 500 μL TFA, το διάλυμα αναδεύεται και στη συνέχεια διηθείται σε σφαιρική φιάλη. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και μετά τη συμπύκνωση το πεπτίδιο καταβυθίζεται οπότε και φυγοκεντρείται για ~ 12.5 min με (3×15) mL Et_2O στις 6000 στροφές. Ακολούθησε λυοφιλοποίηση.

Υποκίτρινο στερεό: Απόδοση (ακατέργαστο) 80% (370 mg).

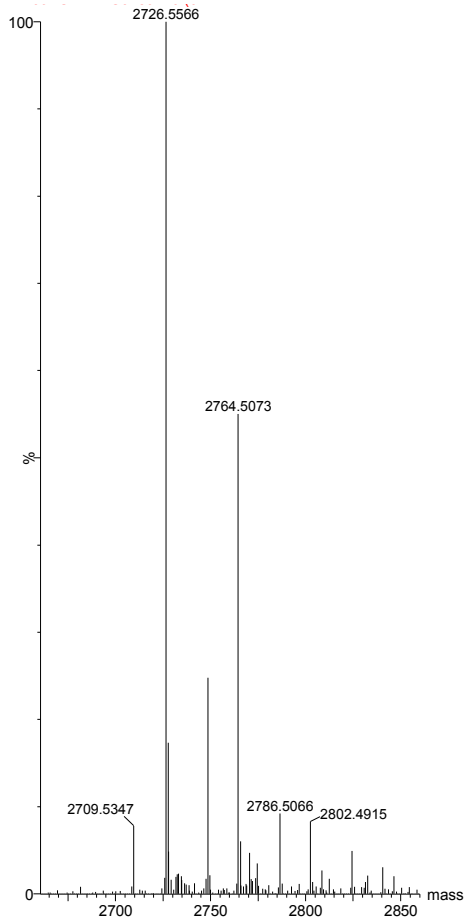
8.5.3 Καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίου

Στο σχήμα 8.2 φαίνεται το αναλυτικό φάσμα που λήφθηκε από την RP-HPLC, ενώ στο σχήμα 8.3 το φάσμα μάζας του που λήφθηκε μετά τον καθαρισμό και τη λυοφιλοποίηση των

κλασμάτων που περιείχαν το καθαρό πεπτίδιο. Ο χρόνος ανάσχεσης αντιστοιχεί σε R_f = 26.37 min και το ποσοστό καθαρότητάς του ήταν ~ 98 %.



Σχήμα 8.2 Αναλυτικό χρωματογράφημα RP-HPLC του πεπτιδίου αλληλουχίας Udorn μετά τον καθαρισμό. Σημειώνεται ο χρόνος έκλουσής του.



Σχήμα 8.3 Φάσμα ESI-MS του πεπτιδίου αλληλουχίας Udorn μετά τον καθαρισμό του.

8.6 Σύνθεση του 25-πεπτιδίου Weybridge (WT)

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε με βάση τη στρατηγική Fmoc. Η σύνθεση του πεπτιδίου, αλληλουχίας Weybridge έγινε σύμφωνα με την παρακάτω αλληλουχία

$S^{22}\,S^{23}\,D^{24}\,P^{25}\,L^{26}\,V^{27}\,\mathbf{V}^{28}\,A^{29}\,A^{30}\,S^{31}\,I^{32}\,I^{33}\,G^{34}\,I^{35}\,L^{36}\,H^{37}\,\mathbf{F}^{38}\,I^{39}\,L^{40}\,W^{41}\,I^{42}\,L^{43}\,D^{44}\,R^{45}\,L^{46}$

Το πεπτίδιο αυτό φέρει δύο μεταλλάξεις σε σχέση με το WT πεπτίδιο (αλληλουχίας Udorn), τις V28I και L38F.

8.6.1 Απαιτούμενες ποσότητες

Χρησιμοποιήθηκε ρητίνη ποσότητας 270 mg με χωρητικότητα (*capacity*) 0.5 mmol/g. Για την αποπροστασία κάθε αμινοξέος από την Fmoc προστατευτική ομάδα χρησιμοποιήθηκαν (2.7 mL/270 mg ρητίνης) διαλύματος πιπεριδίνης 20 %v/v σε DMF.

Οι απαιτούμενες ποσότητες των προστιθέμενων αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης φαίνονται στον Πίνακα 8.4 και αντιστοιχούν σε 0.67 mmol αυτών. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν (102 mg, 0.7 mmol) Oxyma pure και (0.7 mmol, 138 μL) DIC. Η απαιτούμενη ποσότητα DMF για την ενεργοποίηση κάθε αμινοξέος ήταν ίση με 2.8 mL. Επισημαίνεται ότι όλες οι ποσότητες των αμινοξέων, διαλύτη DMF, DIC και Oxyma pure που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης αντιστοιχούν σε 4 eq ως προς τη χωρητικότητα της ρητίνης. Στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε ακετυλίωση των αμινομάδων που δεν αντέδρασαν χρησιμοποιήθηκαν 450 μL από DMF, Ac_2O και DIEA, ενώ για τη δοκιμασία νινυδρίνης (βλ. Βήμα 7°, §8.4) οι ποσότητες είναι σε σταγόνες.[111]

Πίνακας 8.4 Απαιτούμενες ποσότητες Fmoc αμινοπροστατευμένων αμινοξέων για τη σύνθεση του 25-πεπτιδίου M2TM αλληλουχίας Weybridge (22 – 46) της πρωτεΐνης M2. Οι ποσότητες αντιστοιχούν σε 4 eq αμινοξέος για ρητίνη χωρητικότητας 0.5 mmol/g. Σε παρένθεση (όπου δηλώνεται) αναγράφεται η προστατευτική ομάδα της πλευρικής ομάδας R του αμινοξέος.

Αμινοξέα	Ποσότητες αμινοξέων (mg)
Fmoc-Leu-OH	236
Fmoc-Arg-(Pbf)-OH	433
Fmoc-Asp(^{t}Bu)-OH	275
Fmoc-Ile-OH	236
Fmoc-Trp-OH	284
Fmoc-Phe-OH	258
Fmoc-His(Trt)-OH	412
Fmoc-Gly-OH	198
Fmoc-Ser(^{t}Bu)-OH	255
Fmoc-Ala-OH	219
Fmoc-Val-OH	226
Fmoc-Pro-OH	283

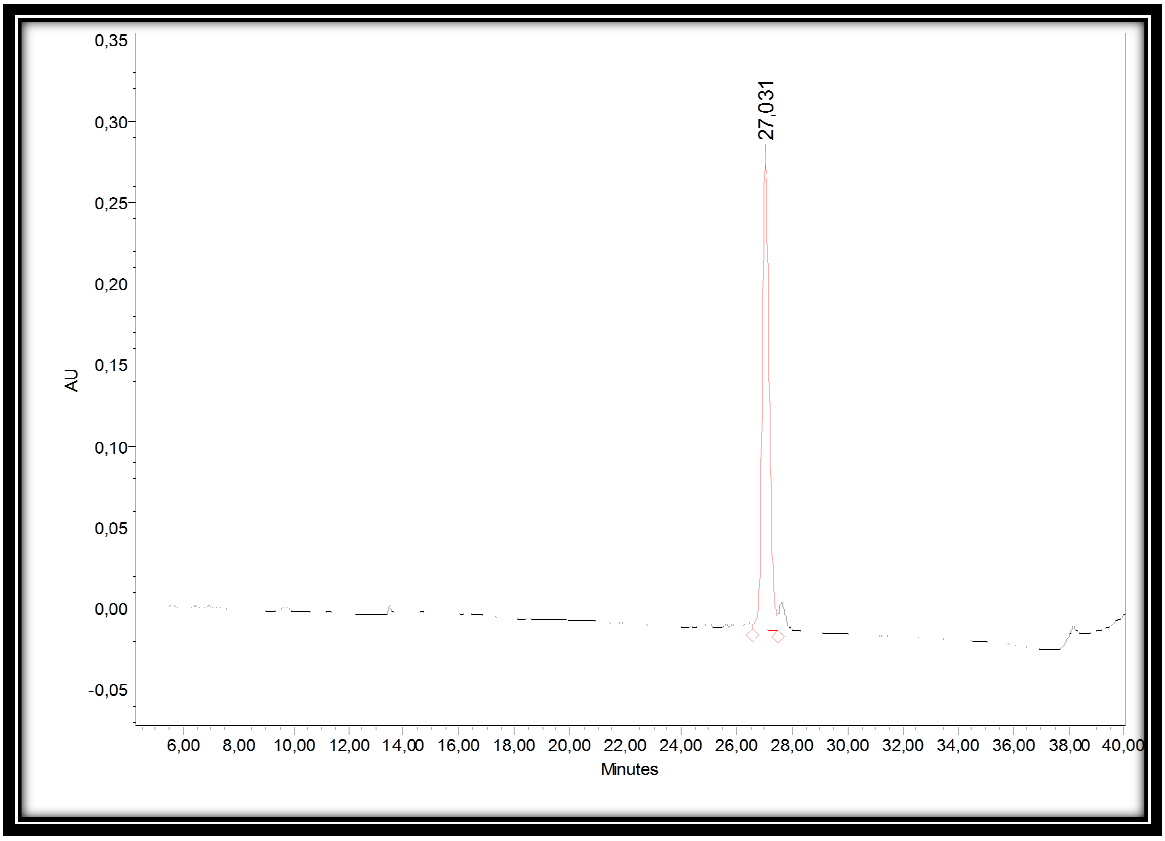
8.6.2 Αποκοπή του πεπτιδίου Weybridge από τη ρητίνη

Για το συγκεκριμένο πεπτίδιο χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω μίγμα αποκοπής TFA/H_2O/TIPS σε αναλογία 95:2.5:2.5 (v/v/v). Για μεγαλύτερη ακρίβεια παρασκευάσθηκαν 200 μL μίγματος αποκοπής και λήφθησαν τα 100 μL. Το μίγμα αποκοπής προστίθεται στη ρητίνη και το σύστημα αφήνεται να αντιδράσει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας των 2 ωρών, προστίθενται 500 μL TFA, το διάλυμα αναδεύεται και στη συνέχεια διηθείται σε σφαιρική φιάλη. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και μετά τη συμπύκνωση το πεπτίδιο καταβυθίζεται οπότε και φυγοκεντρείται για ~ 12.5 min με (3×15) mL Et_2O στις 6,000 στροφές. Ακολούθησε λυοφιλοποίηση.

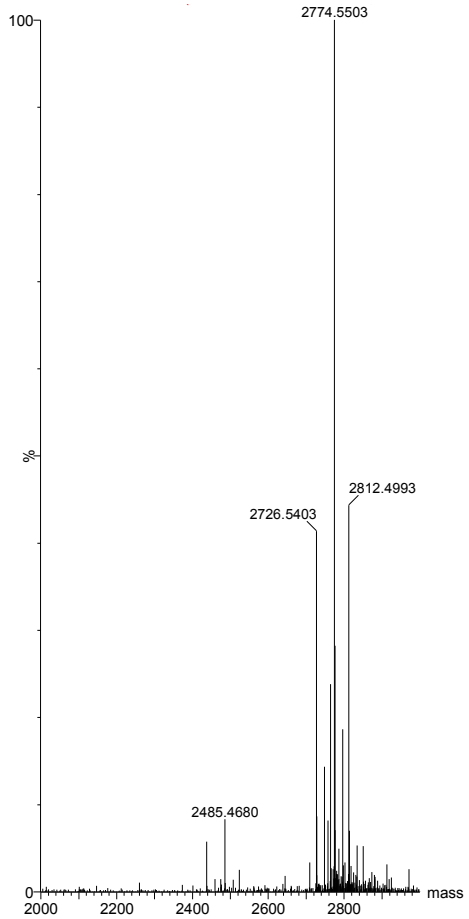
Υποκίτρινο στερεό: Απόδοση (ακατέργαστο) 83 % (355 mg).

8.6.3 Καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίου

Στο σχήμα 8.4 φαίνεται το αναλυτικό φάσμα που λήφθηκε από την RP-HPLC, ενώ στο σχήμα 8.5 το φάσμα μάζας του που λήφθηκε μετά τον καθαρισμό και τη λυοφιλοποίηση των κλασμάτων που περιείχαν το καθαρό πεπτίδιο. Ο χρόνος ανάσχεσης αντιστοιχεί σε R_f = 27.03 min και το ποσοστό καθαρότητάς του ήταν ~ 99 %.



Σχήμα 8.4 Αναλυτικό χρωματογράφημα RP-HPLC του πεπτιδίου αλληλουχίας Weybridge μετά τον καθαρισμό. Σημειώνεται ο χρόνος έκλουσής του.



Σχήμα 8.5 Φάσμα ESI-MS του πεπτιδίου αλληλουχίας Weybridge μετά τον καθαρισμό του.

Β. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM) ΜΕ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

Τα πειράματα Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) διεξήχθησαν στο «Ινστιτούτο Φυσικοχημείας και Θεωρητικής Χημείας» του Πανεπιστημίου του Tübingen στη Γερμανία από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Günter Gauglitz.

8.7 Εισαγωγή

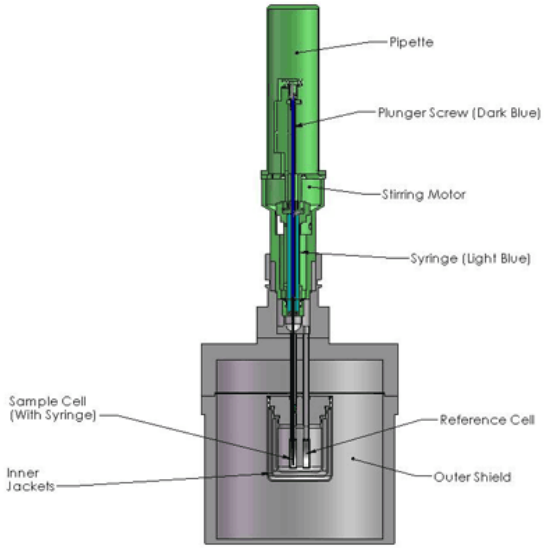
Η κατανόηση των χημικών αντιδράσεων και των ιδιοτήτων των χημικών ενώσεων έχει μεγάλη σημασία για την πρακτική εφαρμογή της θερμιδομετρίας. Για το λόγο αυτό έχουν σχεδιαστεί διάφορα θερμιδόμετρα, το καθένα για συγκεκριμένο σκοπό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μικροθερμιδόμετρο ισοθερμικής τιτλοδότησης, που χρησιμοποιεί σύγχρονα ηλεκτρονικά στοιχεία και πραγματοποιεί ανάλυση μέσω Η/Υ. Σχεδιάστηκε αρχικά να ποσοτικοποιεί αλληλεπιδράσεις ενζύμου – υποστρώματος, με συνέπεια να απαιτούνται μικρές ποσότητες χημικών ενώσεων εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας του οργάνου. Ακριβώς λόγω της υψηλής ευαισθησίας της μικροθερμιδομετρίας τιτλοδότησης, το εύρος των φυσικοχημικών εφαρμογών μεγάλωσε.

8.8 Περιγραφή του θερμιδόμετρου

Η ακόλουθη περιγραφή αποτελεί λεπτομερέστερη παρουσίαση του θερμιδόμετρου συγκριτικά με εκείνη που παρουσιάστηκε στην §4.4.1.

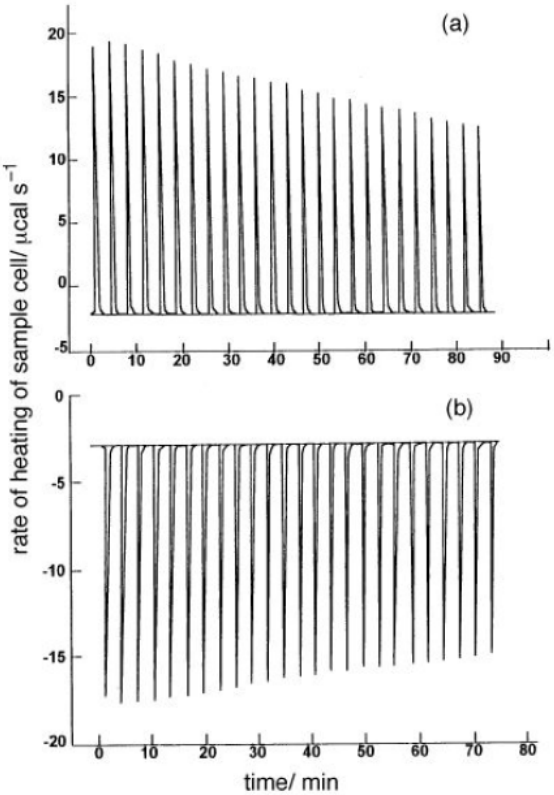
Το θερμιδόμετρο αποτελείται από ένα ζεύγος κελιών, δείγματος και αναφοράς, γνωστού όγκου που περιβάλλονται από αδιαβατικό τοίχωμα. Μια ελεγχόμενη από Η/Υ μικροσύριγγα – αναδευτήρας εισάγει στο κελί του δείγματος, που βρίσκεται το διάλυμα της πρωτεΐνης, συγκέντρωσης $[R]_{tot}$ (R: receptor, υποδοχέας) και στη συνέχεια μικρούς όγκους διαλύματος του προσδέτη L (L: ligand, προσδέτης) συγκέντρωσης $[L]$, ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα για την τιτλοδότηση. Εκεί λαμβάνει χώρα και η σύνδεση μεταξύ των

αμινοαδαμαντανικών παραγώγων και της πρωτεΐνης M2TM (σχήμα 8.6) με αποτέλεσμα το θερμιδόμετρο να μετρά τη θερμότητα *q* που εκλύεται ή απορροφάται.



Σχήμα 8.6 Τομή θερμιδόμετρου ITC στο οποίο διακρίνονται τα κελιά αναφοράς και δείγματος, το σύστημα ένεσης και ανάδευσης καθώς και τα εσωτερικά και εξωτερικά του τοιχώματα.

Το κελί αναφοράς, από την άλλη, περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα που ταιριάζει με εκείνο του κελιού του δείγματος, δηλαδή έχει ίδιο pH, ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, ίδια συγκέντρωση αλάτων, κ.λπ, εκτός της ουσίας που αντιδρά. Το κελί αναφοράς θερμαίνεται με πολύ αργό ρυθμό χρησιμοποιώντας μικρό συνεχές ρεύμα. Το σύστημα ελέγχου παρακολουθεί τις θερμοκρασίες και των δύο κελιών και ρυθμίζει την ηλεκτρική ισχύ των θερμαντήρων των κελιών ώστε να διατηρούνται στην ίδια θερμοκρασία. Στην περίπτωση που η ένεση του διαλύματος προκαλέσει εξώθερμη αντίδραση, το σύστημα ελέγχου σταματά τη θέρμανση του κελιού του δείγματος μέχρι η θερμοκρασία του κελιού αναφοράς να τη φτάσει. Η **μετρούμενη ποσότητα** είναι ο **ρυθμός θέρμανσης του κελιού του δείγματος** για τη χρονική περίοδο που απαιτείται για να έρθουν τα κελιά αναφοράς και δείγματος στην ίδια θερμοκρασία (σχήμα 8.7). Το σήμα από το σύστημα ελέγχου υφίσταται αριθμητική ολοκλήρωση για να προκύψει η θερμότητα *q* που σχετίζεται με την τιτλοδοτούμενη ποσότητα από τη σύριγγα (σχήμα 4.4, § 4.4.2). Στο σημείο αυτό σημειώνεται ότι οι θερμότητες αυτές είναι της τάξης των mcal και οι θερμοκρασίες των κελιών μεταβάλλονται κατά μερικά mK. Το θερμιδόμετρο λειτουργεί σε **ισοβαρείς** και **ισοθερμικές** συνθήκες περιβάλλοντος (NPT).



Σχήμα 8.7 Διαγράμματα θερμιδομετρικής τιτλοδότησης για μια ενδόθερμη (α) και μια εξώθερμη αντίδραση (β).

8.9 Προετοιμασία πειράματος

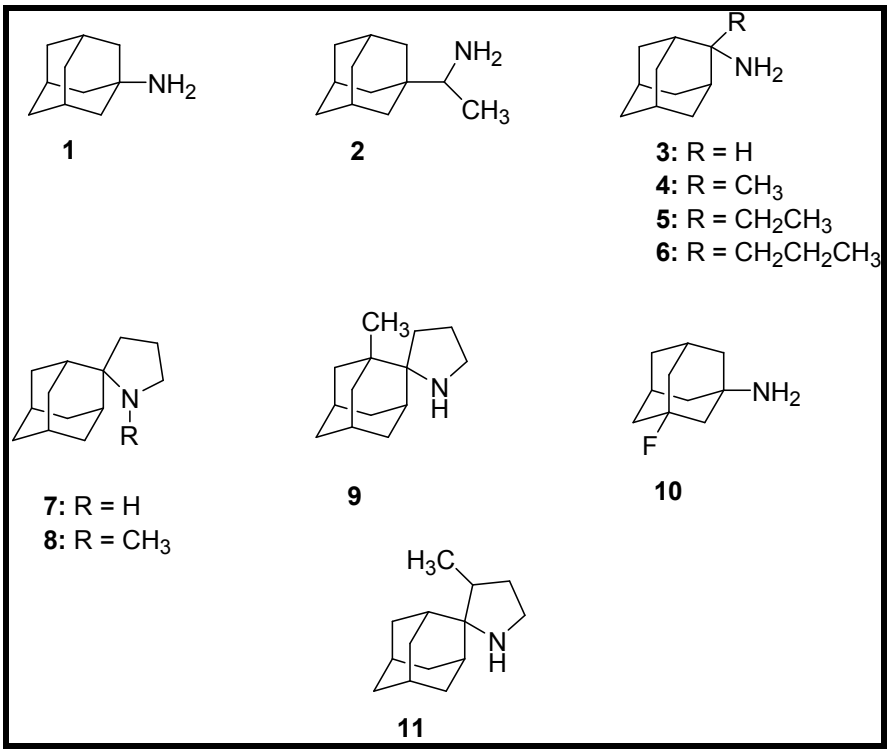
Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε pH 8, όπου το πεπτίδιο μπορεί να βρεθεί σε μορφή τετραμερούς,[13] σε ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 50 mM και 100 mM NaCl και οι μετρήσεις έγιναν με το θερμιδόμετρο TAM 2277 στους 20 ^oC (293,15 K). Το συνθετικό διαμεμβρανικό τμήμα M2TM (22 – 46) εισήχθη σε μικκύλια DPC σε αναλογία 1:40 μονομερούς/λιπιδίου σε pH 8, διότι όπως έχει αναφερθεί η αναλογία αυτή εξασφαλίζει το M2TM να βρεθεί αποκλειστικά σχεδόν σε τετραμερή μορφή. Συγκεκριμένα, παρασκευάσθηκαν διαλύματα 175 – 250 nmol πεπτιδίου σε σαρανταπλάσια μοριακή ποσότητα DPC στο προαναφερθέν ρυθμιστικό διάλυμα με τη βοήθεια υπερήχων. Τα διαλύματα των προσδετών **1 – 11** (8 – 15) μL τιτλοδοτήθηκαν στη θερμιδομετρική κυψελίδα στους 20 ^oC. Η θερμότητα από την πρώτη ένεση δε χρησιμοποιήθηκε στα αποτελέσματα διότι αναφέρεται στη διάλυση του προσδέτη ή σε αραίωση και όχι σε φαινόμενα σύνδεσης. Με ολοκλήρωση του διαφορικού

σήματος ως προς το χρόνο προκύπτει η θερμότητα σύνδεσης και λαμβάνονται τα γραφήματα θερμότητας σύνδεσης (βλ. Παράτημα Α2, σχήματα Α1 – Α9). Η θερμότητα που σχετίζεται με τη σύνδεση των προσδετών στην Μ2 λήφθηκε αφαιρώντας την θερμότητα εξέλιξης από τη θερμότητα αντίδρασης, βλ. εξισώσεις (4.10) και (4.11) στην §4.4.2 (Παράρτημα Α1).[115,116] Πειράματα ελέγχου πραγματοποιήθηκαν σε pH 3 και δεν έδειξαν καμία αλληλεπίδραση, αφού δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός τετραμερούς στο pH αυτό.[13]

Για κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκε ~ 1 mg πεπτιδίου και η μέτρηση κάθε προσδέτη έγινε εις τριπλούν, οπότε για τη μέτρηση των προσδετών **1 – 11** χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 33 mg κάθε αλληλουχίας. Αναλογιζόμενοι πως πρακτικά σε κάθε καθαρισμό πεπτιδίου λαμβάνονταν ~ 5mg μπορεί κανείς να αντιληφθεί το κόστος των πειραμάτων αυτών.

8.10 Προσδιορισμός σταθερών σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών στην A/M2TM σε αλκαλικό pH με ITC

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σύνδεση των αμινοαδαμαντανικών προσδετών **1 – 11** (σχήμα 8.8) με τις αλληλουχίες πρωτοταγούς δομής των πεπτιδίων της A/M2TM, Udorn και Weybridge, που παρασκευάσθηκαν όπως περιγράφηκε στην §8.5 και την §8.6. Οι συνθέσεις των περισσότερων αυτών ενώσεων έχουν δημοσιευτεί στο παρελθόν[117–122] και πολλές από αυτές ήταν ιδιαίτερα δραστικές έναντι του ιού της *influenza* A τα στελέχη H3N2, H2N2 και H1N1.



