



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Υπολογισμοί διατάραξης ελεύθερης ενέργειας
για τη μελέτη πρόσδεσης νευροτοξινών στο
γλουταμινικό υποδοχέα AMPA**

Σπυριδάκη Βασιλεία

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Καβουσανάκης Μιχαήλ

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2022

Περίληψη

Η ΒΜΑΑ είναι μία νευροτοξίνη, η οποία μέσω της τροφικής αλυσίδας μπορεί να εισέλθει στον ανθρώπινο οργανισμό. Όταν το ΒΜΑΑ αλληλεπιδρά με το διττανθρακικό ιόν στον άνθρωπο παράγονται καρβαμιδικά παράγωγα που έχουν παρόμοια δομή με το νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό ιόν. Πιστεύεται ότι το ΒΜΑΑ και τα καρβαμιδικά παράγωγά του προσδένονται στο σημείο πρόσδεσης γλουταμινικών υποδοχέων προκαλώντας νευρικά συμπτώματα ασθενειών όπως το Πάρκινσον και η Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση. Παρ'όλα αυτά, ο μηχανισμός δράσης του ΒΜΑΑ και των καρβαμιδικών παραγώγων του δεν έχει μελετηθεί έως τώρα.

Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιούμε μοριακές προσομοιώσεις για να υπολογίσουμε την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης του ΒΜΑΑ και των καρβαμιδικών παραγώγων του στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA σε σύγκριση με το φυσικό αγωνιστή, γλουταμινικό ιόν. Οι μελέτες αυτές θα βοηθήσουν στη μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο το ΒΜΑΑ οδηγεί σε δυσλειτουργία τα νευρικά κύτταρα προκαλώντας νευροεκφυλιστικές νόσους. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζονται προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε συνδυασμό με υπολογισμούς Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας προκειμένου να υπολογιστεί η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης του β-καρβαμιδικού παραγώγου του ΒΜΑΑ και του φυσικού αγωνιστή (γλουταμινικό ιόν) στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών υποδεικνύουν ότι το γλουταμινικό ιόν και το β-καρβαμιδικό παράγωγο του ΒΜΑΑ έχουν συγκρίσιμη ενέργεια πρόσδεσης στον υποδοχέα AMPA και επομένως είναι πιθανό παράγωγα του ΒΜΑΑ να προσδένονται ισχυρά στον γλουταμινικό υποδοχέα.

Λέξεις κλειδιά: ΒΜΑΑ, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, γλουταμινικός υποδοχέας AMPA, Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, Υπολογισμοί Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας

Abstract

BMAA is a neurotoxin, which may reach the human body through the food chain. When BMAA interacts with bicarbonate ions in the human body, two carbamate adducts are produced, which structurally resemble the neurotransmitter glutamate. It is believed that BMAA and its carbamate adducts bind to the ligand binding domain of glutamate receptors, causing the effects of neurodegenerative diseases such as Parkinson and Amyotrophic lateral sclerosis. However, the mechanism of BMAA action has not been studied yet.

In this thesis, we use molecular simulations to calculate the free energy of binding of BMAA and its carbamate adducts to the AMPA glutamate receptor in comparison with the natural agonist, glutamate. These studies will contribute to the understanding of the mechanism by which BMAA leads to dysfunction of neuronal cells, causing neurodegenerative diseases. For this purpose, we perform Molecular Dynamics simulations coupled with Free Energy Perturbation calculations in order to calculate the difference in the free energy of binding between β -carbamate adduct and the natural agonist (glutamate) to the AMPA glutamate receptor. Our results indicate that glutamate and β -carbamate adduct of BMAA have comparable binding affinities to the AMPA glutamate receptor and, therefore, it is possible that BMAA carbamate adducts can tightly bind to the AMPA glutamate receptor.