Σχήμα 8.8 Απεικόνιση και αρίθμηση των υπό μελέτη αμινοαδαμαντανικών προσδετών.

Στους Πίνακες 8.5 και 8.6 διακρίνονται οι πειραματικές τιμές, όπως λήφθηκαν με τη μέθοδο ITC, των σταθερών διάστασης (K_d), ελεύθερων ενεργειών σύνδεσης (ΔG^o) διαφοράς ενθαλπίας (ΔH^o) και εντροπικής συνεισφοράς ($-T\cdot\Delta S^o$) της αλληλεπίδρασης των προσδετών 1 – 11 με τα τετραμερή που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες Udorn και Weybridge, αντίστοιχα.

Πίνακας 8.5 Στον πίνακα αναγράφονται οι πειραματικές τιμές των σταθερών διάστασης (K_d), ελεύθερων ενεργειών κατά Gibbs (ΔG^o), διαφοράς ενθαλπίας (ΔH^o) και η εντροπική συνεισφορά ($-T\cdot\Delta S^o$). Τα πειράματα αφορούν τη μελέτη σύνδεσης των προσδετών 1 – 11 με το τετραμερές A/M2TM αλληλουχίας Udorn με τη μέθοδο Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης.

Προσδέτης	K_d (μM)	ΔG^o (kJ/mol)	ΔH^o (kJ/mol)	$-T\cdot\Delta S^o$ (kJ/mol)
1	2.17 ± 0.52	-31.78 ± 0.59	-27.23 ± 2.05	-4.56 ± 2.13
2	0.51 ± 0.26	-35.33 ± 1.24	-12.01 ± 0.71	-23.32 ± 1.43
3	1.60 ± 0.34	-32.52 ± 0.52	-40.27 ± 1.73	7.75 ± 1.80
4	0.89 ± 0.19	-33.96 ±0.53	-27.78 ± 1.08	-6.18 ± 1.20
5	0.62 ± 0.14	-34.83 ± 0.54	-29.20 ± 0.87	-5.64 ± 1.02
6	0.71 ± 0.15	-34.52 ± 0.50	-35.17 ± 1.13	0.65 ± 1.23
7	0.40 ± 0.13	-35.90 ± 0.78	-41.84 ± 1.60	5.94 ± 1.77
8	0.93 ± 0.36	-33.85 ± 0.95	-15.60 ± 1.15	-18.25 ± 1.49
9	1.30 ± 0.43	-33.04 ± 0.81	-20.76 ± 1.28	-12.27 ± 1.51
10	6.33 ± 1.53	-29.18 ± 0.59	-14.71 ± 1.25	-14.46 ± 1.38
11	0.91 ± 0.21	-33.90 ± 0.57	-44.17 ± 2.01	10.27 ± 2.09

Πίνακας 8.6 Στον πίνακα αναγράφονται οι πειραματικές τιμές των σταθερών διάστασης (K_d), ελεύθερων ενεργειών κατά Gibbs (ΔG^o), διαφοράς ενθαλπίας (ΔH^o) και η εντροπική συνεισφορά ($-T\cdot\Delta S^o$). Τα πειράματα αφορούν τη μελέτη σύνδεσης των προσδετών 1 – 11 με το τετραμερές A/M2TM αλληλουχίας Weybridge με τη μέθοδο Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης.

Προσδέτης	K_d (μM)	ΔG^o (kJ/mol)	ΔH^o (kJ/mol)	$-T\cdot\Delta S^o$ (kJ/mol)
1	0.74 ± 0.26	-34.39 ± 0.85	-11.37 ± 0.60	-23.02 ± 1.04
2	0.18 ± 0.09	-37.86 ± 1.24	-22.33 ± 0.99	-15.53 ± 1.59
3	0.34 ± 0.14	-36.28 ± 0.98	-11.52 ± 0.53	-24.76 ± 1.11
4	0.21 ± 0.10	-37.50 ± 1.21	-6.03 ± 0.27	-31.47 ± 1.24
5	0.23 ± 0.12	-37.27 ± 1.24	-12.73 ± 0.64	-24.54 ± 1.39
6	N/A	N/A	N/A	N/A
7	0.38 ± 0.14	-36.01 ± 0.88	-13.85 ± 1.06	-22.16 ± 1.37
8	0.98 ± 0.25	-33.72 ± 0.62	-16.01 ± 0.72	-17.71 ± 0.95
9	$K_d > 10$	N/A	N/A	N/A
10	5.32 ± 1.80	-29.60 ± 0.83	-8.31 ± 0.92	-21.29 ± 1.24
11	1.18 ± 0.49	-33.28 ± 1.02	-6.89 ± 0.54	-26.39 ± 1.15

Γ. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΑΡΑΞΗΣ ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM)

8.11 Υπολογισμοί Μοριακής Προσάραξης

Αυτό το τμήμα της εργασίας αναφέρεται στην εκτέλεση και την ανάλυση των αποτελεσμάτων των υπολογισμών μοριακής προσάραξης στο διαμεμβρανικό τμήμα του τετραμερούς της πρωτεΐνης M2 για τις δύο προαναφερθείσες αλληλουχίες Udorn και Weybridge. Υπενθυμίζεται ότι η δεύτερη φέρει δύο μεταλλάξεις στην αλληλουχία της συγκρινόμενη με την WT πρωτεΐνη (Udorn), αυτές των V28I και L38F.

Έχει βρεθεί γενικά ότι οι μέθοδοι μοριακής προσάραξης με συναρτήσεις βαθμολογίας είτε βασίζονται σε πεδία δυνάμεων είτε είναι εμπειρικές, αδυνατούν ή έχουν γενικά μικρή απόδοση ως προς την περιγραφή των σχετικών συγγενειών σύνδεσης[83] συμπεριλαμβανομένων και των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.[100] Ένας σημαντικός λόγος που οφείλεται η αδυναμία αυτή είναι η χρησιμοποίηση άκαμπτης δομής για την πρωτεΐνη κατά τους υπολογισμούς αυτούς, ενώ το φαινόμενο σύνδεσης προκαλεί τη μεταβολή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης.

8.11.1 Η σημασία των μορίων νερού στους υπολογισμούς προσάραξης

Η τοποθέτηση μορίων νερού εντός του πρωτεϊνικού διαύλου φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή της πειραματικής θέσης σύνδεσης. Σε μελέτη προσομοιώσεων μοριακής προσάραξης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας χωρίς τη χρήση μορίων νερού εντός του πόρου[123] πριν γίνουν γνωστά η θέση της αμανταδίνης και ο προσανατολισμός της αμινομάδας της,[20,23] τα αποτελέσματα των υπολογισμών μοριακής προσάραξης αναμενόμενα οδήγησαν στο λανθασμένο προσανατολισμό της αμινομάδας προς το N-τελικό άκρο προκειμένου να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τη S31 έναντι του ορθού προσανατολισμού της προς το C-τελικό άκρο. Ένα δίκτυο μορίων νερού σταθεροποιεί τους

δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας της αμανταδίνης και της H37 οδηγώντας στον προσανατολισμό της αμινομάδας προς το C-τελικό άκρο.[20,23]

Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι ο αριθμός των κρυσταλλογραφικών μορίων νερού που εντοπίζεται στις δομές πρωτεϊνών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ευκρίνεια προσδιορισμού της δομής, δηλαδή με ευκρίνεια 2 Å αναμένεται ένας μέσος όρος 1.0 κρυσταλλογραφικού νερού, αλλά όταν η ευκρίνεια φτάσει το 1 Å αναμένονται 1.6 – 1.7 κρυσταλλογραφικά μόρια νερού ανά αμινοξύ.[124] Στα κρυσταλλογραφικά, δηλαδή αποτελέσματα, φαίνονται μόνο εκείνα τα μόρια νερού που έχουν «καλή διάταξη».

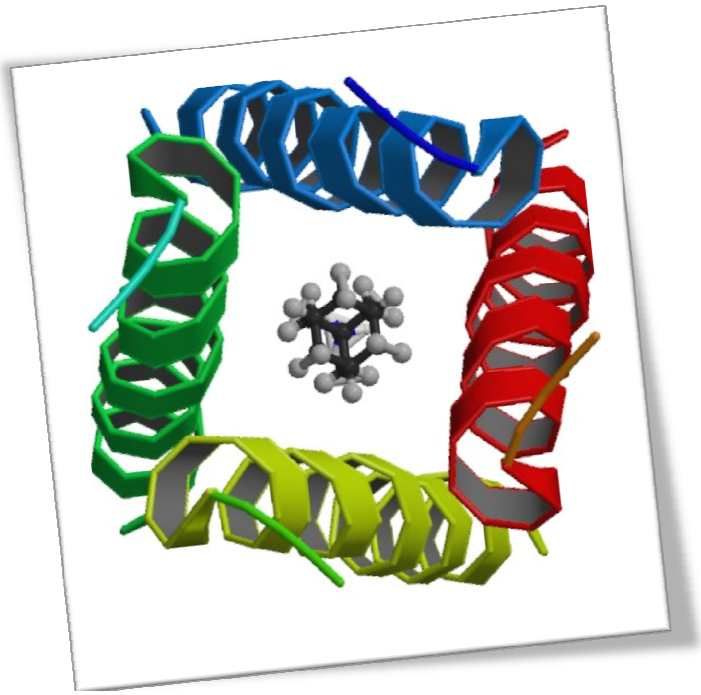
Προκειμένου λοιπόν να βρεθούν οι θέσεις που μπορούν να ενυδατωθούν εφαρμόστηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Ένας ακόμη λόγος, που αφορά μόνο τη μία εκ των δύο δομών, εκείνη της Weybridge, που έπρεπε να εφαρμοστεί προσομοίωση MD είναι πως σε αντίθεση με την Udorn, η δομή της οποίας έχει βρεθεί πειραματικά[23], για την Weybridge που φέρει δύο μεταλλάξεις στις θέσεις V28 και L38 δεν υπάρχει διαθέσιμη πειραματική δομή. Κατά συνέπεια, αυτό καθιστά διπλά απαραίτητα την εφαρμογή MD στην πρωτεΐνη Weybridge. Γενικά, δομές που προκύπτουν από προσομοιώσεις MD μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες δομές στους υπολογισμούς μοριακής προσάραξης για την πιο αξιόπιστη μελέτη της πρόσδεσης συγκεκριμένων προσδετών.[125]

8.11.2 Προετοιμασία πρωτεϊνών

Η τριτοταγής δομή που χρησιμοποιήθηκε στους υπολογισμούς μοριακής προσάραξης ήταν η (2KQT.pdb) (σχήμα 8.9) και έχει ληφθεί από μελέτες ssNMR σε pH 7.5.[23] Η δομή αυτή είναι συμπλοκοποιημένη με την αμανταδίνη **1** και αναπαριστά το διαμεμβρανικό δίαυλο της M2 σε κλειστή μορφή. Όπως λαμβάνεται η δομή αυτή από τη βάση δεδομένων πρωτεϊνών (PDB), δεν περιλαμβάνει άτομα υδρογόνου. Έτσι, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Maestro 9.1, αρχικά προστέθηκαν άτομα υδρογόνου και μεταβλήθηκε ο υβριδισμός του αζώτου της αμινομάδας ώστε να αντιστοιχεί στην πρωτονιωμένη του μορφή [sp^3(+)]. Αντίθετα, οι H37 στη δομή του κλειστού διαύλου είναι αποπρωτονιωμένες και για το λόγο αυτό δεν πρωτονιώθηκαν κατά την εκτέλεση των προσομοιώσεων. Ακολούθως, προστέθηκε άμιδο τερματική ομάδα ($CONH_2$) στο C-τελικό άκρο για καλύτερη μίμηση των πειραματικών

συνθηκών, αφού αυτή είναι η δομή του C-τελικού άκρου των συνθετικών πεπτιδίων. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πακέτο λογισμικού Macromodel για τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας όλων των δεσμών X-H, δηλαδή όλων των υδρογόνων του συμπλόκου M2TM – **1**. Εφαρμόστηκε πεδίο δυνάμεων AMBER* χρησιμοποιώντας διηλεκτρική σταθερά εξαρτώμενη από την απόσταση ίση με 4.0. Οι ελαχιστοποιήσεις μοριακής μηχανικής πραγματοποιήθηκαν με αλγόριθμο συζυγούς βαθμίδας και τιμή διακύμανσης ενέργειας ίση με 10^{-4} kJ·$Å^{-1}$ ως κριτήριο σύγκλισης.

Στην περίπτωση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που φέρει μεταλλάξεις, αρχικά χρησιμοποιώντας το Maestro πραγματοποιήθηκαν οι μεταλλάξεις V28I και L83F και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση γεωμετρίας.



Σχήμα 8.9 Το τετραμερές διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 του ιού της γρίπης A, όπως προσδιορίστηκε από πειράματα ssNMR. Στο εσωτερικό του διαύλου διακρίνεται η αμανταδίνη [Από την Παραπομπή N° 23].

Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την έκδοση του Desmond 2.4, και οι δύο πρωτεΐνες τοποθετήθηκαν σε λιπιδική διπλοστοιβάδα DPPC και ενυδατώθηκαν με το μοντέλο νερού TIP3P[63] και εφαρμόστηκαν Περιοδικές Συνοριακές Συνθήκες (50×50×80) $Å^3$ ~ 80,000 άτομα. Για

τη διατήρηση της ουδετερότητας του φορτίου προστέθηκαν τρία ιόντα νατρίου ως αντισταθμιστικά στο αρνητικό φορτίο του συστήματος, που προκύπτει από το άθροισμα του αρνητικά φορτισμένου αμινοξέος ασπαρτικό οξύ, από τη θετικά φορτισμένη αργινίνη καθώς και από τη θετικά φορτισμένα αμινομάδα των αμινοαδαμαντανικών προσδετών. Ακόμη, προς μίμηση των πειραματικών συνθηκών ITC προστέθηκαν ιόντα νατρίου και χλωρίου συγκέντρωσης 150 mM, με όλα τα ιόντα να έχουν τοποθετηθεί τυχαία, εξωτερικά του πρωτεϊνικού διαύλου A/M2TM. Για την προσομοίωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS 2005.[126–128]

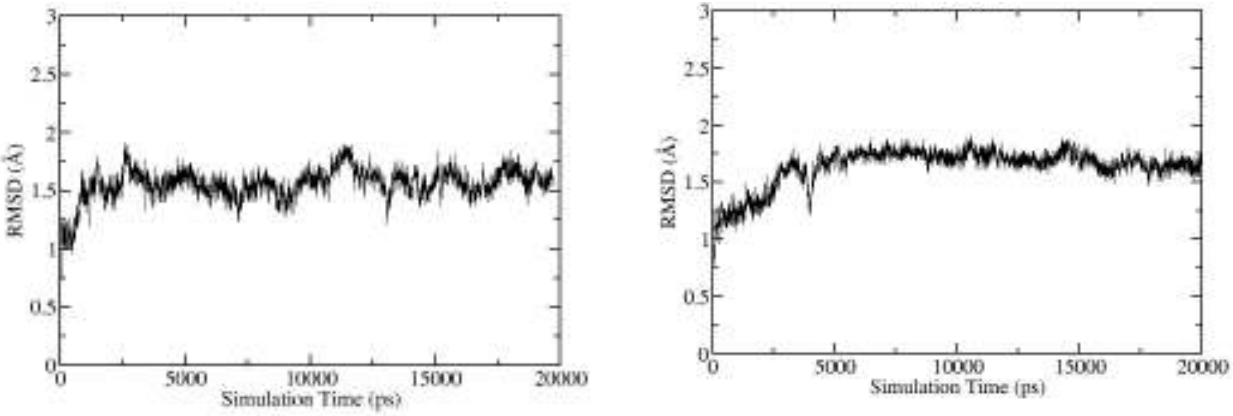
8.11.3 Πρωτόκολλο Μοριακής Δυναμικής

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις MD υπάρχει διαθέσιμο στο πακέτο λογισμικού Desmond. Ωστόσο τροποποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποίησαν η Khurana και οι συνεργάτες της[129] στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής της M2TM.

Για τον υπολογισμό αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας εφαρμόστηκε η μέθοδος PME[130] με απόσταση πλέγματος 0.8 Å. Για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας καθώς και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals χρησιμοποιήθηκε απόσταση αποκοπής 9.0 Å. Για τη διατήρηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης MD χρησιμοποιήθηκε ο θερμοστάτης Nosé-Hoover, ενώ για τον έλεγχο της πίεσης η μέθοδος Martina-Tobias-Klein.[131] Για την ολοκλήρωση της εξίσωσης κίνησης χρησιμοποιήθηκε ο ολοκληρωτής πολλαπλών σταδίων RESPA[132] με εσωτερικό βήμα χρόνου 2.0 fs, τόσο για τις δεσμικές όσο και για τις μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις, εντός της εμβέλειας της απόστασης αποκοπής. Εκτός της απόστασης αποκοπής χρησιμοποιήθηκε εξωτερικό βήμα χρόνου 6.0 fs.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν δύο στάδια *steepest descent* ελαχιστοποίησης ενέργειας με πλήθος βημάτων 2000 και 10000 και εφαρμόστηκε αρμονικός περιορισμός (*harmonic restraint*) 50 kcal/mol/Å^2 σε όλα τα άτομα της διαλυμένης ουσίας. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θέρμανση (heating) στους 325 K με το κανονικό στατιστικό σύνολο NVT με όλα τα βαριά άτομα συγκρατημένα με σταθερά δύναμης 50 kcal/mol/Å^2 ώστε να επιτρέπει στα λιπίδια, τα μόρια νερού και τα ιόντα να τοποθετηθούν στο κουτί. Η θερμοκρασία των 325 K επιλέχθηκε ώστε να

είναι αρκετά ψηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης των λιπιδίων DPPC, η οποία είναι 315 K. Τη θέρμανση ακολούθησαν στάδια εξισορρόπησης στο στατιστικό σύνολο *NPT*. Η πρώτη από αυτές διατηρούσε ακλόνητα τα βαριά άτομα του συστήματος για 1 ns ακολουθούμενη από 10 ns εξισορρόπηση του νερού και των λιπιδίων με σταθερά δύναμης 10 kcal/mol/Å^2 για τους αρμονικούς περιορισμούς των βαρέων ατόμων, αντίστοιχα. Το επόμενο βήμα ήταν ανόπτηση (*annealing*) στα βαρέα άτομα της πρωτεΐνης μέσω χαλάρωσης των αρμονικών περιορισμών από 10 σε 2 kcal/mol, ακολουθούμενο από μια εξισορρόπηση με τα C_a άτομα της πρωτεΐνης σταθερά για 1 ns με σταθερά δύναμης 2 kcal/mol/Å^2. Τέλος, η πρωτεΐνη αφέθηκε χωρίς περιορισμούς για 350 ps και ακολούθησε προσομοίωση μέχρι η ενέργεια του συστήματος και το RMSD φθάσει σε σταθερή τιμή. Στο (σχήμα 8.10) φαίνονται τα διαγράμματα RMSD για τις πρωτεΐνες Udorn και Weybridge αντίστοιχα.



Σχήμα 8.10 Διαγράμματα RMSD των C_α ανθράκων της πρωτεΐνης σε σχέση με την αρχική δομή για τις πρωτεΐνες Udorn (*πάνω*) και Weybridge (*κάτω*).

8.11.4 Προετοιμασία και εκτέλεση υπολογισμών μοριακής προσάραξης

Σχεδιάστηκαν οι προσδέτες στην πρωτονιωμένη τους μορφή χρησιμοποιώντας το λογισμικό Maestro και ελαχιστοποιήθηκαν με το Macromodel 9.6 και το πεδίο δυνάμεων MMFFs χρησιμοποιώντας τη μέθοδο συζυγούς βαθμίδας (*Conjugate* Gradient), CG, και διηλεκτρική σταθερά εξαρτώμενη από την απόσταση με τιμή 4.0 μέχρι να επιτευχθεί σύγκλιση 0.0001 kJ/Å. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε το τελευταίο στιγμιότυπο των MD και χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα των υπολογισμών. Στους υπολογισμούς προσάραξης συμπεριλήφθηκαν μόνο τα

μόρια νερού που βρίσκονταν εντός 8 Å από την αμανταδίνη. Τα λιπίδια και τα ιόντα δε μας «ενδιαφέρουν» στις προσομοιώσεις μοριακής προσάραξης καθώς δε λαμβάνονται υπόψη από τους αλγορίθμους. Έτσι, για τους υπολογισμούς με την αλληλουχία WT χρησιμοποιήθηκαν 11 μόρια νερού, ενώ για εκείνους με τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη 6 μόρια.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί μοριακής προσάραξης των βελτιστοποιημένων γεωμετριών των ενώσεων **1 – 11**, αναφορικά με τη θέση σύνδεσης της αμανταδίνης εντός του πόρου M2TM στα σύμπλοκα αναφοράς. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GOLD, έκδοση 3.2, και δοκιμάστηκαν οι συναρτήσεις βαθμολόγησης ChemScore, GoldScore και ASP. Η περιοχή ενδιαφέροντος που χρησιμοποιεί το λογισμικό αυτό για έρευνα ευνοϊκών προσανατολισμών πρόσδεσης (*grid*) προσδιορίστηκε στα 15 Å από την αμανταδίνη και στα δύο σύμπλοκα αναφοράς.

Για τα μόρια νερού που λαμβάνονται υπόψη στους υπολογισμούς το πρόγραμμα έχει δύο επιλογές, είτε την *on – spin* κατά την οποία η θέση τους παραμένει ακλόνητη κατά τη διάρκεια των υπολογισμών και τα μόρια νερού επιτρέπεται να περιστρέφονται, είτε την επιλογή *toggle – spin* κατά την οποία το λογισμικό αποφασίζει αν ένα μόριο νερού είναι ευνοϊκό για την ενέργεια πρόσδεσης, οπότε ή παραμένει ή δε λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό.

Οι υπόλοιπες παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν όπως είναι προεπιλεγμένες από το GOLD και οι ενώσεις υποβλήθηκαν σε 10 κύκλους διαφορετικής έρευνας με γενετικό αλγόριθμο.

8.11.5 Παρουσίαση αποτελεσμάτων υπολογισμών μοριακής προσάραξης

Μετά την εκτέλεση των υπολογισμών μοριακής προσάραξης προκύπτουν διάφορες λύσεις για κάθε προσδέτη εντός του πρωτεϊνικού πόρου για κάθε μία από τις συναρτήσεις βαθμολογίας σε συνδυασμό με τις επιλογές για τα μόρια νερού. Οι προσανατολισμοί αυτοί βαθμολογούνται από το πρόγραμμα αυτόματα καθώς προκύπτουν. Οι μεγαλύτερες βαθμολογίες (*scores* για την ASP και την ChemScore ή *fitness* στην περίπτωση της GoldScore) κάθε υπολογισμού συσχετίστηκαν με τις σταθερές συγγένειας που προέκυψαν από τις μετρήσεις ITC, βλ. Πίνακες 8.5 και 8.6, §8.10.

Τα αποτελέσματα για τη συνάρτηση ChemScore στην Udorn δείχνουν συσχέτιση μεταξύ πειραματικών και υπολογιστικών αποτελεσμάτων (R^2 = 0.50), ενώ δεν προέκυψαν καλές συσχετίσεις για τις άλλες συναρτήσεις. Σε προηγούμενες μελέτες[100] υπολογισμοί προσάραξης δεν έδωσαν καλή συσχέτιση και η καλύτερη αυτών ήταν (R^2 = 0.18). Παρά το γεγονός ότι οι υπολογισμοί δεν είναι εύρωστοι και αναμένεται πολλές φορές να αποτυγχάνουν, η συσχέτιση με την ChemScore είναι ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα και πιθανόν να μπορεί να αξιοποιηθεί για μια γρήγορη εκτίμηση σχετικής σύνδεσης. Στο παράρτημα Β, στους Πίνακες Β1 και Β2 παρατίθενται τα αποτελέσματα των υπολογισμών μοριακής προσάραξης για την Udorn και τη Weybridge, αντίστοιχα και στα σχήματα Β1 – Β3 και Β4 – Β6 τα διαγράμματα συσχέτισης για όλες τις συναρτήσεις βαθμολογίας για κάθε μία από τις δύο πρωτεΐνες, αντίστοιχα.

Δ. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΙ ΜΕ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ (FEP/MD) ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΕΤΗ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM)

8.12 Υπολογισμοί FEP/MD

Τέλος, στην ενότητα αυτή της εργασίας θα περιγραφούν οι υπολογισμοί FEP συνδυασμένων με προσομοιώσεις MD (FEP/MD) για το σύμπλοκο αμινοαδαμαντανικών προσδετών με την M2TM, που αντιστοιχεί στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες Udorn και Weybridge.

8.12.1 Υπολογισμοί FEP/MD για το σύμπλοκο προσδέτη – πρωτεΐνης (*bound*) και του προσδέτη σε διάλυμα (*unbound*)

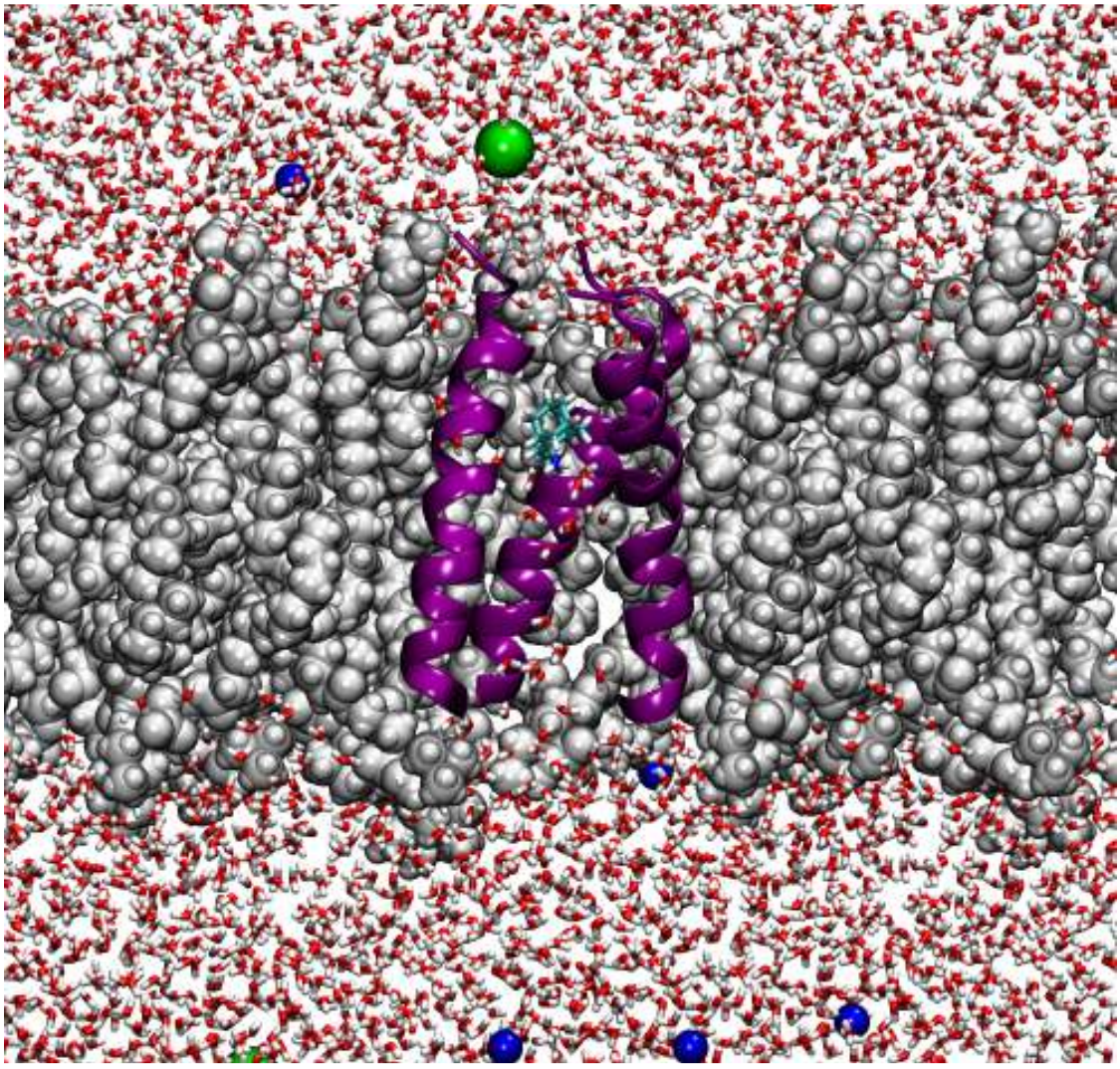
Η προετοιμασία των πρωτεϊνών είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην §8.11.2. Οι σχετικές ελεύθερες ενέργειες σύνδεσης υπολογίστηκαν με τη χρήση του Θερμοδυναμικού Κύκλου, όπως περιγράφηκε στην §7.4 (σχήμα 7.2).

Υπολογισμοί FEP σε συνδυασμό με προσομοιώσεις MD (FEP/MD) – που περιλαμβάνουν όλα τα άτομα (~ 18000) – πραγματοποιήθηκαν με το πακέτο λογισμικού Desmond MD, έκδοση 2.4, όπως διανέμεται από την Schrodinger.

Οι υπολογισμοί FEP/MD πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές αλληλουχίες της διαμεμβρανικής περιοχής του ιού της *influenza* A, της Udorn και της Weybridge, σε μια πλήρως ενυδατωμένη διπλοστοιβάδα λιπιδίων DPPC, αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας περιοδικές συνοριακές συνθήκες σε μικρότερο κουτί προσομοίωσης προς εξοικονόμηση υπολογιστικού κόστους (σχήμα 8.11). Οι αμινοαδαμαντανικοί προσδέτες του σχήματος 7.8, §8.10 κατασκευάσθηκαν με το λογισμικό Maestro, τροποποιώντας την αμανταδίνη **1**, της οποίας η αρχική δομή λήφθηκε από τους υπολογισμούς προσάραξης (βλ. §8.11.5).

Για την προσομοίωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS 2005,[126–128] ενώ για την αναπαράσταση του υδατικού περιβάλλοντος της λιπιδικής μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο TIP3P.[63] Για

τον υπολογισμό ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας εφαρμόστηκε η μέθοδος PME[130] με απόσταση πλέγματος 0.8 Å. Για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας καθώς και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals εφαρμόστηκε απόστασης αποκοπής 9.0 Å. Για τη διατήρηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης MD χρησιμοποιήθηκε ο θερμοστάτης Nosé-Hoover, ενώ για τον έλεγχο της πίεσης η μέθοδος Martina-Tobias-Klein.[131]



Σχήμα 8.11 Το διαμεμβρανικό τμήμα της A/M2 (*μωβ*) εσνωματωμένο σε λιπιδική μεμβράνη DPPC (λιπίδια: *λευκό*, νερό: *κόκκινο – λευκό*). Διακρίνοται τα ιόντα νατρίου (*μπλε*) και χλωρίου (*πράσινο*), καθώς και ο προσδέτης στην περιοχή του N-τελικού άκρου του πόρου M2TM.

Η ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης έγινε με τον ολοκληρωτή πολλαπλών σταδίων RESPA[132] με εσωτερικό βήμα χρόνου 2.0 fs, τόσο για τις δεσμικές όσο και για τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις, εντός της μικράς εμβέλειας απόστασης αποκοπής. Εκτός της απόστασης αποκοπής χρησιμοποιήθηκε εξωτερικό βήμα χρόνου 6.0 fs.

8.12.2 Πρωτόκολλο για τις προσομοιώσεις FEP/MD σε σύμπλοκο και σε διάλυμα

Τόσο για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο όσο και για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, βλ. §8.12.3, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο γύροι *steepest descent* ελαχιστοποίησης ενέργειας με πλήθος βημάτων 2000 και 10000, αντίστοιχα, και εφαρμόστηκε αρμονικός περιορισμός (*harmonic restraint*) 50 kcal/mol/Å^2 σε όλα τα άτομα της διαλυμένης ουσίας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια σειρά τεσσάρων προσομοιώσεων MD. Η πρώτη προσομοίωση πραγματοποιήθηκε στους 10 K στο κανονικό στατιστικό σύνολο NVT, με όλα τα βαρέα άτομα συγκρατημένα με σταθερά δύναμης 50 kcal/mol/Å^2. Ακολουθεί προσομοίωση στο στατιστικό σύνολο NPT. Εν συνεχεία, η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 325 K – ώστε να είναι αρκετά ψηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης των λιπιδίων DPPC, η οποία είναι 315 K – στο στατιστικό σύνολο NPT και η σταθερά δύναμης διατηρήθηκε. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση (*equilibration*) για 2ns, 3ns ή 4ns για τους μεγαλύτερους προσδέτες στο στατιστικό σύνολο NPT, με άρση όλων των περιορισμών.

Την παραπάνω εξισορρόπηση ακολούθησε μια προσομοίωση NPT διάρκειας 2ns για κάθε παράθυρο των υπολογισμών FEP (ή περισσότερο αν χρειάστηκε όπου αναφέρεται). Στο χρόνο αυτό, η δυναμική ενέργεια του συστήματος και το RMSD παρέμειναν σταθερά και τα συστήματα θεωρήθηκαν ότι έφθασαν σε σύγκλιση.

Εφαρμόστηκε σταδιοποίηση μέσω της μεταβλητής σύζευξης λ και δυαδική τοπολογία. Για τον υπολογισμό της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας που αφορά στον αλχημικό μετασχηματισμό των ενώσεων A $\longrightarrow$ B εφαρμόστηκε σταδιοποίηση 12 παραθύρων – τιμών λ, όπως φαίνεται στο (Παράρτημα Γ, Πίνακας Γ1). Οι διαμορφώσεις των συστημάτων αποθηκευόταν κάθε 4 ps. Συνολικά για όλους τους αλχημικούς μετασχηματισμούς των 9

ζευγών για την αλληλουχία Udorn και των 7 ζευγών για την αλληλουχία Weybridge πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 96 ns δειγματοληψίας.

8.12.3 Υπολογισμοί FEP/MD σε διάλυμα (*unbound*) και στο κενό (*vacuum*)

Οι σχετικές ελεύθερες ενέργειες σύνδεσης υπολογίστηκαν με τη χρήση του Θερμοδυναμικού Κύκλου, όπως περιγράφηκε στην §7.4 (σχήμα 7.1).

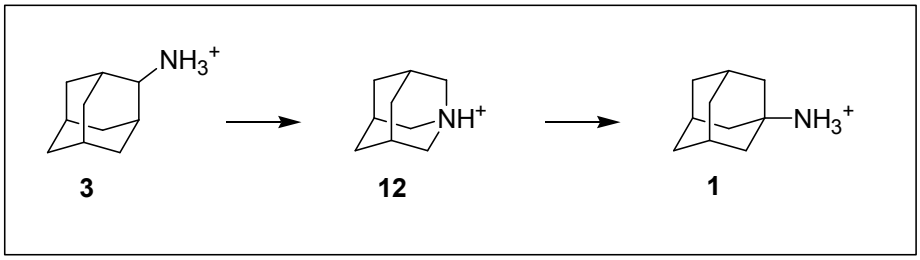
Για το στήσιμο των υπολογισμών σε διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS 2005,[126–128] ενώ για την αναπαράσταση του διαλύτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο TIP3P.[63] Προστέθηκαν επίσης αντισταθμιστικά ιόντα και συγκέντρωση άλατος ίση με 150 mM προς μίμηση των πειραματικών συνθηκών. Για τις προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο κενό, στο σύστημα περιλαμβάνονται μόνο τα μόρια του προσδέτη.

Για τις προσομοιώσεις FEP/MD στο κενό χρησιμοποιήθηκε ένα διαφορετικό πρωτόκολλο από αυτό που περιγράφηκε στην §8.12.2. Εν συντομία, αρχικά πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση ενέργειας *steepest descent* με μέγιστο τα 2,000 βήματα. Στη συνέχεια το σύστημα αφέθηκε να ηρεμήσει με δύο προσομοιώσεις στο NVT στους 10 K και 325 K, αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια προσομοίωση για 2 ns στο στατιστικό σύνολο NVT. Το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το OPLS 2005.[126–128]

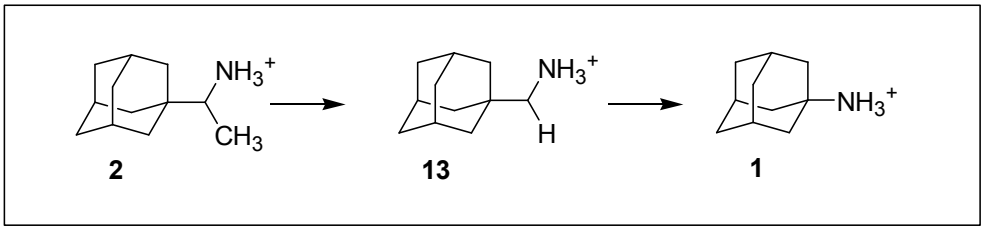
8.12.4 Προσέγγιση FEP πολλαπλών σταδίων (Multistage FEP)

Όλες οι μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία αφορούν στους προσδέτες του σχήματος 8.8, §8.10. Υπήρξαν δύο περιπτώσεις μεταλλάξεων, εκείνες των 3 $\longrightarrow$ 1 και 2 $\longrightarrow$ 1, όπου χρησιμοποιήθηκαν και ενδιάμεσα στάδια. Αυτό συμβαίνει, επειδή με τον τρόπο αυτό η δειγματοληψία του διαμορφωτικού χώρου μεταξύ των δύο προσδετών είναι πιο επαρκής. Με άλλα λόγια, όταν είναι επιθυμητή η μετάλλαξη από έναν προσδέτη A σε έναν άλλο B, οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, εισάγονται ενδιάμεσα στάδια που είναι κατάλληλα για απλούς υπολογισμούς FEP. Έτσι, «εκμεταλλευόμενοι» ότι η ελεύθερη ενέργεια είναι μια συνάρτηση κατάστασης, η ολική σχετική ελεύθερη ενέργεια (ΔG) θα δίνεται από το άθροισμα των αλλαγών κάθε σταδίου. Τα ενδιάμεσα αυτά στάδια επιλέχθηκαν έτσι ώστε το φορτίο του κάθε συστήματος να παραμένει

σταθερό, όπως φαίνεται στα σχήματα 8.12 και 8.13, όπως έχει πραγματοποιηθεί σε αντίστοιχη προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας.[100]



Σχήμα 8.12 Προσέγγιση FEP δύο σταδίων που εφαρμόστηκε για τη μετάλλαξη του προσδέτη 3 στον προσδέτη 1.



Σχήμα 8.13 Προσέγγιση FEP δύο σταδίων που εφαρμόστηκε για τη μετάλλαξη του προσδέτη 2 στον προσδέτη 1.

8.12.5 Παρουσίαση αποτελεσμάτων

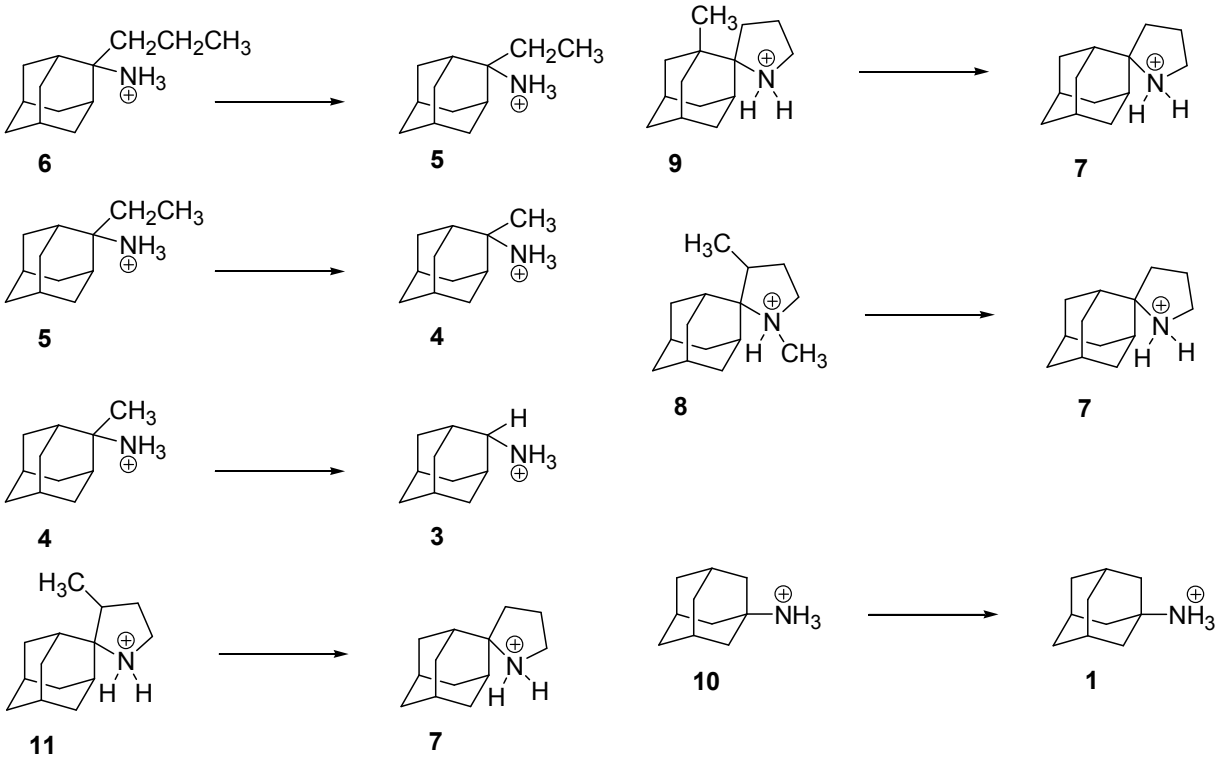
Ελέγχθηκε η σύγκλιση όλων των υπολογισμών FEP/MD με διαγράμματα των σχετικών ελευθέρων ενεργειών συναρτήσει του χρόνου (βλ. Παράρτημα Γ, σχήματα Γ1 – Γ17). Για τον υπολογισμό της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BAR (βλ. Παράρτημα Γ).[133] Τα σφάλματα των υπολογιστικών σχετικών ελευθέρων ενεργειών υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Bootstrap[134] χρησιμοποιώντας τον προεπιλεγμένο συνδυασμό που υπάρχει στο Desmond. Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων των πειραματικών μετρήσεων από την ITC χρησιμοποιήθηκε το σφάλμα διάδοσης (*propagation error*) (βλ. Παράρτημα Γ). Σύντομα, με τη μέθοδο bootstrap τα δεδομένα χωρίζονται σε ομάδες παρατηρήσεων και προσομοιώνονται τυχαία με αντικατάσταση. Η μέθοδος αυτή υπολογίζει την αβεβαιότητα των υπολογισμών, που προκύπτει από την πεπερασμένη φύση της προσομοίωσης, τόσο σε χώρο όσο και σε χρόνο. Μικρές διακυμάνσεις, όπως αυτές που προσδιορίστηκαν στους υπολογισμούς, δείχνει μια καλά εξισορροπημένη

προσομοίωση και επομένως καλή δειγματοληψία του συνόλου. Όμοια μικρά σφάλματα είναι συχνά στους υπολογισμούς FEP.[135,136]

8.12.6 Συσχετίσεις σταθερών διάστασης που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ITC με τα αποτελέσματα των υπολογισμών FEP/MD

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας[100] που πραγματοποιήθηκε στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 σε όξινο pH, έγινε αρχικά η προσπάθεια εξοικονόμησης υπολογιστικού χρόνου με την εκτέλεση υπολογισμών απουσία μεμβράνης και χρησιμοποιώντας περιορισμούς στη ραχοκοκαλιά (*backbone*) της πρωτεΐνης. Η συσχέτιση (R^2 = 0.20) μεταξύ υπολογιστικών με των πειραματικών αποτελεσμάτων ωστόσο ήταν ιδιαίτερα χαμηλή, ενώ όταν η πρωτεΐνη αφέθηκε ελεύθερη η συσχέτιση αυξήθηκε (R^2 = 0.85). Για το λόγο αυτό στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί FEP/MD σε μια πλήρως ευέλικτη πρωτεΐνη, με την πρωτεΐνη ενσωματωμένη σε λιπιδική διπλοστοιβάδα DPPC. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών αυτών παρουσίασα καλή συσχέτιση ως προς τα πειραματικά αποτελέσματα και η συσχέτιση βελτιώθηκε εντυπωσιακά σε (R^2 = 0.85).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί FEP/MD σε πλήρως ευέλικτα συστήματα, για τις μεταλλάξεις των σχημάτων 8.12, 8.13 και 8.14, όπου η πρωτεΐνη αφήνεται να κινηθεί ελεύθερα χωρίς κανέναν περιορισμό στους βαθμούς ελευθερίας των βαριών ατόμων.

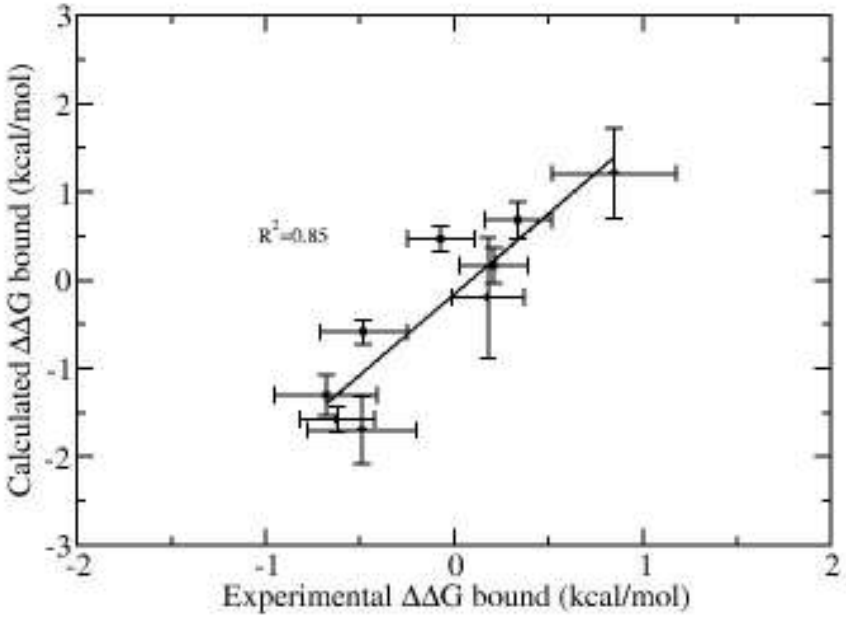


Σχήμα 8.14 Μεταλλάξεις που μελετήθηκαν με προσομοιώσεις FEP/MD εκτός αυτών των σχημάτων 8.12 και 8.13.

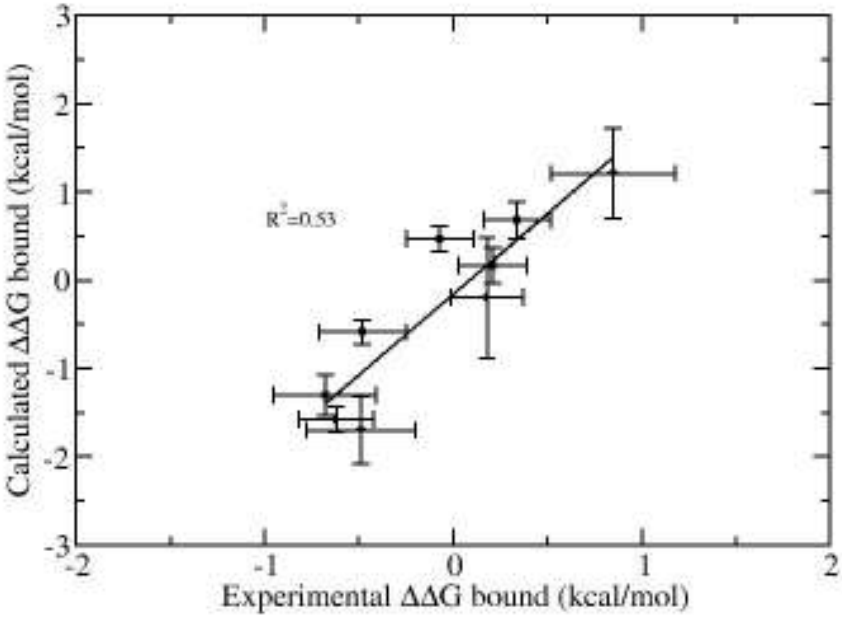
Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν για δύο πρωτεϊνικές αλληλουχίες, με την πρωτεΐνη A/M2TM ενσωματωμένη σε λιπιδική διπλοστοιβάδα DPPC. Υπολογίστηκαν οι διαφορές ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης Δ*ΔG*. Σύμφωνα με τον Θερμοδυναμικό Κύκλο υπολογίστηκαν οι Δ*G* για τις αλχημιστικές μεταβολές από όπου προκύπτει η διαφορά για τις ελεύθερες ενέργειες σύνδεσης. Από τις πειραματικές σταθερές σύνδεσης για τα αντίστοιχα ζεύγη προσδετών προκύπτει επίσης η σχετική ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης σύμφωνα με τη σχέση (8.1)

$$\Delta\Delta G = -RT \ln \frac{K_{\mathrm{A}}}{K_{\mathrm{B}}} = \Delta G_{\mathrm{B}} - \Delta G_{\mathrm{A}} \quad (8.1)$$

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών τιμών, $\Delta\Delta G_{\mathrm{bind}}$ (FEP/MD), είναι σε πολύ καλή συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα ITC, $\Delta\Delta G_{\mathrm{bind}}$ (ITC), για το σύμπλοκο **1** – M2TM που αντιστοιχεί στην αλληλουχία Udorn (σχήμα 8.15, Πίνακας 8.7). Η συσχέτιση με τις πειραματικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας να είναι (R^2 = 0.85).



Σχήμα 8.15 Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ υπολογιστικών τιμών που προέκυψαν από τους υπολογισμούς FEP/MD και των πειραματικών μετρήσεων ITC για την πρωτεΐνη Udorn.



Σχήμα 8.16 Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ υπολογιστικών τιμών που προέκυψαν από τους υπολογισμούς FEP/MD και των πειραματικών μετρήσεων ITC για την πρωτεΐνη Weybridge.

Από την άλλη, για τη δεύτερη αλληλουχία, τη Weybridge, η συμφωνία μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών αποτελεσμάτων ήταν λιγότερο καλή (σχήμα 8.16, Πίνακας 8.8), με συσχέτιση (R^2 = 0.53). Είναι πιθανό η πιο χαμηλή συσχέτιση μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών αποτελεσμάτων να οφείλεται στην αρχική δομή. Η δομή αυτή λήφθηκε μετά από προσομοίωση μοριακής δυναμικής και όχι από πειραματικά αποτελέσματα ssNMR ή κρυσταλλογραφίας. Έτσι, είναι πιθανόν η διαμόρφωση της πρωτεΐνης αυτής να είναι παγιδευμένη σε κάποιο τοπικό ελάχιστο, να μην κάλυψε άλλες περιοχές του διαμορφωτικού χώρου και να είναι λιγότερο ενεργειακά σταθερή.

Τα αποτελέσματα είναι πολύ ικανοποιητικά αν ληφθεί υπόψη η ευρύτητα της περιοχής σύνδεσης των προσδετών. Ολόκληρος ο πρωτεϊνικός δίαυλος είναι γεμάτος μόρια νερού, όπου συγκριτικά με άλλες μελέτες η περιοχή σύνδεσης είναι πολύ πιο εντοπισμένη και καλά ορισμένη.

Πίνακας 8.7 Υπολογιστικές τιμές διαφοράς ελεύθερης ενέργειας για τις περιγραφόμενες μεταβολές όπως προέκυψαν από υπολογισμούς FEP/MD στην αλληλουχία Udorn και οι σχετικές πειραματικές τιμές διαφοράς ελεύθερης ενέργειας που προέκυψαν από τις

Μετάλλαξη	$\Delta\Delta G_{bind}$ ITC[α]	$\Delta\Delta G_{bind}$ FEP/MD	$\Delta\Delta G_{solv}$ FEP/MD
(6) ⟶ (5)	-0.07 ± 0.18	0.47 ± 0.14	-0.88 ± 0.15
(5) ⟶ (4)	0.21 ± 0.18	0.17 ± 0.20	-1.41 ± 018
(4) ⟶ (3)	0.34 ± 0.18	0.68 ± 0.21	-2.82 ± 0.17
(3) ⟶ (1)	0.18 ± 0.19	-0.20 ± 0.66	3.22 ± 1.06
(2) ⟶ (1)	0.85 ± 0.33	1.21 ± 0.51	-0.86 ± 0.65
(11) ⟶ (7)	-0.48 ± 0.23	-0.59 ± 0.14	-0.98 ± 0.15
(9) ⟶ (7)	-0.68 ± 0.27	-1.30 ± 0.23	-1.14 ± 0.35
(8) ⟶ (7)	-0.49 ± 0.29	-0.71 ± 0.38	-3.55 ± 0.40
(10) ⟶ (1)	-0.62 ± 0.20	-1.58 ± 0.14	1.25 ± 0.12

[α]Οι πειραματικές ελεύθερες ενέργειες προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη σχέση $\Delta\Delta G_{πειρ} = \Delta G_B - \Delta G_A$.

Πίνακας 8.8 Υπολογιστικές τιμές διαφοράς ελεύθερης ενέργειας για τις περιγραφόμενες μεταβολές όπως προέκυψαν από υπολογισμούς FEP/MD στην αλληλουχία Weybridge και οι σχετικές πειραματικές τιμές διαφοράς ελεύθερης ενέργειας που προέκυψαν από τις μετρήσεις σταθεράς σύνδεσης κάθε προσδέτη με ITC. Οι τιμές αναφέρονται σε kcal/mol.

Μετάλλαξη	$\Delta\Delta G_{bind}$ ITC[α]	$\Delta\Delta G_{bind}$ FEP/MD	$\Delta\Delta G_{solv}$ FEP/MD
(5) ⟶ (4)	-0.05 ± 0.41	-0.34 ± 0.22	-1.41 ± 018
(4) ⟶ (3)	0.29 ± 0.41	0.41 ± 0.17	-2.82 ± 0.17
(3) ⟶ (1)	0.45 ± 0.32	1.11 ± 0.66	3.22 ± 1.06
(2) ⟶ (1)	0.83 ± 0.36	0.24 ± N/A	-0.86 ± 0.65
(11) ⟶ (7)	-0.65 ± 0.32	0.15 ± 0.15	-0.98 ± 0.15
(8) ⟶ (7)	-0.55 ± 0.26	-1.70 ± 0.40	-3.55 ± 0.40
(10) ⟶ (1)	-1.14 ± 0.28	-1.36 ± 0.13	1.25 ± 0.12

[α]Οι πειραματικές ελεύθερες ενέργειες προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη σχέση $\Delta\Delta G_{πειρ} = \Delta G_B - \Delta G_A$.

8.12.7 Ανάλυση των τροχιών

Είναι όμως εύλογο το ερώτημα *γιατί* οι ίδιοι προσδέτες παρουσιάζουν καλύτερη συγγένεια με τη μία πρωτεΐνη (Weybridge) σε σχέση με την άλλη (Udorn). Έτσι, προχωρήσαμε σε ανάλυση των τροχιών κάθε μετάλλαξης με σκοπό να βρεθούν διαφορετικές αλληλεπιδράσεις ή διαφορά στη θέση των προσδετών μέσα στον ιοντικό δίαυλο που πιθανώς να εξηγούν το παραπάνω φαινόμενο. Η ανάλυση των τροχιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας εργαλεία των λογισμικών Gromacs, VMD και Desmond.

8.12.7.1 Απόσταση αδαμαντανικού σκελετού από V27

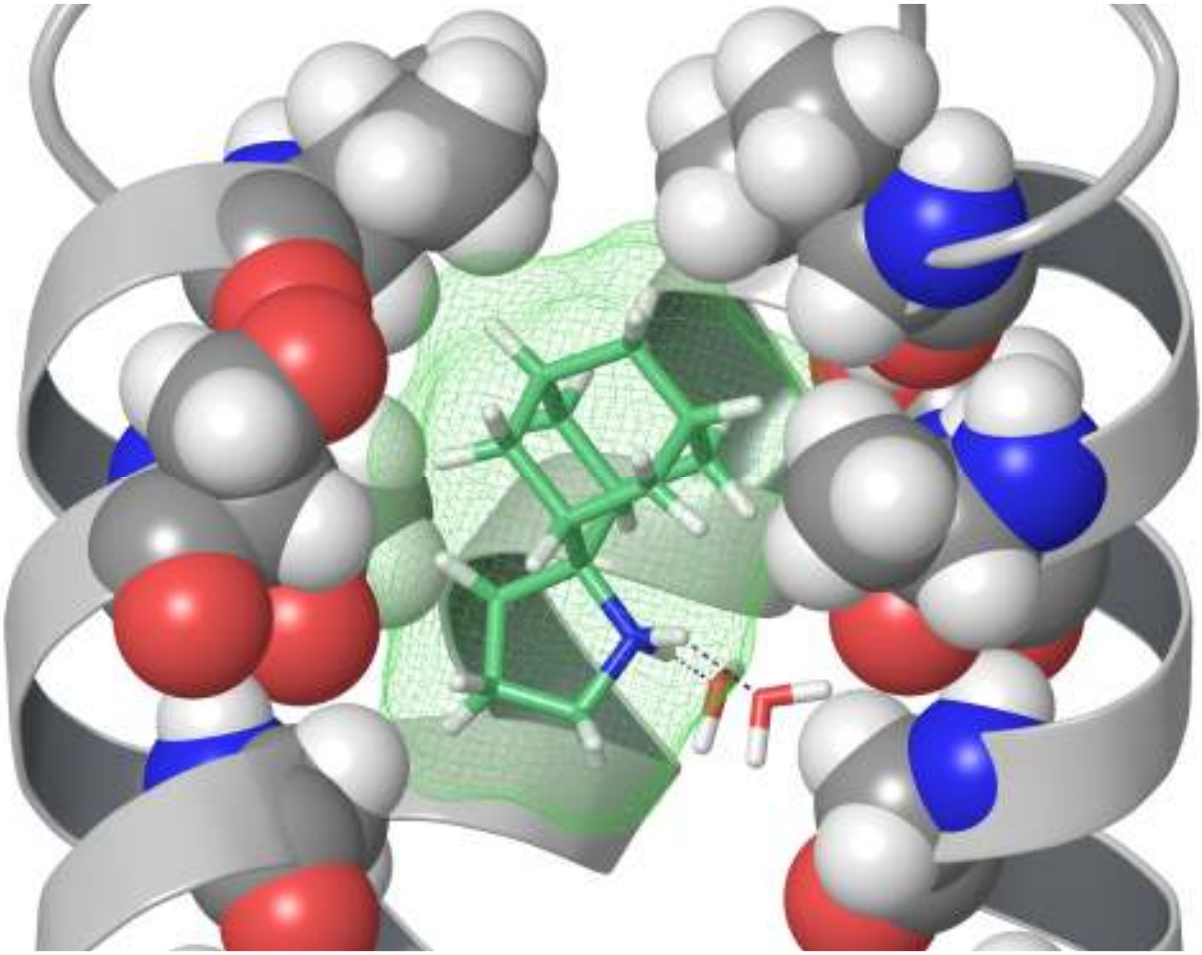
Αρχικά υπολογίστηκε η απόσταση του κέντρου μάζας του σκελετού του αδαμαντανίου από το κέντρο μάζας των V27 του διαύλου. Η V27 επιλέχθηκε επειδή είναι ένα αμινοξύ που εμπλέκεται στη σύνδεση με το αδαμαντάνιο των προσδετών στο σημείο πρόσδεσης. Στον Πίνακα 8.9 και στο σχήμα 8.17 φαίνονται οι αποστάσεις και για τις δύο πρωτεΐνες.

Πίνακας 8.9 Αποστάσεις αδαμαντανικού σκελετού από V27 (σε Å) όπως υπολογίσθηκαν με το λογισμικό Gromacs από την ανάλυση των τροχιών των προσομοιώσεων FEP/MD.

Προσδέτης	Udorn	Weybridge
1	4.313 ± 0.204	4.242 ± 0.281
2	4.331 ± 0.254	4.290 ± 0.272
3	4.195 ± 0.387	4.209 ± 0.220
4	3.976 ± 0.268	4.317 ± 0.221
5	4.068 ± 0.232	4.398 ± 0.242
6	4.512 ± 0.274	---
7	4.176 ± 0.253	4.352 ± 0.234
8	4.001 ± 0.279	4.320 ± 0.226
9	4.175 ± 0.226	---
10	4.311 ± 0.308	4.313 ± 0.221
11	4.195 ± 0.230	4.430 ± 0.193

Από τη σύγκριση των αποστάσεων αυτών είναι εμφανές ότι δε σημειώνονται σημαντικές διαφορές στη θέση των προσδετών ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Στο (σχήμα 8.16) διακρίνεται ο προσδέτης **7**, που έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στην πρωτεΐνη Udorn. Παρατηρούνται πόσο «σφιχτά» δεμένος στην περιοχή πρόσδεσης είναι ο προσδέτης αυτός κάτι που δικαιολογεί την τόσο καλή συγγένεια με τον υποδοχέα εξαιτίας των καλών

υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Διακρίνονται επίσης δύο δεσμοί υδρογόνου με δύο μόρια νερού του διαλύτη.



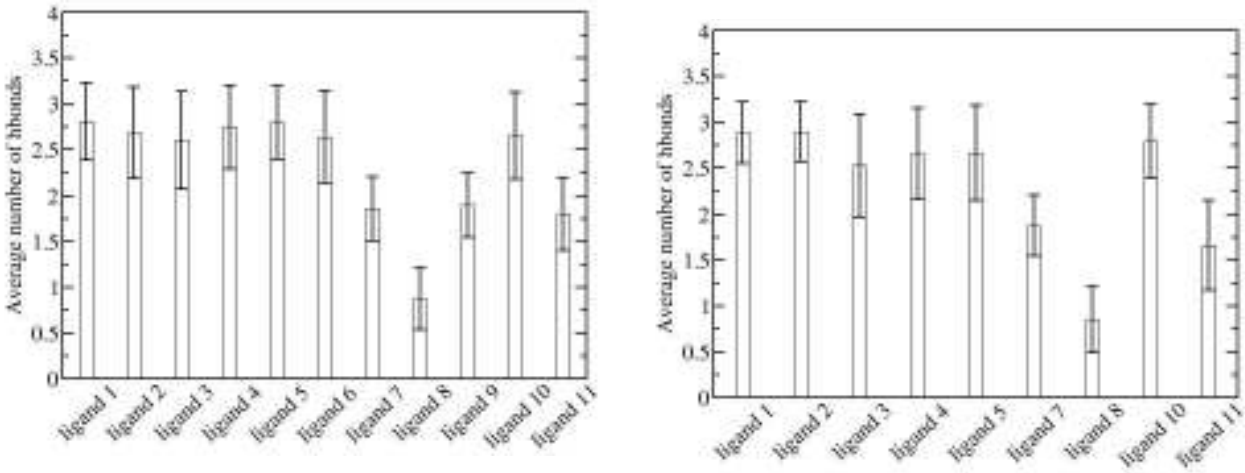
Σχήμα 8.17 Αντιπροσωπευτικό στιγμιότυπο του προσδέτη 7 εντός του διαύλου A/M2TM. Ο προσδέτης παρουσιάζεται σε *licorice* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης σε van der Waals. Διακρίνονται δύο δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του πρωτονιωμένου αζώτου της αμινομάδας και δύο μορίων νερού.

8.12.7.2 Αποτίμηση δεσμών υδρογόνου

Πραγματοποιήθηκε επίσης υπολογισμός των δεσμών υδρογόνου (Πίνακας 8.10, σχήμα 8.18) που δημιουργούνται μεταξύ της πρωτονιωμένης αμινομάδας των προσδετών και των μορίων νερού που υπάρχουν στον δίαυλο μεταξύ αμινομάδας του προσδέτη και H37.

Πίνακας 8.10 Πίνακας που απεικονίζει τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ της πρωτονιωμένης αμινομάδας των προσδετών και των μορίων νερού που βρίσκονται εντός του διαύλου.

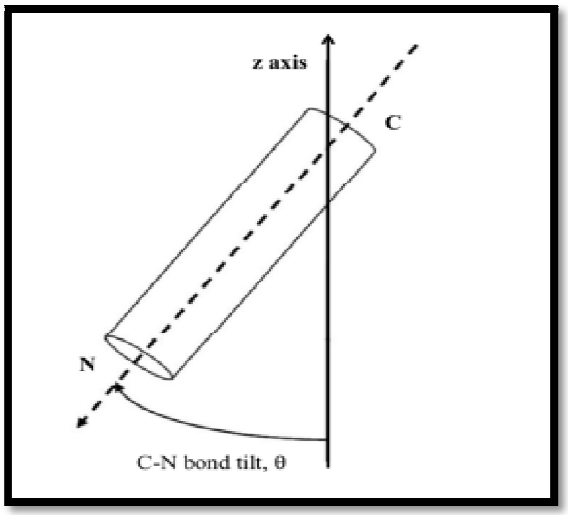
ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ	UDORN	WEYBRIDGE
1	2.810 ± 0.422	2.889 ± 0.339
2	2.696 ± 0.503	2.897 ± 0.329
3	2.607 ± 0.534	2.529 ± 0.565
4	2.750 ± 0.460	2.659 ± 0.501
5	2.798 ± 0.401	2.671 ± 0.518
6	2.643 ± 0.503	---
7	1.857 ± 0.350	1.873 ± 0.333
8	0.873 ± 0.333	0.849 ± 0.358
9	1.897 ± 0.352	---
10	2.655 ± 0.475	2.794 ± 0.405
11	1.798 ± 0.402	1.659 ± 0.491



Σχήμα 8.18 Μέσος όρος δεσμών υδρογόνου μεταξύ της ομάδας αμμωνίου των προσδετών και των μορίων νερού που βρίσκονται εντός του διαύλου για τις πρωτεΐνες Udorn (*αριστερά*) και Weybridge (*δεξιά*), όπως προέκυψε από την ανάλυση των τροχιών FEP/MD με το Gromacs.

8.12.7.3 Γωνία δεσμού C-N

Για τη μελέτη της σχέσης δομής – δράσης υπολογίστηκε η γωνία που σχηματίζεται από το δεσμό C-N του αδαμαντανικού προσδέτη και του άξονα του πόρου M2TM, έτσι ώστε να περιγραφεί η σχετική θέση των προσδετών με τον κάθετο άξονα στον πρωτεϊνικό δίαυλο (βλ. σχήμα 8.19). Τα αποτελέσματα των υπολογιστικών αυτών τιμών φαίνονται στον Πίνακα 8.11.



Σχήμα 8.19 Η γωνία μεταξύ C-N σε σχέση με τον άξονα του διαύλου [Από την Παραπομπή N° 100].

Πίνακας 8.11 Μέσος όρος γωνίας (*σε μοίρες*) C-N μερικών αμινοαδαμαντανικών προσδετών σε σχέση με τον z-άξονα του διαύλου, όπως προσδιορίστηκαν με το λογισμικό Gromacs.

ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ	UDORN	WEYBRIDGE
1	157.68 ± 4.75	146.37 ± 34.43
2	155.29 ± 3.80	161.69 ± 18.1
3	58.35 ± 6.80	62.66 ± 10.14
4	73.50 ± 6.87	64.80 ± 16.26
5	60.33 ± 5.82	62.13 ± 8.18
6	49.04 ± 6.57	---
10	157.50 ± 4.11	148.71 ± 16.0

8.12.8 Αποτελέσματα ελεύθερης ενέργειας επιδιαλύτωσης

Υπολογίστηκε, επίσης, η σχετική διαφορά ελεύθερης ενέργειας επιδιαλύτωσης, $\Delta\Delta G_{solv}$, βλ. Πίνακες 8.7 και 8.8, π.χ. η τιμή της διαφοράς ενέργειας για τη μετάλλαξη (2)→(1) (–0.86 kcal/mol) υποδηλώνει ότι η ένωση **1** συγκριτικά με την ένωση **2** χρειάζεται να δαπανήσει ένα επιπλέον ενεργειακό κόστος αποδιαλύτωσης. Δηλαδή, η αμανταδίνη προτιμά την κατάσταση σε διάλυμα από την είσοδο στον πόρο συγκριτικά με τη ριμανταδίνη. Το φαινόμενο μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη μεγαλύτερη ενέργεια σύνδεσης της ριμανταδίνης. Αυτό συμβαίνει σε όλες τις περιπτώσεις όπου ένας προσδέτης πρέπει να εγκαταλείψει το διάλυμα και να μπει στο σημείο πρόσδεσης μιας υδατοδιαλυτής πρωτεΐνης. Μάλιστα, το σημείο αυτό πρόσδεσης μπορεί να είναι βαθιά εντός της πρωτεΐνης του διαμεμβρανικού κομματιού. Έτσι, οι προσδέτες

που στοχεύουν σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πρέπει να είναι αποδιαλυτωμένοι για να προσδεθούν στον υποδοχέα.

Για τη μετάλλαξη (6) →(5), δηλαδή κατά τη μείωση ενός μεθυλίου στη 2- θέση του αδαμαντανίου, η αρνητική τιμή της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας επιδιαλύτωσης (-0.88 kcal/mol) δηλώνει ότι ο προσδέτης **6** «προτιμά» την επιδιαλυτωμένη του κατάσταση. Όμοια συμπεριφορά παρατηρείται και για τις μεταλλάξεις (5)→ (4) και (4) →(3). Με την ελάττωση ωστόσο της αλκυλίωσης στη 2- θέση, το πέναλτι της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας αποδιαλύτωσης αυξάνεται, δηλαδή οι προσδέτες με μικρότερη ανθρακική αλυσίδα στη 2-θέση του αδαμαντανίου «προτιμούν» την κατάσταση σε διάλυμα. Παρατηρείται τόσο από τις πειραματικές μετρήσεις ITC όσο και από τα αποτελέσματα των υπολογισμών FEP/MD ότι τα πρόσημα των τιμών των διαφορών των σχετικών ελεύθερων ενεργειών πρόσδεσης των μετασχηματισμών αυτών είναι θετικά. Υπάρχει δηλαδή συμφωνία ότι τα μόρια με μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα εισέρχονται πιο «εύκολα» στον πόρο.

Η μετάλλαξη (3) →(1), ωστόσο, έχει θετικό πρόσημο (+3.22 kcal/mol) δείχνοντας ότι η 2-αμανταδίνη προτιμά την κατάσταση σε διάλυμα περισσότερο από την αμανταδίνη. Αυτό σημαίνει ότι η 2-Am θα έχει μεγαλύτερο κόστος αποδιαλύτωσης, δηλαδή μεταφοράς της από την κατάσταση σε διάλυμα στην κατάσταση συμπλόκου. Το κόστος αυτό είναι μία από τις συνιστώσες που ελαττώνουν τη σταθερά σύνδεσης. Τα πειραματικά, όμως, δεδομένα δείχνουν μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης για την αμανταδίνη. Η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης προσδιορίζεται από έναν συγκερασμό πολλών ενεργειακών συνιστωσών, όπως είναι το κόστος αποδιαλύτωσης και η ενέργεια αλληλεπίδρασης του προσδέτη με τον υποδοχέα. (van der Waals, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, εντροπικούς παράγοντες, κ.λπ). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, από τον Πίνακα 8.10 παρατηρείται ότι η αμανταδίνη σχηματίζει περισσότερους δεσμούς υδρογόνου. Τέλος, η μεταφορά της αμανταδίνης από το νερό στον δίαυλο πιθανώς να συνοδεύεται από μεγαλύτερη αύξηση της εντροπίας εξαιτίας της συμμετρίας της συγκριτικά με τη 2-Am. Έτσι, η θέση της εντός του διαύλου μπορεί να είναι περισσότερο τυχαία ($\Delta S_{Am} > \Delta S_{2\text{-}Am}$).

Αντίστοιχα παρατηρείται ότι για τη μετάλλαξη (8)→(7), η $\Delta\Delta G_{solv} < 0$ (-3.55 kcal/mol), δηλαδή η πυρρολιδίνη **7** ευνοείται περισσότερο σε διάλυμα συγκριτικά με τη

μεθυλοπυρρολιδίνη **8**. Και εδώ το μεγαλύτερο κόστος αποδιαλύτωσης της ένωσης **8** συμβάλλει και πιθανώς καθορίζει τη μικρότερη σταθερά σύνδεσης. Ίδιες τάσεις παρατηρούνται για το αποτέλεσμα της C-μεθυλίωσης εξετάζοντας τη μεταβολή (11) → (7). Μόνο που εδώ η $\Delta\Delta G_{solv}$ είναι λιγότερο αρνητική προτείνοντας ότι η C-μεθυλίωση ενός κατιόντος αμμωνίου μειώνει λιγότερο την ικανότητα επιδιαλύτωσης συγκριτικά με τη N-μεθυλίωση κατιόντος αμμωνίου. Αυτό είναι λογικό διότι κατά τη N-μεθυλίωση αυξάνεται ο λιπόφιλος χαρακτήρας του κατιόντος αμμωνίου, στου οποίου η αλληλεπίδραση με το νερό προκαλεί τη διάλυση. Τα υπολογιστικά αποτελέσματα συμφωνούν με τα πειραματικά[137,138] για τις μετατροπές από μεθυλαμμώνιο σε διμεθυλαμμώνιο με $\Delta\Delta G_{solv,\pi\epsilon\iota\rho}$ = 6.5 kcal/mol, ενώ για τη μετατροπή του μεθυλαμμωνίου προς το *N*-μεθυλοπροπαν-1-αμμώνιο $\Delta G_{solv,\pi\epsilon\iota\rho}$ = 0.5 kcal/mol. Είναι μόλις ΔG = 0.5 kcal/mol, δείχνοντας την αρνητική επίδραση της N-μεθυλίωσης στη διάλυση ομάδων αμμωνίου. Ομοίως, η μετάλλαξη (9)→(7), που αφορά στη «μετατροπή» ενός μεθυλίου σε υδρογόνο είναι χαμηλότερη από τη $\Delta\Delta G_{solv}$ της μετάλλαξης (8) → (7) που αφορά *N*-αλκυλίωση. Άλλωστε το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο, αφού ο προσδέτης **7** είναι λιγότερο λιπόφιλος σε σχέση με τους **8** και **9**.

Τέλος, η μετάλλαξη (10) → (1) έχει $\Delta\Delta G_{solv}$ (+1.25 kcal/mol) κάτι που δηλώνει ότι εξαιτίας της μείωσης της λιποφιλικότητας από την προσθήκη φθορίου, ο φθοριωμένος προσδέτης «προτιμά» την επιδιαλυτωμένη του κατάσταση συγκριτικά με την αμανταδίνη. Το κόστος αποδιαλύτωσης είναι μεγαλύτερο και αυτό πιθανώς καθορίζει τη μικρότερη σταθερά σύνδεσης από την αμανταδίνη, κάτι που φαίνεται και από τα πειραματικά αποτελέσματα.[128,137,139]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^{ο}

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας της A/M2TM στην αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων αναστολέων του διαύλου. Ωστόσο, για την αποτελεσματική εξεύρεση νέων αναστολέων είναι επιτακτική η ανάγκη κατανόησης του μηχανισμού δράσης των προϋπάρχοντων φαρμάκων. Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε ο δίαυλος πρωτονίων της A/M2TM σε pH 8, τόσο με πειραματικές όσο και με υπολογιστικές μεθόδους. Η προσέγγιση αυτή στοχεύει στη δημιουργία και επικύρωση ενός θεωρητικού μοντέλου που θα μπορεί πιθανώς να προβλέπει τη σχετική συγγένεια πρόσδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών στον δίαυλο χωρίς να χρειάζεται η απαιτητική και χρονοβόρα πειραματική μέτρησή τους.

Έτσι, αρχικά συντέθηκαν με τη μέθοδο πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση, και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με RP-HPLC και ESI-MS, δύο διαφορετικές αλληλουχίες της M2TM, η WT (Udorn) και η αλληλουχία Weybridge. Τα πεπτίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τη μέτρηση σταθερών σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών, που είχαν συντεθεί στο παρελθόν, με Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιλοδότησης. Οι μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκρισή τους με τα αποτελέσματα μοριακών προσομοιώσεων. Δύο διαφορετικές μέθοδοι δοκιμάστηκαν για τον έλεγχο της πρόβλεψης σύνδεσης των προσδετών αυτών, οι υπολογισμοί μοριακής προσάραξης (*docking*) και υπολογισμοί με τη μέθοδο διαταραχών ελεύθερης ενέργειας σε συνδυασμό με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (FEP/MD). Για τους υπολογισμούς προσάραξης χρησιμοποιήθηκε το τελευταίο στιγμιότυπο προσομοιώσεων MD της (2KQT.pdb) για την αλληλουχία Udorn, που έχει προσδιοριστεί με ssNMR, και της μεταλλαγμένης (2KQT.pdb) στις θέσεις V28I και L38F για την αλληλουχία Weybridge, καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμη πειραματική δομή.

Οι υπολογισμοί προσάραξης, με εξαίρεση τη συνάρτηση βαθμολογίας ChemScore για την Udorn και μόνο για τα μόρια νερού σε θέση “toggle”, δεν είχαν συσχέτιση με τα πειραματικά αποτελέσματα που προσδιορίστηκαν με ITC. Παρόλα αυτά, το αποτέλεσμα της

ChemScore R^2 = 0.50 δείχνει πως αυτοί οι υπολογισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια γρήγορη εκτίμηση της συγγένειας σύνδεσης.

Από την άλλη, πιο εύρωστες μέθοδοι (FEP/MD), οι οποίες βασίζονται σε αρχές στατιστικής μηχανικής, είχαν σαφώς καλύτερη πρόβλεψη της σχετικής συγγένειας πρόσδεσης σε σχέση με τους συμβατικούς υπολογισμούς προσάραξης. Η συσχέτιση των υπολογιστικών τιμών με τις πειραματικές μετρήσεις ήταν R^2 = 0.85 για την Udorn και R^2 = 0.53 για τη Weybridge. Είναι, εμφανές πως η πλήρης ευκινησία της πρωτεΐνης και της επιδιαλυτωμένης λιπιδικής μεμβράνης είναι απαραίτητα στοιχεία ώστε η μέθοδος FEP/MD να είναι μια επιτυχής μεθοδολογία για την πρόβλεψη σχετικών σταθερών σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών αποκλειστών και για την περαιτέρω βελτιστοποίηση τους.

Η συγκριτικά μικρότερη συσχέτιση της αλληλουχίας Weybridge σε σχέση με αυτή που λήφθηκε για την Udorn πιθανώς να οφείλεται στην αρχική δομή που χρησιμοποιήθηκε για τις μοριακές προσομοιώσεις. Η δομή της Weybridge δεν είναι πειραματικά διαθέσιμη και προέκυψε από προσομοίωση MD της πρωτεΐνης ενσωματωμένης σε ενυδατωμένη λιπιδική διπλοστιβάδα DPPC μετά από 20 ns. Είναι πιθανόν η δομή αυτή να είναι παγιδευμένη σε κάποιο τοπικό ελάχιστο και να μην κάλυψε όλη την περιοχή του δειγματοληπτικού χώρου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικά αν ληφθεί υπόψη το εύρος της περιοχής σύνδεσης που πλήρως ενυδατωμένη συγκριτικά με άλλες μελέτες όπου η περιοχή πρόσδεσης είναι πιο εντοπισμένη και δεν υπάρχουν μόρια νερού.

Ακόμη, αναλύθηκαν οι τροχιές των προσομοιώσεων MD που παρήχθησαν ύστερα από τις προσομοιώσεις FEP/MD με σκοπό την εξήγηση της καλύτερης συγγένειας σύνδεσης των προσδετών στην αλληλουχία Weybridge έναντι της Udorn. Δυστυχώς, μετά από την ανάλυση στοιχείων, όπως η θέση των προσδετών μέσα στον δίαυλο και ο αριθμός των σχηματιζόμενων δεσμών υδρογόνου, δεν προέκυψε κάποιο αποτέλεσμα που να εξηγεί την τάση αυτή.

Τέλος, υπολογίστηκε η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια επιδιαλύτωσης, αφού είναι σημαντικός παράγοντας κατά τη διαδικασία εύρεσης νέων φαρμάκων. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι μειώνοντας το κόστος αποδιαλύτωσης, διευκολύνεται η είσοδος των προσδετών στην κοιλότητα πρόσδεσης μέσα στη μεμβρανική πρωτεΐνη οπότε μπορεί να εξασφαλιστεί καλύτερη συγγένεια σύνδεσης. Π.χ. η προσθήκη ενός $CHCH_3$ στο αδαμαντάνιο από την

αμανταδίνη στη ριμανταδίνη μπορεί να ελαττώσει το κόστος αποδιαλύτωσης και να οδηγήσει σε καλύτερη συγγένεια σύνδεσης, όπως φαίνεται από τις πειραματικές σταθερές σύνδεσης τους και όπως επιβεβαιώθηκε από υπολογισμούς διαταραχών ελεύθερης ενέργειας. Παρόλα αυτά, η αύξηση της λιποφιλίας μπορεί να ελαττώσει τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις εντός του πόρου οδηγώντας σε μικρότερη συγγένεια των 2-αλκυλο-2-αμινοαδαμανταναμινών συγκριτικά με τη 2-αδαμανταναμίνη. Επομένως, για την επίτευξη ισχυρής σύνδεσης αμινοαδαμανταναμικών αναλόγων στην M2TM χρειάζεται ένας βέλτιστος συγκερασμός των δύο φαινομένων.

ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Palese, P.; Shaw, M. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, D.M. Knipe and P. M. Howley, Editors, Fields Virology, Williams & Wilkins,* **2007**.
2. McMurry, J. *Organic Chemistry, Brooks/Cole Publishing Company, 4th Ed.,* **2004**.
3. Κολοκούρης, Α. *Υπολογιστική Χημεία Μοριακών Συστημάτων, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα,* **2011**.
4. Lewars, E. G. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics, Springer Ed., 16th ed.,* **2011**.
5. Abramowitz, M.; Stegun, I. A. *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs and Mathematical Tables,* **1972**.

ΕΙΔΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Bouvier, N. M.; Palese, P. The Biology of Influenza Viruses. *Vaccine* **2008**, *26*, D49–D53.

(2) Zebedee, S. L.; Lamb, R. a. Influenza A Virus M2 Protein: Monoclonal Antibody Restriction of Virus Growth and Detection of M2 in Virions. *Journal of virology* **1988**, *62*, 2762–2772.

(3) Pielak, R. M.; Chou, J. J. Influenza M2 Proton Channels. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1808*, 522–529.

(4) Lamb, R. A.; Zebedee, S. L.; Richardson, C. D. Influenza Virus M2 Protein Is an Integral Membrane Protein Expressed on the Infected-cell Surface. *Cell* **1985**, *40*, 627–633.

(5) Wang, C.; Lamb, R. a; Pinto, L. H. Activation of the M2 Ion Channel of Influenza Virus: a Role for the Transmembrane Domain Histidine Residue. *Biophysical journal* **1995**, *69*, 1363–1371.

(6) Tang, Y.; Zaitseva, F.; Lamb, R. a; Pinto, L. H. The Gate of the Influenza Virus M2 Proton Channel Is Formed by a Single Tryptophan Residue. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 39880–39886.

(7) Chen, B. J.; Leser, G. P.; Jackson, D.; Lamb, R. a. The Influenza Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Interacts with the M1 Protein and Influences Virus Assembly at the Site of Virus Budding. *Journal of virology* **2008**, *82*, 10059–10070.

(8) Hay, a J.; Wolstenholme, a J.; Skehel, J. J.; Smith, M. H. The Molecular Basis of the Specific Anti-influenza Action of Amantadine. *The EMBO journal* **1985**, *4*, 3021–3024.

(9) Lakadamyali, M.; Rust, M. J.; Babcock, H. P.; Zhuang, X. Visualizing Infection of Individual Influenza Viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 9280–9285.

(10) Helenius, A. Unpacking the Incoming Influenza Virus. *Cell* **1992**, *69*, 577–578.

(11) Sansom, M. S.; Kerr, I. D. Influenza Virus M2 Protein: a Molecular Modelling Study of the Ion Channel. *Protein. Eng.* **1993**, *6*, 65–74.

(12) Hu, J.; Fu, R.; Cross, T. The Chemical and Dynamical Influence of the Anti-viral Drug Amantadine on the M2 Proton Channel Transmembrane Domain. *Biophysical journal* **2007**, *93*, 276–283.

(13) Salom, D.; Hill, B. R.; Lear, J. D.; DeGrado, W. F. pH-dependent Tetramerization and Amantadine Binding of the Transmembrane Helix of M2 from the Influenza A Virus. *Biochemistry* **2000**, *39*, 14160–14170.

(14) Hu, J.; Fu, R.; Nishimura, K.; Zhang, L.; Zhou, H.-X.; Busath, D. D.; Vijayvergiya, V.; Cross, T. a. Histidines, Heart of the Hydrogen Ion Channel from Influenza A Virus: Toward an Understanding

of Conductance and Proton Selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 6865–6870.

(15) Kovacs, F. a; Cross, T. a. Transmembrane Four-helix Bundle of Influenza A M2 Protein Channel: Structural Implications from Helix Tilt and Orientation. *Biophysical journal* **1997**, *73*, 2511–2517.

(16) Hu, J.; Asbury, T.; Achuthan, S.; Li, C.; Bertram, R.; Quine, J. R.; Fu, R.; Cross, T. a. Backbone Structure of the Amantadine-blocked Trans-membrane Domain M2 Proton Channel from Influenza A Virus. *Biophysical journal* **2007**, *92*, 4335–4343.

(17) Schnell, J. R.; Chou, J. J. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. *Nature* **2008**, *451*, 591–595.

(18) Jolla, L.; Medical, H. H.; Biology, C. A Functionally Defined Model for the M 2 Proton Channel Of. **1997**, *94*, 11301–11306.

(19) Kukol, a; Adams, P. D.; Rice, L. M.; Brunger, a T.; Arkin, T. I. Experimentally Based Orientational Refinement of Membrane Protein Models: A Structure for the Influenza A M2 H^+ Channel. *Journal of molecular biology* **1999**, *286*, 951–962.

(20) Stouffer, A. L.; Acharya, R.; Salom, D.; Levine, A. S.; Di Costanzo, L.; Soto, C. S.; Tereshko, V.; Nanda, V.; Stayrook, S.; DeGrado, W. F. Structural Basis for the Function and Inhibition of an Influenza Virus Proton Channel. *Nature* **2008**, *451*, 596–599.

(21) Wang, C.; Takeuchi, K.; Pinto, L. H.; Lamb, R. a. Ion Channel Activity of Influenza A Virus M2 Protein: Characterization of the Amantadine Block. *Journal of virology* **1993**, *67*, 5585–5594.

(22) Czabotar, P. E.; Martin, S. R.; Hay, A. J. Studies of Structural Changes in the M2 Proton Channel of Influenza A Virus by Tryptophan Fluorescence. *Virus Research* **2004**, *99*, 57–61.

(23) Cady, S. D.; Schmidt-Rohr, K.; Wang, J.; Soto, C. S.; Degrado, W. F.; Hong, M. Structure of the Amantadine Binding Site of Influenza M2 Proton Channels in Lipid Bilayers. *Nature* **2010**, *463*, 689–692.

(24) Cady, S. D.; Wang, J.; Wu, Y.; DeGrado, W. F.; Hong, M. Specific Binding of Adamantane Drugs and Direction of Their Polar Amines in the Pore of the Influenza M2 Transmembrane Domain in Lipid Bilayers and Dodecylphosphocholine Micelles Determined by NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 4274–4284.

(25) DeCoursey, T. E.; Cherny, V. V. Common Themes and Problems of Bioenergetics and Voltage-gated Proton Channels. *Biochimica et biophysica acta* **2000**, *1458*, 104–119.

(26) DeCoursey, T. E. Voltage-gated Proton Channels and Other Proton Transfer Pathways. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 475–579.

(27) Wang, J.; Pielak, R. M.; McClintock, M. A.; Chou, J. J. Solution Structure and Functional Analysis of the Influenza B Proton Channel. **2011**, *16*, 1267–1271.

(28) Pielak, R. M.; Schnell, J. R.; Chou, J. J. Mechanism of Drug Inhibition and Drug Resistance of Influenza A M2 Channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 7379–7384.

(29) Takeuchi, H.; Okada, A.; Miura, T. Roles of the Histidine and Tryptophan Side Chains in the M2 Proton Channel from Influenza A Virus. *FEBS Letters* **2003**, *552*, 35–38.

(30) Kochendoerfer, G. G.; Salom, D.; Lear, J. D.; Wilk-Orescan, R.; Kent, S. B.; DeGrado, W. F. Total Chemical Synthesis of the Integral Membrane Protein Influenza A Virus M2: Role of Its C-terminal Domain in Tetramer Assembly. *Biochemistry* **1999**, *38*, 11905–11913.

(31) Duff, K. C.; Kelly, S. M.; Price, N. C.; Bradshaw, J. P. The Secondary Structure of Influenza A M2 Transmembrane Domain. A Circular Dichroism Study. *FEBS letters* **1992**, *311*, 256–258.

(32) Duff, K. C.; Ashley, R. H. The Transmembrane Domain of Influenza A M2 Protein Forms Amantadine-sensitive Proton Channels in Planar Lipid Bilayers. *Virology* **1992**, *190*, 485–489.

(33) Ma, C.; Polishchuk, A. L.; Ohigashi, Y.; Stouffer, A. L.; Schön, A.; Magavern, E.; Jing, X.; Lear, J. D.; Freire, E.; Lamb, R. a; DeGrado, W. F.; Pinto, L. H. Identification of the Functional Core of the Influenza A Virus A/M2 Proton-selective Ion Channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 12283–12288.

(34) Jing, X.; Ma, C.; Ohigashi, Y.; Oliveira, F. a; Jardetzky, T. S.; Pinto, L. H.; Lamb, R. a. Functional Studies Indicate Amantadine Binds to the Pore of the Influenza A Virus M2 Proton-selective Ion Channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 10967–10972.

(35) Holsinger, L. J.; Nichani, D.; Pinto, L. H.; Lamb, R. a. Influenza A Virus M2 Ion Channel Protein: a Structure-function Analysis. *Journal of virology* **1994**, *68*, 1551–1563.

(36) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Mitchell, A. R.; Merrifield, R. B. A General Approach to the Quantitation of Synthetic Efficiency in Solid-phase Peptide Synthesis as a Function of Chain Length. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*, 7845–7850.

(37) Mitchell, A. R.; Kent, S. B. H.; Engelhard, M.; Merrifield, R. B. A New Synthetic Route. **1978**, *43*.

(38) Matsueda, G. R.; Stewart, J. M. A P-methylbenzhydrylamine Resin for Improved Solid-phase Synthesis of Peptide Amides. *Peptides* **1981**, *2*, 45–50.

(39) Cudic, M.; Fields, G. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. 515–546.

(40) W, K.; R, G. A New Method for Synthesis of Peptides: Activation of the Carboxyl Group with Dicyclohexylcarbodiimide Using 1-hydroxybenzotriazoles as Additives. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.

(41) Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. a; Heitkamp, D. Explosive Properties of 1-hydroxybenzotriazoles. *Journal of hazardous materials* **2005**, *126*, 1–7.

(42) Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2009**, *15*, 9394–9403.

(43) Itoh, M. Racemization Suppression by the Use of Ethyl 2-Hydroximino-2-cyanoacetate and Its Amide *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1973**,*46*, 2219–2221.

(44) Carpino, L. A. An Efficient Peptide Coupling Additive'. **1993**, 4397–4398.

(45) Marder, O.; Albericio, F. Industrial Application of Coupling Reagents in Peptides. *Chimica Oggi* **2003**, *21*, 6.

(46) Fields, G. B.; Fields, C. G. Solvation Effects in Solid-phase Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 4202–4207.

(47) Cilli, E. M.; Oliveira, E.; Marchetto, R.; Nakaie, C. R. Correlation Between Solvation of Peptide-Resins and Solvent Properties(1). *The Journal of organic chemistry* **1996**, *61*, 8992–9000.

(48) Jelesarov, I.; Bosshard, H. R. Isothermal Titration Calorimetry and Differential Scanning Calorimetry as Complementary Tools to Investigate the Energetics of Biomolecular Recognition. *Journal of molecular recognition: JMR* **1999**, *12*, 3–18.

(49) Collins, K. D. Charge Density-dependent Strength of Hydration and Biological Structure. *Biophysical journal* **1997**, *72*, 65–76.

(50) Jelesarov, I.; Dürr, E.; Thomas, R. M.; Bosshard, H. R. Salt Effects on Hydrophobic Interaction and Charge Screening in the Folding of a Negatively Charged Peptide to a Coiled Coil (leucine Zipper). *Biochemistry* **1998**, *37*, 7539–7550.

(51) Freyer, M. W.; Lewis, E. a. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods in cell biology* **2008**, *84*, 79–113.

(52) Boyd, D. B.; Lipkowitz, K. B. Molecular Mechanics: The Method and Its Underlying Philosophy. *Journal of Chemical Education* **1982**, *59*, 269.

(53) Cox, P. J. Molecular Mechanics: Illustrations of Its Application. *Journal of Chemical Education* **1982**, *59*, 275.

(54) Karplus, M.; Petsko, G. A. Molecular Dynamics Simulations in Biology. *Nature* **1990**, *347*, 631–639.

(55) Wilfred, B.; Gunsteren, V.; Berendsen, C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Engl.* **1990**, *29*, 992–1023.

(56) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions. *Phys. Rev.* **1967**, *165*, 201–214.

(57) Christen, M.; Hünenberger, P. H.; Bakowies, D.; Baron, R.; Bürgi, R.; Geerke, D. P.; Heinz, T. N.; Kastenholz, M. A.; Kräutler, V.; Oostenbrink, C.; Peter, C.; Trzesniak, D.; van Gunsteren, W. F. The GROMOS Software for Biomolecular Simulation: GROMOS05. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1719–1751.

(58) Greengard, L. Fast Algorithms for Classical Physics. *Science1* **1994**, *265*, 909–914.

(59) Winn, P. J.; Ferenczy, G. G.; Reynolds, C. A. Towards Improved Force Fields: III. Polarization Through Modified Atomic Charges. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 704.

(60) Banks, J. L.; Kaminski, G. A.; Zhou, R.; Mainz, D. T.; Berne, B. J.; Friesner, R. A. Parametrizing a Polarizable Force Field from Ab Initio Data. I: The Fluctuating Point Charge Model. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 741.

(61) Mahoney, M. W.; Jorgensen, W. L. A Five-site Model for Liquid Water and the Reproduction of the Density Anomaly by Rigid, Nonpolarizable Potential Functions. *The Journal of Chemical Physics* **2000**, *112*, 8910.

(62) Rizzo, R. C.; Jorgensen, W. L. OPLS All-Atom Model for Amines: Resolution of the Amine Hydration Problem. **1999**, 4827–4836.

(63) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926.

(64) Abascal, J. L. F.; Vega, C. A General Purpose Model for the Condensed Phases of Water: TIP4P/2005. *The Journal of chemical physics* **2005**, *123*, 234505.

(65) Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentialst. **1987**, 6269–6271.

(66) Glättli, A.; Daura, X.; Van Gunsteren, W. F. A Novel Approach for Designing Simple Point Charge Models for Liquid Water with Three Interaction Sites. *Journal of computational chemistry* **2003**, *24*, 1087–1096.

(67) Flyvbjerg, H.; Petersen, H. G. Error Estimates on Averages of Correlated Data. *The Journal of Chemical Physics* **1989**, *91*, 461.

(68) Lazaridis, T. Binding Affinity and Specificity from Computational Studies. *Curr. Org. Chem* **2002**, *6*, 1319–1332.

(69) Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions *J. Mol. Biol.* **1982**, *161* (2), 269–288.

(70) Goodsell, D. S.; Olson, a J. Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing. *Proteins* **1990**, *8*, 195–202.

(71) Friesner, R. a; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. a; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: a New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47*, 1739–1749.

(72) Friesner, R. a; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. a; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-ligand Complexes. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 6177–6196.

(73) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, a R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of molecular biology* **1997**, *267*, 727–748.

(74) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J.; Al, M. E. T. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **1998**, *19*, 1639–1662.

(75) Jones, G. H.; Schneider, C.; Schneider, H. H.; Seidler, J.; Cole, B. J.; Stephens, D. N. Original Investigations Comparison of Several Benzodiazepine Receptor Ligands in Two Models of Anxiolytic Activity in the Mouse: an Analysis Based on Fractional Receptor Occupancies. **1994**, 191–199.

(76) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *Journal of molecular biology* **1995**, *245*, 43–53.

(77) Oshiro, C. M.; Kuntz, I. D.; Dixon, J. S. Flexible Ligand Docking Using a Genetic Algorithm. *Journal of computer-aided molecular design* **1995**, *9*, 113–130.

(78) Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 5061–5084.

(79) Böhm, H. J.; Klebe, G. What Can We Learn from Molecular Recognition in Protein- Ligand Complexes for the Design of New Drugs? *Angew. Chem. Int. Engl.* **1996**, *35*, 2588–2614 .

(80) Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Automated Docking. **1992**, *13*, 505–524.

(81) Boström, J.; Norrby, P.; Liljefors, T. Conformational Energy Penalties of Protein-bound Ligands. *J. Comp. Aided. Mol. Des.* **1998**, *12*, 383–396.

(82) Chemistry, P.; Weg, M. Statistical Potentials and Scoring Functions Applied to Protein – Ligand Binding Holger Gohlke and Gerhard Klebe *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 231–235.

(83) Wang, R.; Lu, Y.; Wang, S. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. *Journal of medicinal chemistry* **2003**, *46*, 2287–2303.

(84) Holloway, M. K.; Wai, J. M.; Halgren, T. a; Fitzgerald, P. M.; Vacca, J. P.; Dorsey, B. D.; Levin, R. B.; Thompson, W. J.; Chen, L. J.; deSolms, S. J. A Priori Prediction of Activity for HIV-1 Protease Inhibitors Employing Energy Minimization in the Active Site. *Journal of medicinal chemistry* **1995**, *38*, 305–317.

(85) Böhm, H. The Development of a Simple Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Constant for a Protein-ligand Complex of Known Three-dimensional Structure. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1994**, *8*, 243–256.

(86) Böhm, H. Prediction of Binding Constants of Protein Ligands: a Fast Method for the Prioritization of Hits Obtained from De Novo Design or 3D Database Search Programs. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1998**, *12*, 309–323.

(87) Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical Scoring Functions: I. the Development of a Fast Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Affinity of Ligands in Receptor Complexes. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, *11*, 425–445.

(88) Head, R. D.; Smythe, M. L.; Oprea, T. I.; Waller, C. L.; Green, S. M.; Marshall, G. R. VALIDATE: A New Method for the Receptor-Based Prediction of Binding Affinities of Novel Ligands. **1996**, 3959–3969.

(89) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *Journal of molecular biology* **1996**, *261*, 470–489.

(90) Zou, X.; Sun, Y.; Kuntz, I. D. Inclusion of Solvation in Ligand Binding Free Energy Calculations Using the Generalized-Born Model. **1999**, 8033–8043.

(91) Sippl, M. Calculation of Conformational Ensembles from Potentials of Mean Force. An Approach to the Knowledge-based Prediction of Local Structures in Globular Proteins. *J. Mol. Biol* **1990**, *213*, 859–883.

(92) Muegge, I.; Martin, Y. C. Articles A General and Fast Scoring Function for Protein - Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach. **1999**, 791–804.

(93) Mooij, W. T. M.; Verdonk, M. L. General and Targeted Statistical Potentials for Protein-ligand Interactions. *Proteins* **2005**, *61*, 272–287.

(94) Zwanzig, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *The Journal of Chemical Physics* **1954**, *22*, 1420.

(95) Baptista, L.; da Silva, E.; Arbilla, G. Oxidation Mechanism of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) by OH Radical in Liquid Phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6867–6879.

(96) Jorgensen, W. L.; Ravimohan, C. Monte Carlo Simulation of Differences in Free Energies of Hydration. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*.

(97) Gohlke, H.; Klebe, G. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-molecule Ligands to Macromolecular Receptors. *Angew. Chem. Int. Engl.* **2002**, *41*, 2644–2676.

(98) Michel, J.; Essex, J. W. Prediction of Protein-ligand Binding Affinity by Free Energy Simulations: Assumptions, Pitfalls and Expectations. *Journal of computer-aided molecular design* **2010**, *24*, 639–658.

(99) Bash, P.; Singh, U.; Brown, F.; Langridge, R.; Kollman, P. Calulation of the Relative Change in Binding Free Energy of a Protein-inhibitor Complex. *Science* **1987**, *235*, 574.

(100) Gkeka, P.; Eleftheratos, S.; Kolocouris, A.; Cournia, Z. Free Energy Calculations Reveal the Origin of Binding Preference for Aminoadamantane Blockers of Influenza A / M2TM Pore. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *9* (2), 1272–1281.

(101) Wong, C. F.; McCammon, J. A. Dynamics and Design of Enzymes and Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3830–3832.

(102) Michel , J.; Foloppe, N.; Essex, J. W. Rigorous Free Energy Calculations in Structure-Based Drug Design. *Molecular Informatics* **2010**, *29*, 570–578.

(103) Pohorille, A.; Jarzynski, C.; Chipot, C. Good Practices in Free-energy Calculations. *The journal of physical chemistry. B* **2010**, *114*, 10235–10253.

(104) Mitchell, M. J.; McCammon, J. A. Free Energy Difference Calculations by Thermodynamic Integration: Difficulties in Obtaining a Precise Value. *Journal of Computational Chemistry* **1991**, *12*, 271–275.

(105) Beutler, T. C.; Mark, A. E.; Schaik, R. C. V.; Gerber, P. R.; Gunsteren, W. F. V. Avoiding Singularities and Numerical Instabilities in Free Energy Calculations Based on Molecular Simulations. **1994**, *222*, 529–539.

(106) Michel, J.; Tirado-rives, J.; Jorgensen, W. L. Energetics of Displacing Water Molecules from Protein Binding Sites: Consequences for Ligand Optimization. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15403–15411.

(107) Michel, J.; Taylor, R. D.; Essex, J. W. Efficient Generalized Born Models for Monte Carlo Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2006**, *2*, 732–739.

(108) Michel, J.; Verdonk, M. L.; Essex, J. W. Protein-ligand Binding Affinity Predictions by Implicit Solvent Simulations: a Tool for Lead Optimization? *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 7427–7439.

(109) Åberg, K. M.; Lyubartsev, A. P.; Jacobsson, S. P.; Laaksonen, A. Determination of Solvation Free Energies by Adaptive Expanded Ensemble Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 3770.

(110) Gumbart, J. C.; Roux, B.; Chipot, C. Standard Binding Free Energies from Computer Simulations: What Is the Best Strategy? *Journal of chemical theory and computation* **2013**, *9*, 794–802.

(111) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; COOK, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.

(112) Christensen, T. A Qualitative Test for Monitoring Coupling Completences in Solid Phase Peptide Synthesis Uding Chloranil. *Acta Chem. Scand. B* **1979**, *33*, 763–766.

(113) Vojkovsky, T. Detection of Seconary Amines on Solid Phase. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 236–237.

(114) Sarin, V. K.; Kent, S. B.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative Monitoring of Solid-phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Analytical biochemistry* **1981**, *117*, 147–157.

(115) Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. *Analytical biochemistry* **1989**, *179*, 131–137.

(116) Doyle, L. Characterization Calorimetry of Binding Interactions by Isothermal Titration. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 31–35.

(117) Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Kolocouris, A.; Pouli, N.; Fytas, G.; Ikeda, S.; Clercq, E. D. Synthesis and Antiviral Activity Evaluation of Some Aminodadamantane Derivatives *J. Med.Chem.* **1994**, 2896–2902.

(118) Kolocouris, A.; Hansen, R. K.; Broadhurst, R. W. Interaction Between an Amantadine Analogue and the Transmembrane Portion of the Influenza A M2 Protein in Liposomes Probed by 1H NMR Spectroscopy of the Ligand. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47*, 4975–4978.

(119) Kolocouris, A. aNational Hellenic Research Foundation, Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Vas. Constantinou 48, 11635,Athens, Greece. bDepartment of Pharmacy, Division of Pharmaceutical Chemistry, University of Athens, Panepistimioupoli-Zografou, GR-1577. **1999**, *9*, 3465–3470.

(120) Stylianakis, I.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Fytas, G.; Foscolos, G. B.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. Spiro[pyrrolidine-2,2′-adamantanes]: Synthesis, Anti-influenza Virus Activity and Conformational Properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 1699–1703.

(121) Kolocouris, A.; Spearpoint, P.; Martin, S. R.; Hay, A. J.; López-Querol, M.; Sureda, F. X.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. Comparisons of the Influenza Virus A M2 Channel Binding Affinities, Anti-influenza Virus Potencies and NMDA Antagonistic Activities of 2-alkyl-2-aminoadamantanes and Analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18*, 6156–6160.

(122) Kanele, I.; Indulena, M.; Ryazantseva, G.; Dzeguze, D.; Polis, J. Antiviral Activity of 2-aminoadamantane. *Vestis* **1973**, *11*, 42–47.

(123) Eleftheratos, S.; Spearpoint, P.; Ortore, G.; Kolocouris, A.; Martinelli, A.; Martin, S.; Hay, A. Interaction of Aminoadamantane Derivatives with the Influenza A Virus M2 Channel-docking Using a Pore Blocking Model. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**, *20*, 4182–4187.

(124) Carugo, O.; Bordo, D. How Many Water Molecules Can Be Detected by Protein Crystallography? *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **1999**, *55*, 479–483.

(125) Bakowies, D.; van Gunsteren, W. F. Simulations of Apo and Holo-fatty Acid Binding Protein: Structure and Dynamics of Protein, Ligand and Internal Water. *Journal of molecular biology* **2002**, *315*, 713–736.

(126) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **1996**, *7863*, 11225–11236.

(127) Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-rives, J.; Jorgensen, W. L. Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides †. **2001**, *2*, 6474–6487.

(128) Shivakumar, D.; Williams, J.; Wu, Y.; Damm, W.; Shelley, J.; Sherman, W. Prediction of Absolute Solvation Free Energies Using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2010**, *6*, 1509–1519.

(129) Khurana, E.; Dal Peraro, M.; DeVane, R.; Vemparala, S.; DeGrado, W. F.; Klein, M. L. Molecular Dynamics Calculations Suggest a Conduction Mechanism for the M2 Proton Channel from Influenza A Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 1069–1074.

(130) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. **1995**, *103*, 31–34.

(131) Martyna, G. J.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. **1994**, *101*, 4177–4189.

(132) Humphreys, D. D.; Friesner, R. a.; Berne, B. J. A Multiple-Time-Step Molecular Dynamics Algorithm for Macromolecules. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 6885–6892.

(133) Bennett, C. H. Computer Time)-' Is Never Less, and May Be Several Orders of Magnitude Greater, Than That Obtained by Sampling Only One Ensemble, as Is Done in Perturbation Theory. I. INTRODUCTION. **1976**, *268*, 245–268.

(134) Boyce, S. E.; Mobley, D. L.; Rocklin, G. J.; Graves, A. P.; Dill, K. a; Shoichet, B. K. Predicting Ligand Binding Affinity with Alchemical Free Energy Methods in a Polar Model Binding Site. *Journal of molecular biology* **2009**, *394*, 747–763.

(135) Zeevaart, J. G.; Wang, L.; Thakur, V. V.; Leung, C. S.; Tirado-Rives, J.; Bailey, C. M.; Domaoal, R. a; Anderson, K. S.; Jorgensen, W. L. Optimization of Azoles as Anti-human Immunodeficiency Virus Agents Guided by Free-energy Calculations. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 9492–9499.

(136) Baggett, A.; Cournia, Z.; Han, M.; Patargias, G.; Glass, A. C.; Liu, S. Y.; Nolen, B. J. Structural Characterization and Computer-aided Optimization of a Small Molecule Inhibitor of Arp2/3 Complex, a Key Regulator of the Actin Cytoskeleton. *J. ChemMedChem* **2013**, *7*, 1286–1294.

(137) Zhang, W.; Hou, T.; Qiao, X.; Xu, X. Parameters for the Generalized Born Model Consistent with RESP Atomic Partial Charge Assignment Protocol. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 9071–9078.

(138) Sitkoff, D.; Sharp, K. a.; Honig, B. Accurate Calculation of Hydration Free Energies Using Macroscopic Solvent Models. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 1978–1988.

(139) Jasys, V. J.; Lombardo, F.; Appleton, T. a.; Bordner, J.; Ziliox, M.; Volkmann, R. a. Preparation of Fluoroadamantane Acids and Amines: Impact of Bridgehead Fluorine Substitution on the Solution- and Solid-State Properties of Functionalized Adamantanes. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 466–473.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM) ΜΕ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

Τα πειράματα Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) διεξήχθησαν στο «Ινστιτούτο Φυσικοχημείας και Θεωρητικής Χημείας» του Πανεπιστημίου του Tübingen στη Γερμανία από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Günter Gauglitz.

Α1. Θεωρητική Διαμόρφωση – Μέθοδος μη-γραμμικής προσαρμογής

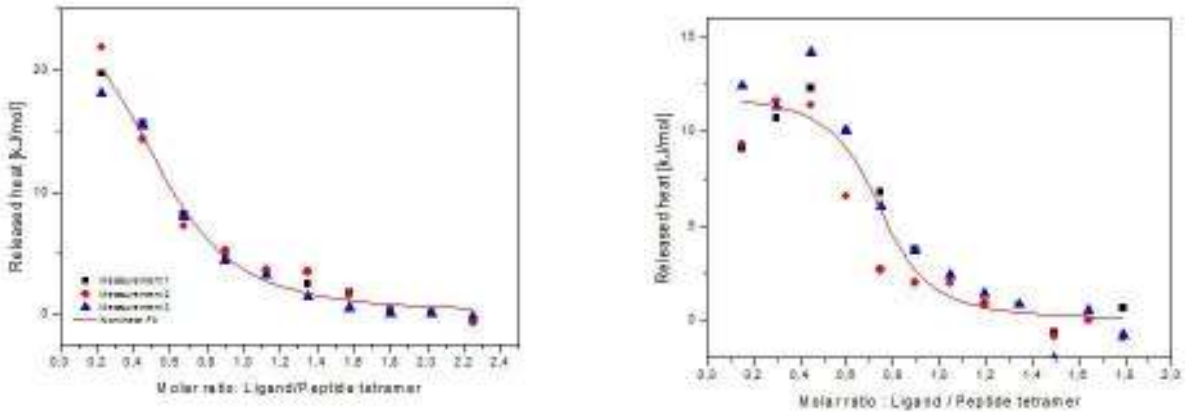
Οι σταθερές συγγένειας των αμινοαδαμαντανικών προσδετών **1 – 11**, υπολογίστηκαν με μη γραμμική προσαρμογή της μετρούμενης θερμότητας. Οι σταθερές πρόσδεσης υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Digitam σε Windows, έκδοση 4.1, που εφαρμόζει μη γραμμική προσαρμογή της μετρούμενης θερμότητας μετά από κάθε ένεση. Για τον υπολογισμό, η συγκέντρωση του πεπτιδίου ήταν μεταβλητή, δεδομένου ότι δε σχημάτισε τετραμερή όλη η ποσότητα του πεπτιδίου. Η εξίσωση στην οποία προσαρμόστηκαν οι τιμές των (x, y) = (μοριακή αναλογία προσδέτη/πεπτιδίου, θερμότητα πρόσδεσης) φαίνεται στην εξίσωση (Α.1)

$$f(x) = a\left[\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{x}{b} - r}{2\sqrt{\left(1 + \frac{x}{b} + r\right)^2 - 4\frac{x}{b}}}\right] \quad (\mathrm{A.1})$$

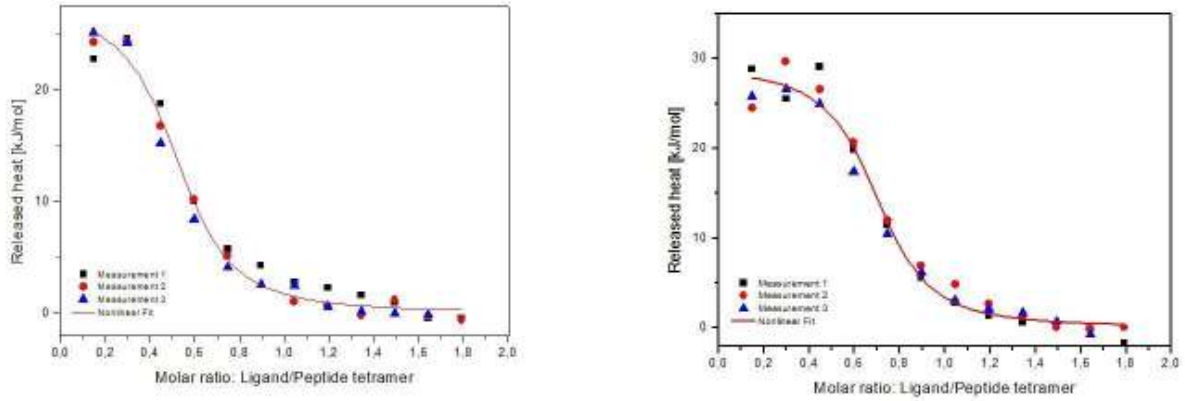
με $\Delta H_i = -a, K_d = r \cdot b \cdot c_R$, όπου c_R η συγκέντρωση του τετραμερούς.

A.2 Θερμοδιαγράμματα ITC μετρήσεων

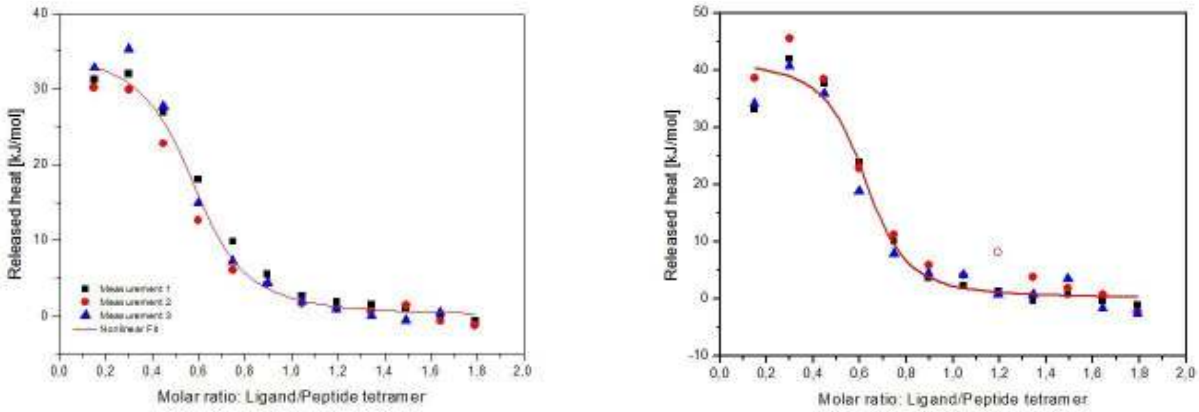
Στα σχήματα A1 – A5 φαίνονται τα θερμογράμματα που μετρήθηκαν από τα πειράματα ITC των προσδετών **1 – 11** του σχήματος 8.8, §8.10 με την αλληλουχία Udorn.



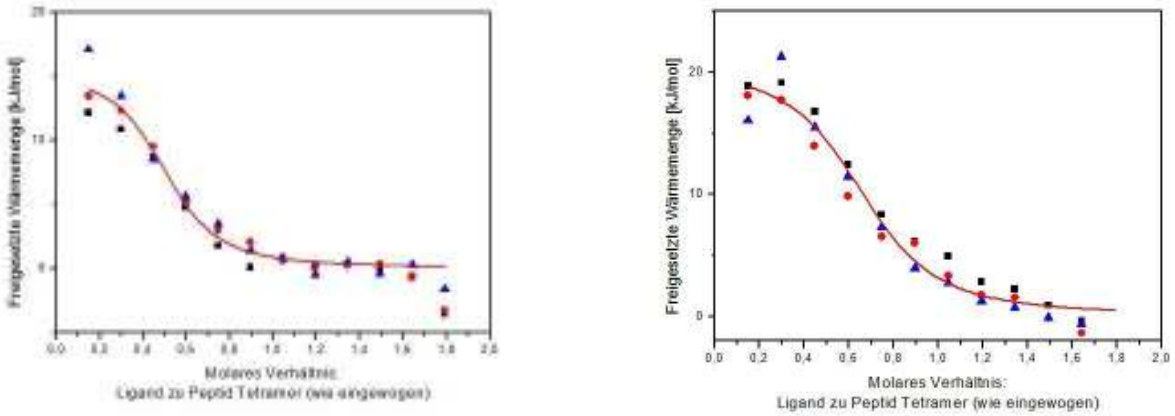
Σχήμα A1 Θερμογράμματα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκων των προσδετών 1 (*αριστερά*) και 2 (*δεξιά*) με την πεπτιδική αλληλουχία Udorn.



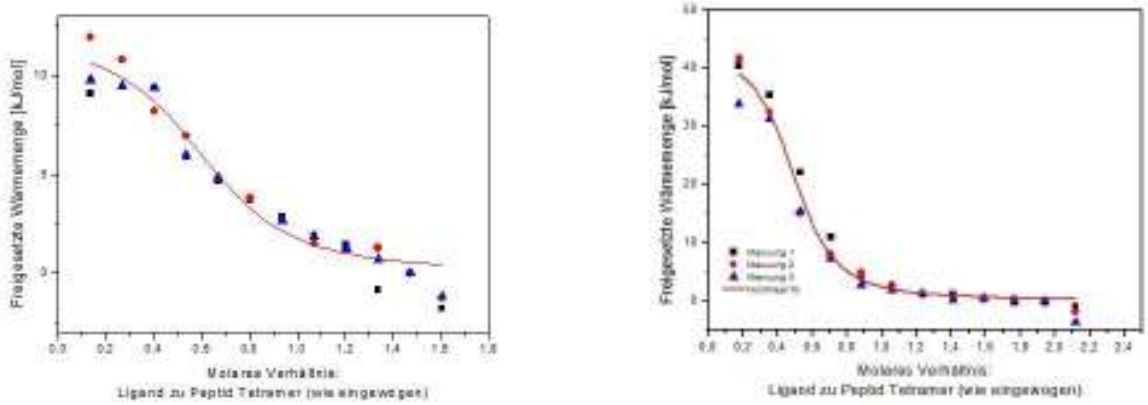
Σχήμα A2 Θερμογράμματα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκων των προσδετών 3 (*αριστερά*) και 4 (*δεξιά*) με την πεπτιδική αλληλουχία Udorn.



Σχήμα Α3 Θερμογράμματα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκων των προσδετών 6 (*αριστερά*) και 7 (*δεξιά*) με την πεπτιδική αλληλουχία Udorn.

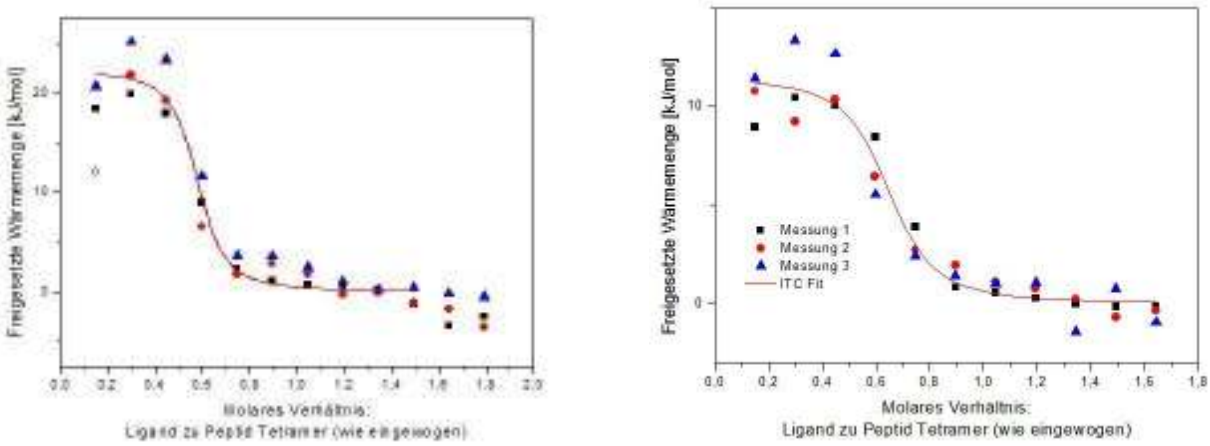


Σχήμα Α4 Θερμογράμματα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκων των προσδετών 8 (*αριστερά*) και 9 (*δεξιά*) με την πεπτιδική αλληλουχία Udorn.

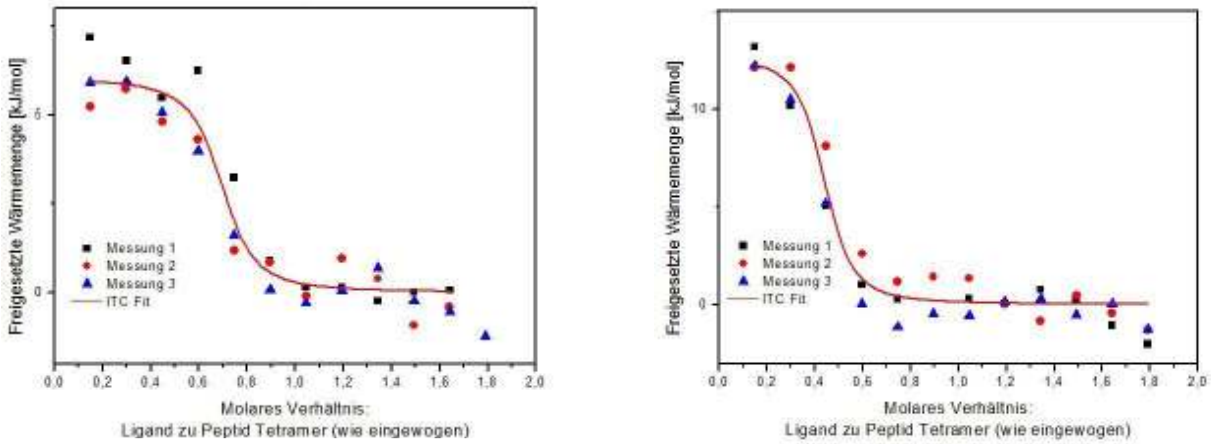


Σχήμα Α5 Θερμογράμματα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκων των προσδετών 10 (*αριστερά*) και 11 (*δεξιά*) με την πεπτιδική αλληλουχία Udorn.

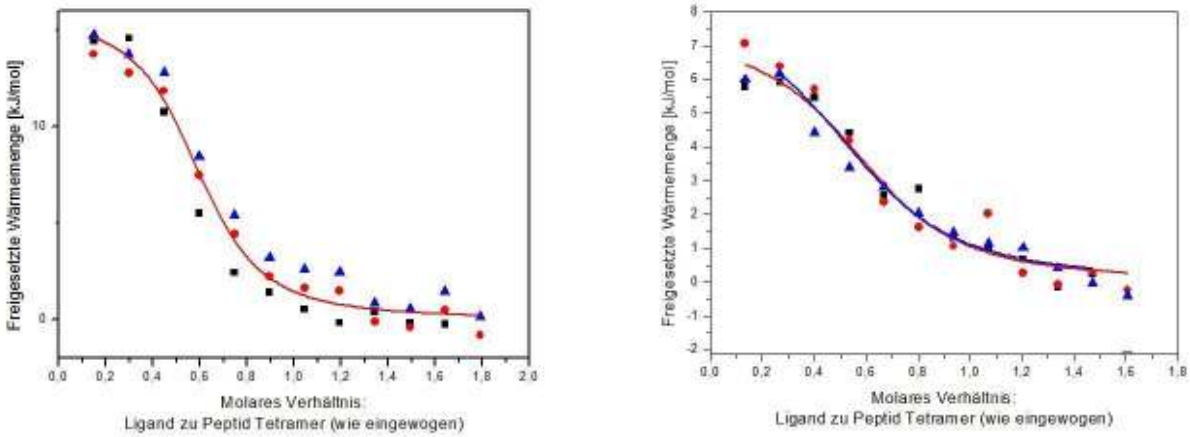
Στα σχήματα Α6 – Α9 φαίνονται τα θερμογράμματα όπως παραλήφθηκαν από τις μετρήσεις με ITC των προσδετών **1 – 11** του (σχήματος 7.x, §) με την αλληλουχία Weybridge.



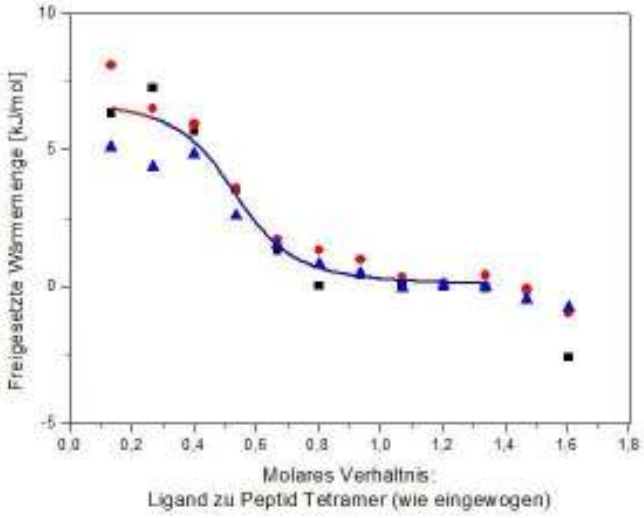
Σχήμα Α6 Θερμογράμματα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκων των προσδετών 2 (*αριστερά*) και 3 (*δεξιά*) με την πεπτιδική αλληλουχία Weybridge.



Σχήμα A7 Θερμογράμματα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκων των προσδετών 4 (*αριστερά*) και 5 (*δεξιά*) με την πεπτιδική αλληλουχία Weybridge.



Σχήμα A8 Θερμογράμματα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκων των προσδετών 8 (*αριστερά*) και 10 (*δεξιά*) με την πεπτιδική αλληλουχία Weybridge.



Σχήμα Α9 Θερμόγραμμα από τις μετρήσεις ITC κατά το σχηματισμό συμπλόκου του προσδέτη 11 με την πεπτιδική αλληλουχία Weybridge.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΑΡΑΞΗΣ ΣΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM)

Β.1 Αποτελέσματα υπολογισμών μοριακής προσάραξης

Στους πίνακες Β1 και Β2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συναρτήσεων βαθμολογίας ASP, ChemScore και GoldScore όπως προέκυψαν από τους υπολογισμούς μοριακής προσάραξης των προσδετών 1 – 11 με τις πρωτεΐνες Udorn και Weybridge, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δίνονται και για τις δύο επιλογές για τα μόρια νερού "on" (¥)και "toggle" (∫).

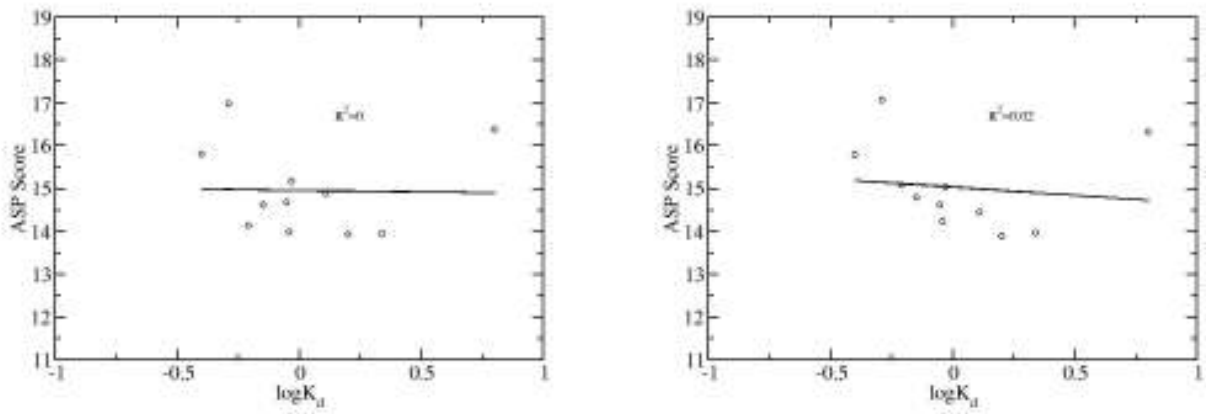
Πίνακας Β1: Τα scores των συναρτήσεων βαθμολογίας όπως προέκυψαν από τους υπολογισμούς μοριακής προσάραξης με τους αμινοαδαμαντανικούς προσδέτες 1 – 11 στην WT πρωτεΐνη, οι σταθερές συγγένειας από τις μετρήσεις ITC και οι δεκαδικοί λογάριθμοι αυτών.

Προσδέτης	ASP Score¥	ASP Score∫	ChemScore Score¥	ChemScore Score∫	GoldScore Fitness¥	GoldScore Fitness∫	K_d (μM)	$logK_d$
1	13.94	13.97	17.22	26.11	52.08	50.19	2.17	0.34
2	16.98	17.07	17.02	23.84	42.93	45.09	0.51	-0.29
3	13.93	13.88	17.95	26.67	43.92	43.88	1.60	0.20
4	14.67	14.62	18.57	26.19	41.44	38.44	0.89	-0.05
5	14.13	15.07	17.09	23.42	39.99	39.50	0.62	-0.21
6	14.61	14.78	16.17	22.99	38.43	41.19	0.71	-0.15
7	15.81	15.78	15.14	24.00	44.63	51.61	0.40	-0.40
8	15.17	15.03	11.59	24.20	22.66	44.87	0.93	-0.03
9	14.88	14.44	14.66	25.01	40.64	49.22	1.30	0.11
10	16.38	16.33	16.20	26.28	52.12	48.95	6.33	0.80
11	13.99	14.24	12.33	25.46	31.63	52.16	0.91	-0.04

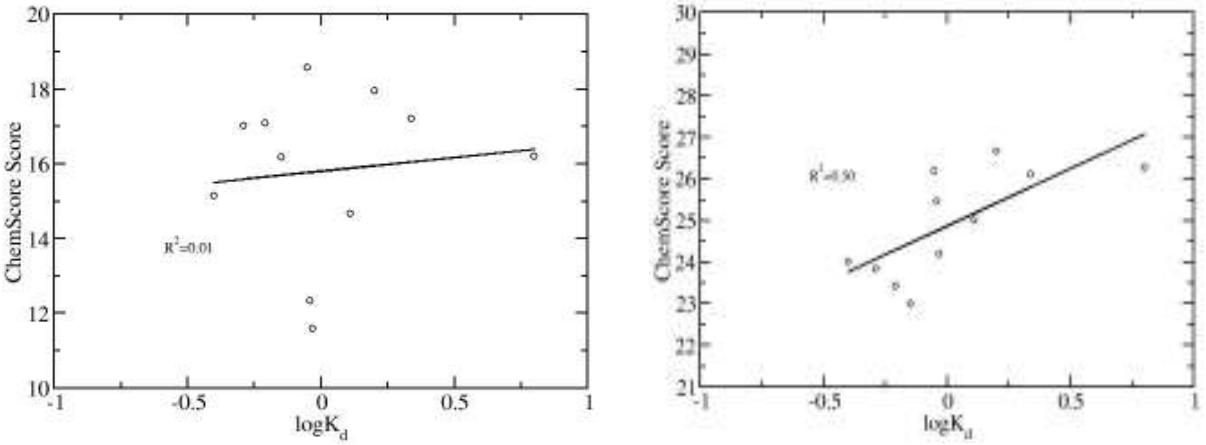
Πίνακας B2: Τα scores των συναρτήσεων βαθμολογίας όπως προέκυψαν από τους υπολογισμούς μοριακής προσάραξης με τους αμινοαδαμαντανικούς προσδέτες 1 – 11 στην αλληλουχία Weybridge, οι σταθερές συγγένειας από τις μετρήσεις ITC και οι δεκαδικοί λογάριθμοι αυτών.

Προσδέτης	ASP Score[¥]	ASP Score[∫]	ChemScore Score[¥]	ChemScore Score[∫]	GoldScore Fitness[¥]	GoldScore Fitness[∫]	K_d (μM)	$logK_d$
1	12.83	12.77	16.53	26.60	51.64	43.62	0.74	-0.13
2	14.94	14.92	14.32	23.15	42.00	42.71	0.18	-0.74
3	13.06	13.02	16.49	27.30	46.72	43.90	0.34	-0.47
4	13.19	13.24	17.57	27.77	45.25	41.84	0.21	-0.68
5	13.37	13.30	15.64	23.58	44.36	42.01	0.23	-0.64
7	13.29	13.35	14.56	23.47	42.68	40.94	1.94	0.29
8	12.54	12.39	14.12	24.09	47.13	51.32	0.38	-0.42
9	12.98	13.05	11.66	24.15	38.15	43.55	0.98	-0.01
10	15.11	15.21	16.41	26.63	52.10	47.70	5.32	0.73
11	12.15	12.20	11.63	25.71	40.96	49.36	1.18	0.07

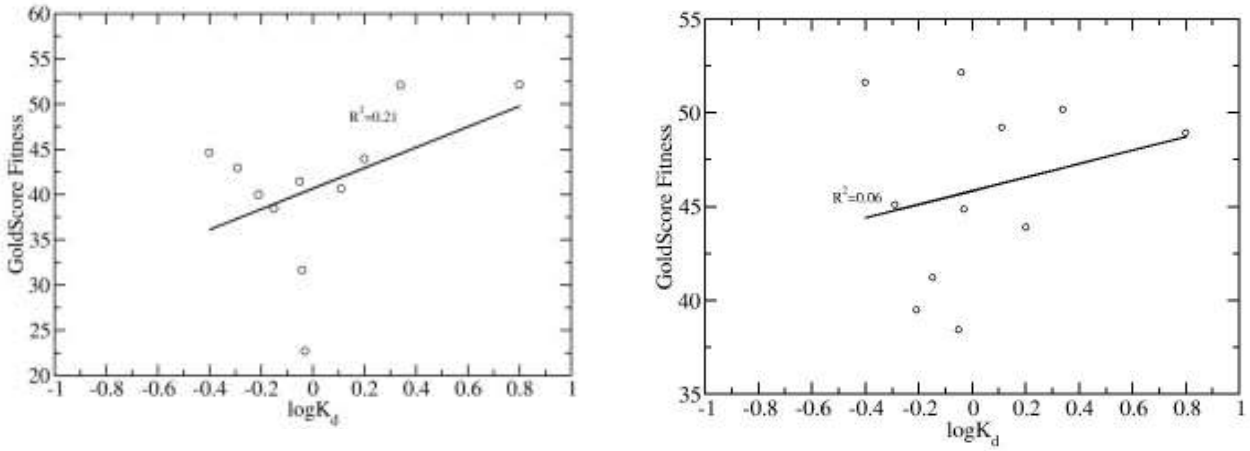
Στα σχήματα B1 – B3 και B4 – B6 απεικονίζονται οι γραφικές παραστάσεις των βαθμολογιών που λήφθηκαν με τις παραπάνω συναρτήσεις σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της σταθεράς διάστασης για την πρωτεΐνη Udorn και Weybridge, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δίνονται και για τις δύο επιλογές για τα μόρια νερού “on” και “toggle”.



Σχήμα B1 Διαγράμματα των βαθμολογιών που ελήφθησαν με τη συνάρτηση βαθμολογίας ASP σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της σταθεράς διάστασης $logK_d$ στην πρωτεΐνη A/M2TM Udorn. Η επιλογή για τα μόρια νερού ήταν “on” (αριστερά) και “toggle” (δεξιά).

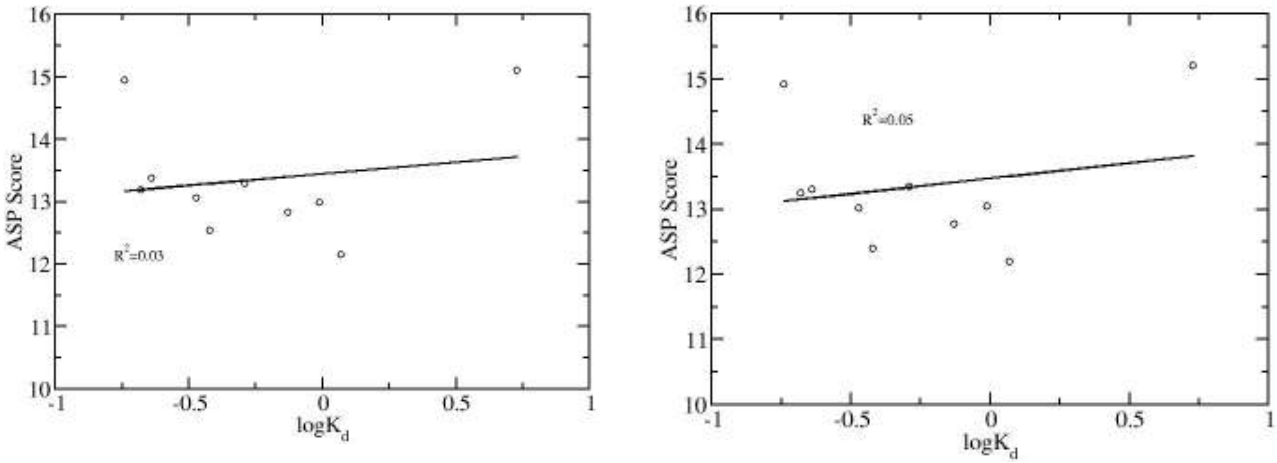


Σχήμα B2 Διαγράμματα των βαθμολογιών που ελήφθησαν με τη συνάρτηση βαθμολογίας ChemScore σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της σταθεράς διάστασης logK$_d$ στην πρωτεΐνη A/M2TM Udorn. Η επιλογή για τα μόρια νερού ήταν "on".

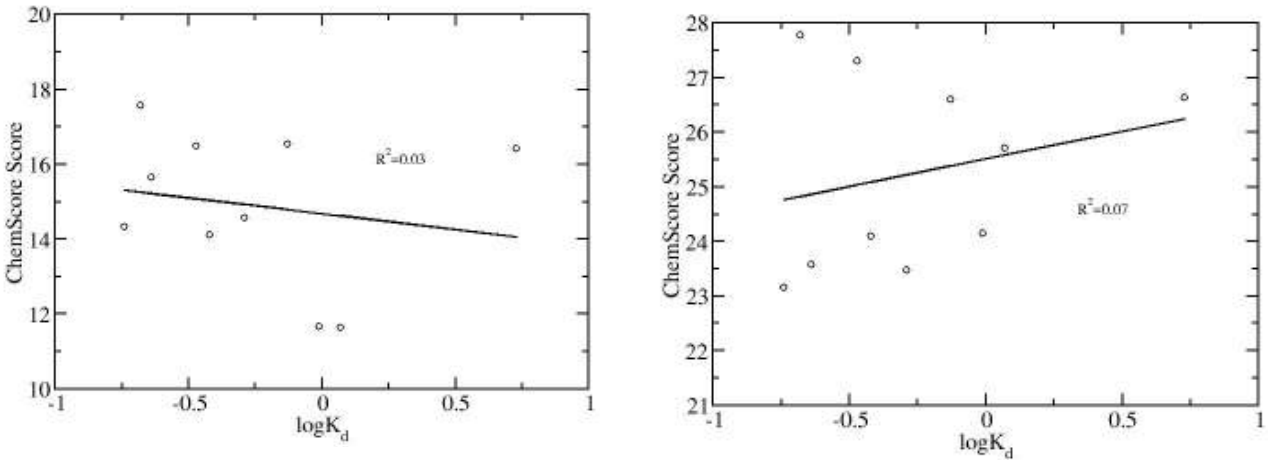


Σχήμα B3 Διαγράμματα των βαθμολογιών που ελήφθησαν με τη συνάρτηση βαθμολογίας GoldScore σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της σταθεράς διάστασης logK$_d$ στην πρωτεΐνη A/M2TM Udorn. Η επιλογή για τα μόρια νερού ήταν"on" (αριστερά) και "toggle" (δεξιά).

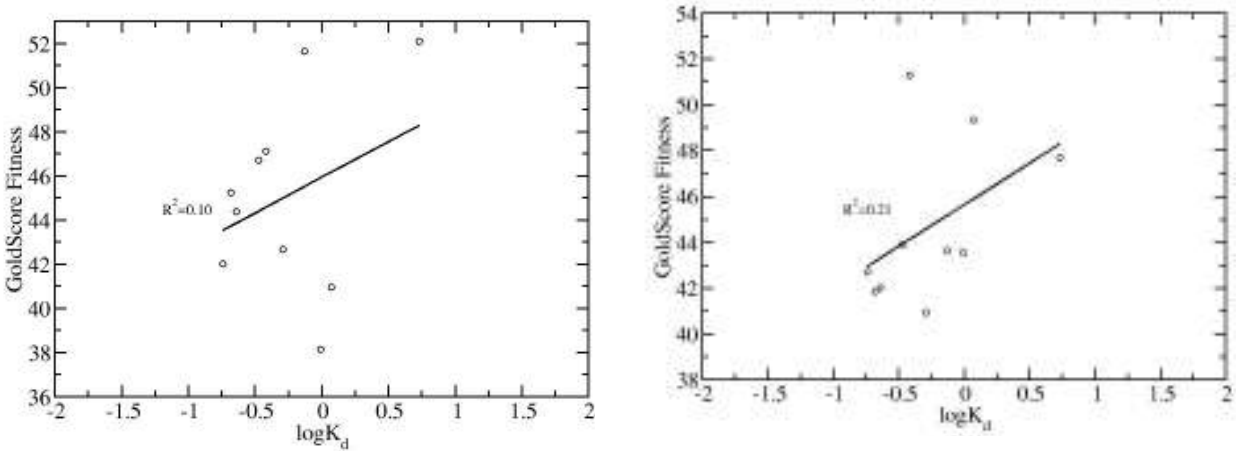
.



Σχήμα B4 Διαγράμματα των βαθμολογιών που ελήφθησαν με τη συνάρτηση βαθμολογίας ASP σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της σταθεράς διάστασης logK$_d$ στην πρωτεΐνη A/M2TM Weybridge. Η επιλογή για τα μόρια νερού ήταν "on" (αριστερά) και "toggle" (δεξιά).



Σχήμα B5 Διαγράμματα των βαθμολογιών που ελήφθησαν με τη συνάρτηση βαθμολογίας ChemScore σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της σταθεράς διάστασης logK$_d$ στην πρωτεΐνη A/M2TM Weybridge. Η επιλογή για τα μόρια νερού ήταν "on" (αριστερά) και "toggle" (δεξιά).



Σχήμα Β6 Διαγράμματα των βαθμολογιών που ελήφθησαν με τη συνάρτηση βαθμολογίας GoldScore σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της σταθεράς διάστασης logK$_d$ στην πρωτεΐνη A/M2TM Weybridge. Η επιλογή για τα μόρια νερού ήταν "on" (αριστερά) και "toggle" (δεξιά).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΙ ΜΕ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ (FEP/MD) ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΕΤΗ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM)

Γ.1 Θεωρητική Διαμόρφωση

Πίνακας Γ1 Σταδιοποίηση μεταβλητής λ*

# Παραθύρων	λ_{vdW}^{A}	λ_{vdW}^{B}	λ_{coul}^{A}	λ_{coul}^{B}
1	1.0	0.0	1.0	0.0
2	1.0	0.119	0.75	0.0
3	1.0	0.190	0.5	0.0
4	1.0	0.247	0.25	0.0
5	1.0	0.325	0.0	0.0
6	0.675	0.456	0.0	0.0
7	0.456	0.675	0.0	0.0
8	0.325	1.0	0.0	0.0
9	0.247	1.0	0.0	0.25
10	0.190	1.0	0.0	0.5
11	0.119	1.0	0.0	0.75
12	0.0	1.0	0.0	1.0

*Οι συμβολισμοί λ_{vdW} και λ_{coul} αντιστοιχούν στην κλιμάκωση των van der Waals και ηλεκτροστατικών Coulomb αλληλεπιδράσεων, αντίστοιχα.

Στη μέθοδο BAR που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, η δυναμική ενέργεια δειγματοληπτείται σε κάθε παράθυρο *i* τόσο στην πρόσθια ($i \rightarrow i+1$) όσο και στην αντίστροφη πορεία ($i+1 \rightarrow i$). Η διαφορά ελεύθερης ενέργειας ΔG_i μεταξύ των παραθύρων *i* και *i*+1

προκύπτει από τον καλύτερο συνδυασμό των δεδομένων πρόσθιας και αντίστροφης δειγματοληψίας ώστε να ελαχιστοποιείται η διακύμανσή της σύμφωνα με εξίσωση (Γ.1)

$$\sum_{j=1}^{L_i} \frac{1}{1+\frac{L_i}{L_{i+1}}\exp\left[\left(W_{i,j}^{f}-\Delta G_i\right)\Big/k_B T\right]} - \sum_{k=1}^{L_{i+1}} \frac{1}{1+\frac{L_{i+1}}{L_i}\exp\left[\left(\Delta G_i - W_{i+1,k}^{b}\right)\Big/k_B T\right]} = 0 \quad (\Gamma.1)$$

όπου L_i, L_{i+1} ο αριθμός των απεικονίσεων στο παράθυρο i και i+1 και οι σχέσεις (Γ.2) και (Γ.3) δείχνουν

$$W_i^f = V_{i+1} - V_i \quad (\Gamma.2)$$

$$W_i^b = V_{i-1} - V_i \quad (\Gamma.3)$$

τις διαφορές στη δυναμική ενέργεια για τη δειγματοληψία $i \rightarrow i+1$ και $i+1 \rightarrow i$, αντίστοιχα.

Για τον υπολογισμό του σφάλματος της πειραματικής διαφοράς ελεύθερης ενέργειας, στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάδοσης σφάλματος (*propagation error*). Ας θεωρήσουμε ότι κάθε πειραματική μέτρηση της σταθεράς συγγένειας K_α και K_b συνδέεται με ένα σφάλμα δ_α και δ_b, αντίστοιχα. Το σφάλμα της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας, $\Delta\Delta G$, εξαρτάται από τις σταθερές συγγένειας, βλ. εξίσωση (Γ.4), αφού

$$\Delta\Delta G = -RT ln\frac{a}{b} \quad (\Gamma.4)$$

όπου $K_\alpha \equiv \alpha$ και $K_b \equiv b$.

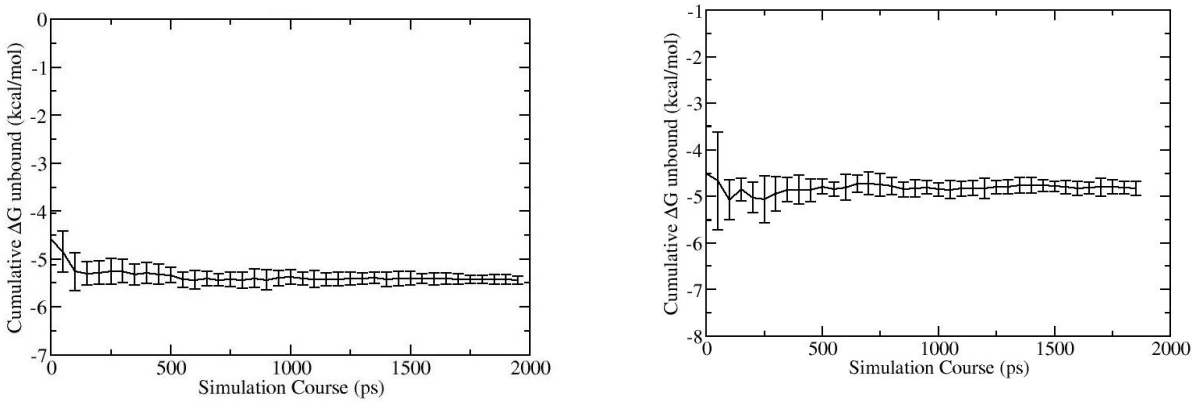
Έτσι, τα σφάλματα των δ_α και δ_b διαδίδονται στην αβεβαιότητα της $\Delta\Delta G$. Επειδή στην εξίσωση (Γ.4) η διαφορά ελεύθερης ενέργειας εξαρτάται από τον λογάριθμο του λόγου των σταθερών συγγένειας α και b, το σφάλμα της $\Delta\Delta G$ δίνεται από τις σχέσεις (Γ.5) και (Γ.6)

$$\delta f = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial a}\delta_{\alpha}\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial b}\delta_{\mathrm{b}}\right)^2} \quad (\Gamma.5) \quad \text{ή} \quad \delta f = RT\sqrt{\left(\frac{1}{a}\delta_{\alpha}\right)^2 + \left(\frac{1}{b}\delta_{\mathrm{b}}\right)^2} \quad (\Gamma.6)$$

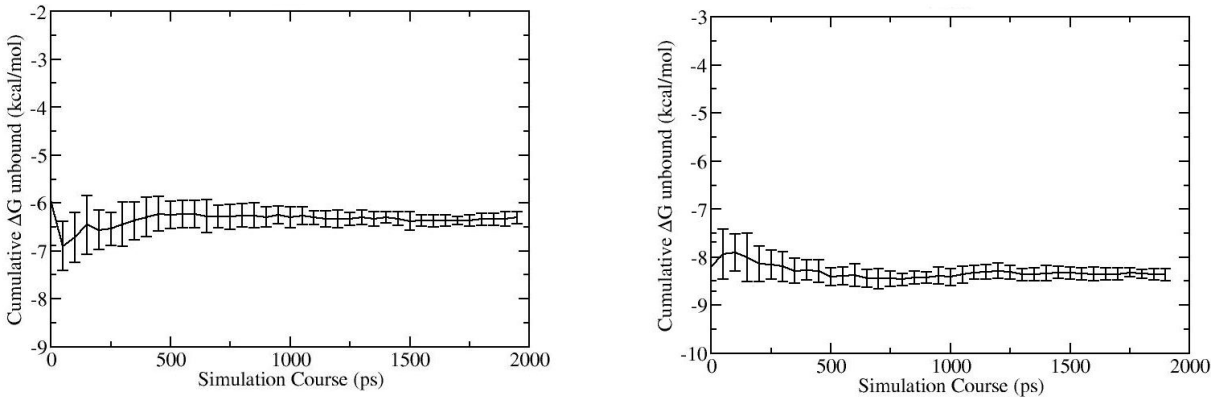
Γ.2 Σύγκλιση FEP/MD (FEP/MD Convergence)

Με σκοπό να αξιολογηθεί η σύγκλιση των υπολογισμών FEP/MD στην παρούσα εργασία, υπολογίστηκαν οι σχετικές ελεύθερες ΔG συναρτήσει του χρόνου από 50 ps έως 2000 ps σε διάλυμα και από 50 ps έως (2000 – 5000) ps (μεγαλύτεροι χρόνοι εφαρμόστηκαν σε πιο μεγάλα μόρια) σε σύμπλοκο, με προσαύξηση 50 ps, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bennett acceptance ratio, ώστε να ελεγχθεί αν τα αποτελέσματα είχαν συγκλίνει κατά το χρόνο προσομοίωσης.

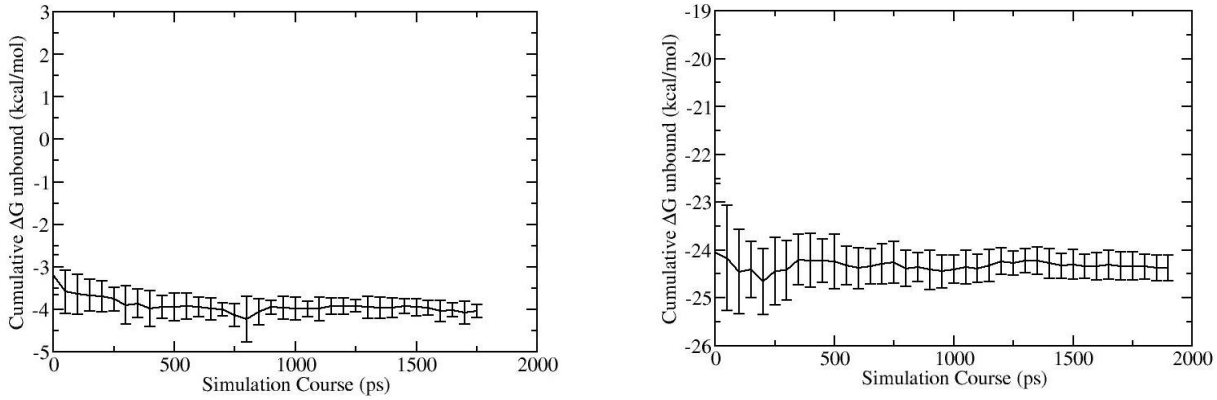
Στα διαγράμματα Γ1 – Γ6 παρουσιάζονται οι Αθροιστικές σχετικές ενέργειες (*Cumulative relative energies*) για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα.



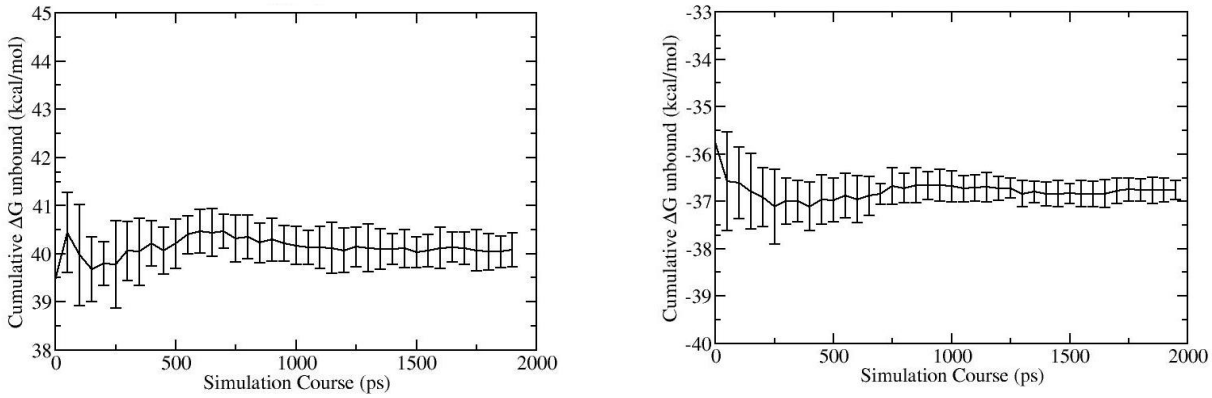
Σχήμα Γ1 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 6 ⟶ 5 (αριστερά) και 5 ⟶ 4 (δεξιά).



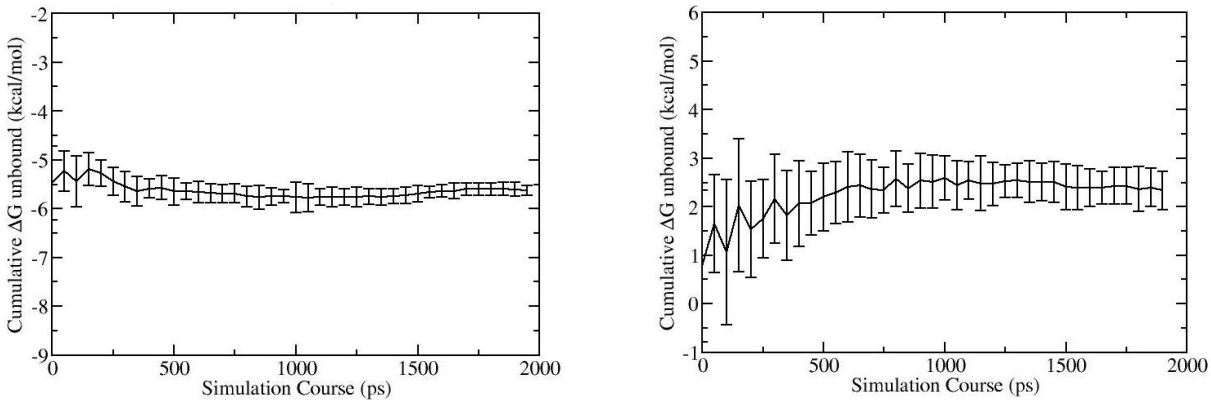
Σχήμα Γ2 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 4 ⟶ 3 (αριστερά) και 11 ⟶ 7 (δεξιά).



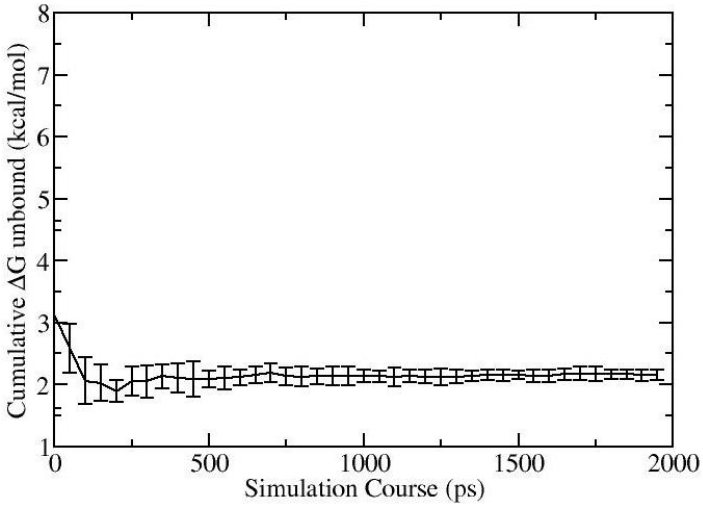
Σχήμα Γ3 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 9 → 7 (αριστερά) και 8 → 7 (δεξιά).



Σχήμα Γ4 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 3 → 12 (αριστερά) και 12 → 1 (δεξιά).

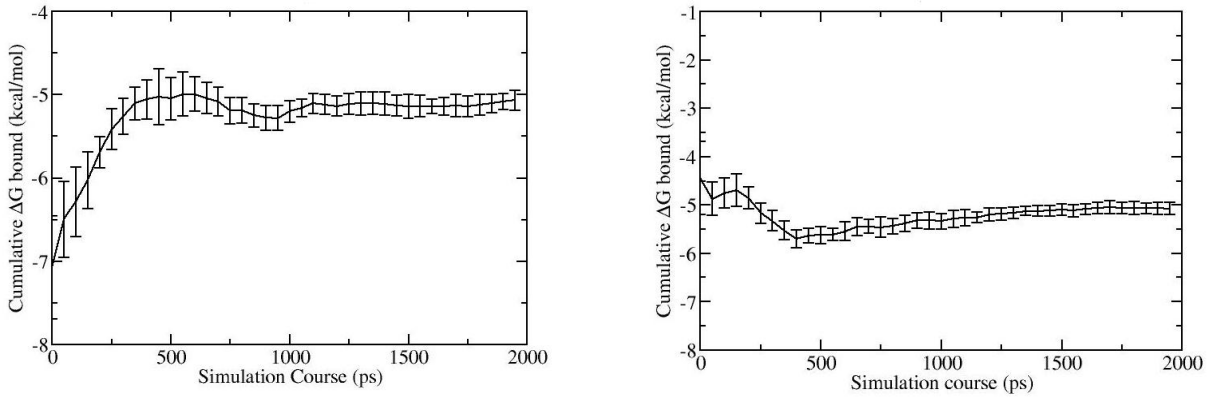


Σχήμα Γ5 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 2 ⟶ 13 (αριστερά) και 12 ⟶ 1 (δεξιά).

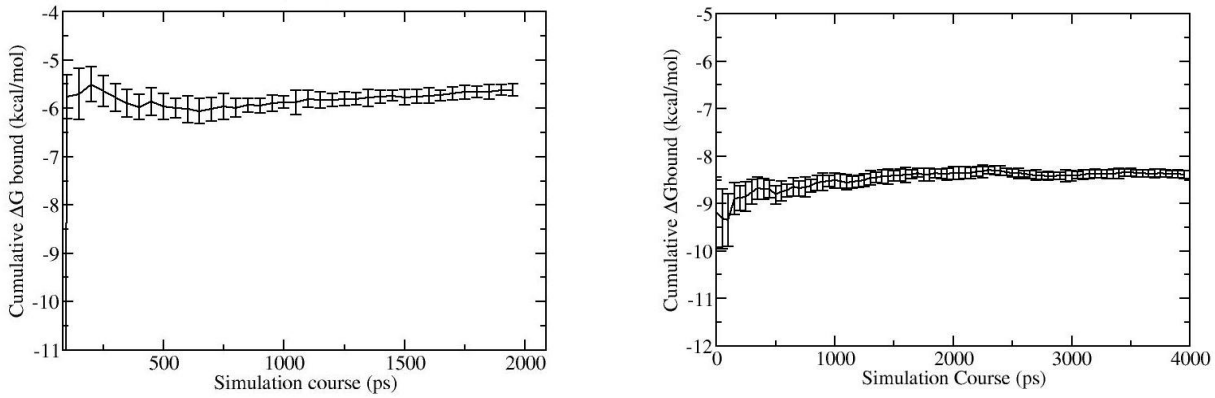


Σχήμα Γ6 Αθροιστική διαφορά ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τον υπολογισμό FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στη μετάλλαξη 10 ⟶ 1.

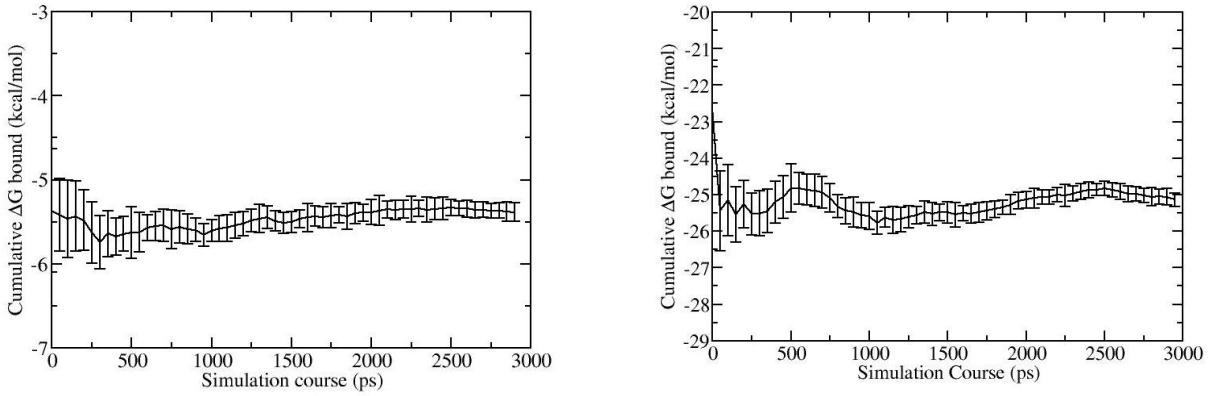
Στα διαγράμματα Γ7 – Γ12 παρουσιάζονται οι Αθροιστικές σχετικές ενέργειες για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο για την πρωτεΐνη Udorn.



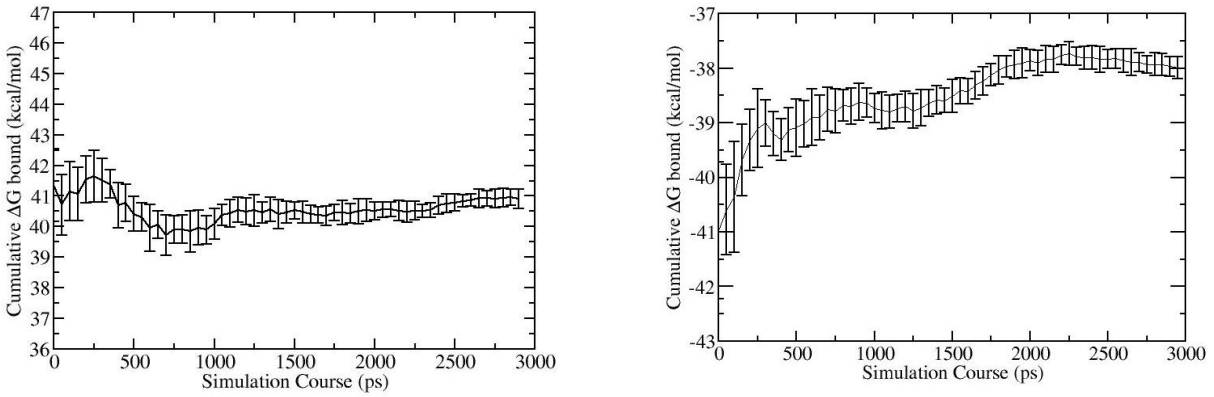
Σχήμα Γ7 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο (Udorn), που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 6 → 5 (αριστερά) και 5→ 4 (δεξιά).



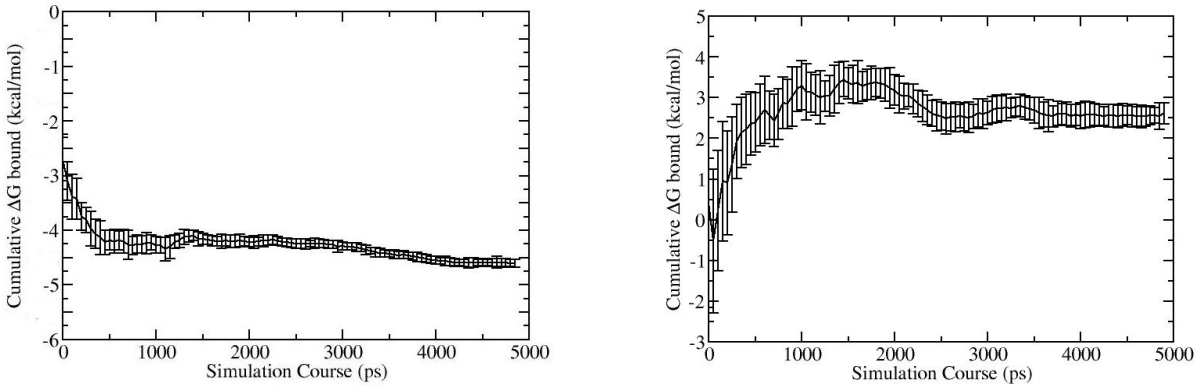
Σχήμα Γ8 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο (Udorn), που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 4 → 3 (αριστερά) και 11 →7 (δεξιά).



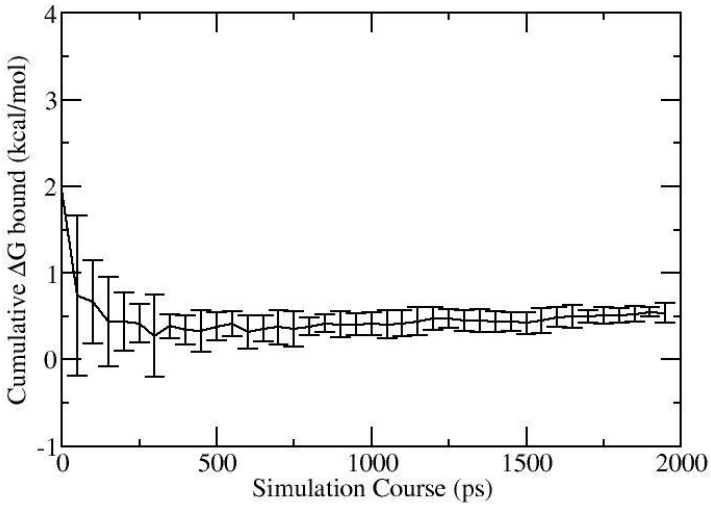
Σχήμα Γ9 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο (Udorn), που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 9 → 7 (αριστερά) και 8 →7 (δεξιά).



Σχήμα Γ10 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο (Udorn), που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 3 → 12 (αριστερά) και 12 →1 (δεξιά).

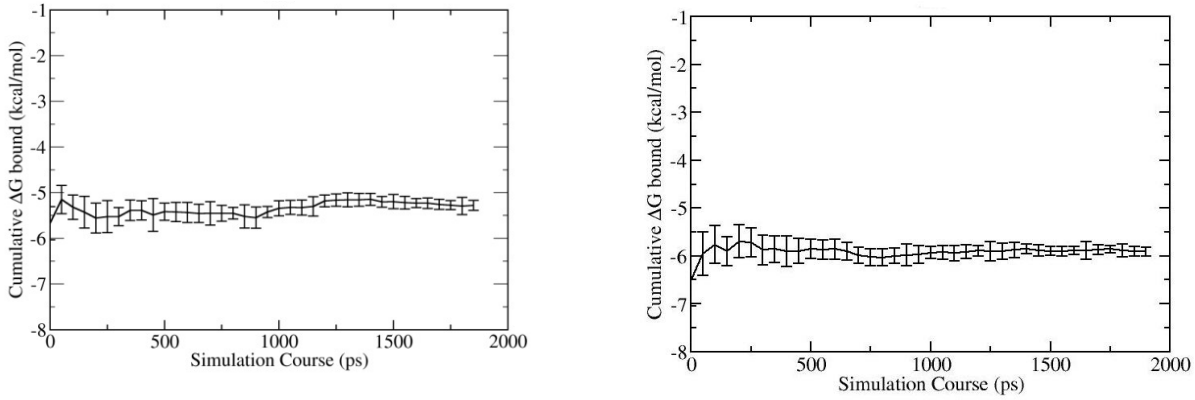


Σχήμα Γ11 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο (Udorn), που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 2 → 13 (αριστερά) και 12 →1 (δεξιά).

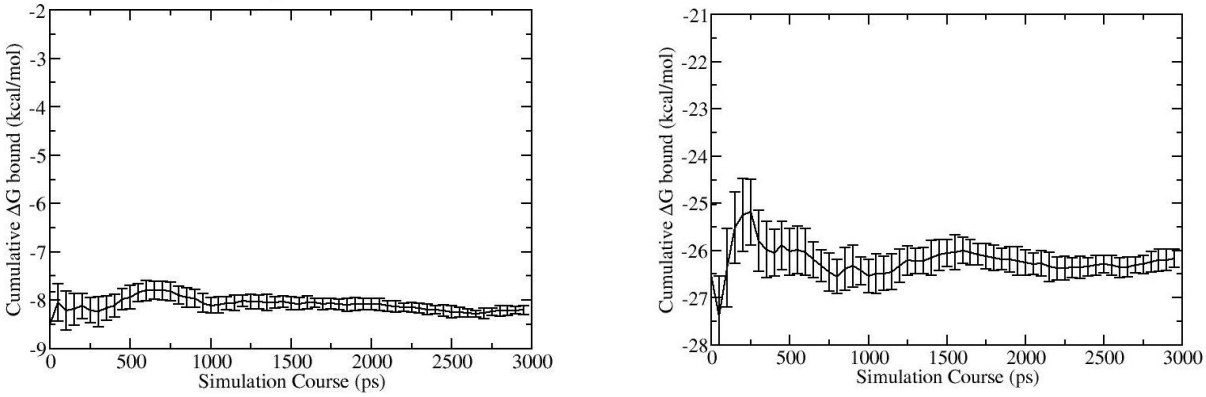


Σχήμα Γ12 Αθροιστική διαφορά ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τον υπολογισμό FEP/MD σε σύμπλοκο (Udorn), που αντιστοιχούν στη μετάλλαξη 10→1.

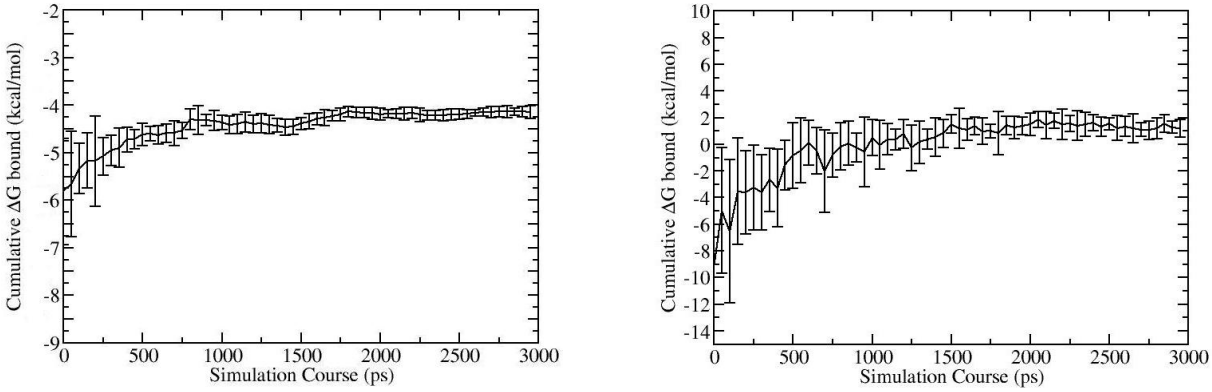
Στα διαγράμματα Γ13 – Γ17 παρουσιάζονται οι Αθροιστικές σχετικές ενέργειες για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο για την πρωτεΐνη Weybridge.



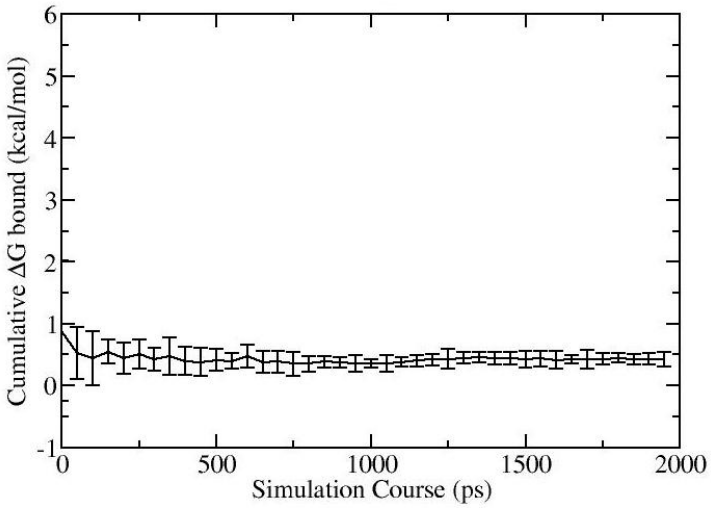
Σχήμα Γ13 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DPPC λιπιδική διπλοστοιβάδα πρωτεΐνη (Weybridge), που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 5→ 4 (αριστερά) και 4 →3 (δεξιά).



Σχήμα Γ14 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DPPC λιπιδική διπλοστοιβάδα πρωτεΐνη (Weybridge), που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 11→ 7 (αριστερά) και 8 →7 (δεξιά).



Σχήμα Γ16 Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DPPC λιπιδική διπλοστοιβάδα πρωτεΐνη (Weybridge), που αντιστοιχούν στη μετάλλαξη 2 → 1, με ένα ενδιάμεσο στάδιο. *Αριστερά*: 2 →13, *δεξιά*: και 13 →1.



Σχήμα Γ17 Αθροιστική διαφορά ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τον υπολογισμό FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DPPC λιπιδική διπλοστοιβάδα πρωτεΐνη (Weybridge), που αντιστοιχεί στη μετάλλαξη 10 →1.