Key words: BMAA, neurodegenerative diseases, AMPA glutamate receptor, Molecular Dynamics Simulations, Free Energy Perturbation calculations

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Β' Δρ. Ζωή Κούρνια κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Μιχάλη Καβουσανάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την εργασία μου στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών σε συνεργασία με την Δρ. Ζωή Κούρνια. Τον ευχαριστώ πολύ επίσης και για τις συμβουλές του σχετικά με την παρούσα εργασία, καθώς και για όλη την βοήθεια και τις γνώσεις που μου πρόσφερε καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου στη Σχολή Χημικών Μηχανικών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ζωή Κούρνια για την δυνατότητα που μου έδωσε να γνωρίσω τον τομέα της Υπολογιστικής Χημείας μέσα από την εκπαίδευση στο εργαστήριό της και την συμμετοχή μου σε αυτή την εργασία. Την ευχαριστώ, επίσης, και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλους αυτούς τους μήνες.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές της Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, και μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής μου, Δρ. Θεόδωρο Θεοδώρου και Δρ. Φανούριο Ζαννίκο για τα εποικοδομητικά σχόλια και ερωτήματα που έθεσαν την ημέρα της εξέτασής μου.

Προχωρώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μιχάλη Παπαδουράκη για την βοήθεια και την υποστήριξη που μου παρείχε, καθώς και για τις συζητήσεις και τις συμβουλές του για την επίλυση όλων των ζητημάτων και δυσκολιών που προκύπταν κατά την εξέλιξη της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Δρ. Ζωής Κούρνιας για τη στήριξή και τις συμβουλές τους όλους αυτούς τους μήνες.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλα τα κοντινά μου πρόσωπα. Κάποιοι έχετε παρακολουθήσει την πορεία μου τα τελευταία πέντε και πλέον χρόνια, κάποιοι γνωριζόμαστε λιγότερα χρόνια, ενώ άλλοι ήρθατε στη ζωή μου πολύ πρόσφατα. Σας ευχαριστώ όλους για την ψυχολογική υποστήριξη, για την αγάπη σας και για όλες τις όμορφες αναμνήσεις όλων αυτό τον καιρό. Τέλος, δεν θα είχα καταφέρει τίποτα χωρίς την αμέριστη στήριξη και την ενθάρρυνση της οικογένειάς μου. Η περίοδος αυτή ήταν δύσκολη και δεν θα είχα καταφέρει τίποτα χωρίς εσάς. Δεν μπορώ να σας ευχαριστήσω αρκετά μέσα από αυτό το κείμενο για την συμπαράστασή σας.

Πίνακας περιεχομένων

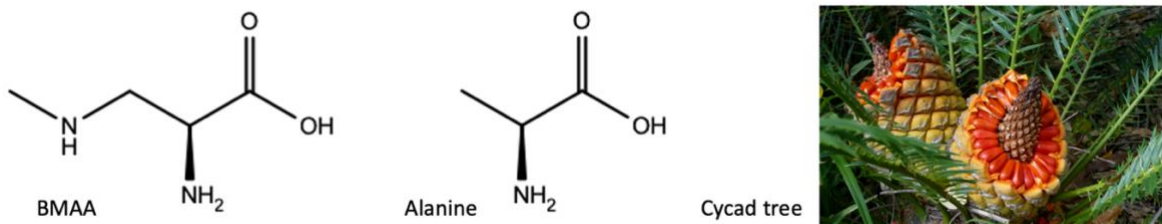
Περίληψη	2
Abstract	3
Ευχαριστίες.....	4
1. Εισαγωγή	7
1.1. Η νευροτοξίνη ΒΜΑΑ.....	7
1.2. Έκθεση του ανθρώπου στην νευροτοξίνη ΒΜΑΑ.....	7
1.3. Παραγωγή των α- και β- καρβαμιδικών νευροτοξικών παραγώγων της ΒΜΑΑ μέσω της αντίδρασης καρβαμυλίωσης	8
1.4. Γλουταμινικό ιόν και Γλουταμινικοί υποδοχείς	10
1.5. Βιολογική σημασία της ΒΜΑΑ και των καρβαμιδικών του παραγώγων.....	11
1.6. Αποτελέσματα Προηγούμενων Υπολογιστικών Ερευνών	14
1.7. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	15
2. Θεωρητικό υπόβαθρο μεθόδων.....	17
2.1. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ).....	17
2.1.1. Η Συνάρτηση της Δυναμικής Ενέργειας (Πεδίο Δυνάμεων)	17
2.1.2. Ελαχιστοποίηση της Ενέργειας του Συστήματος.....	22
2.1.3. Υπολογισμός της Τροχιάς του Συστήματος.....	23
2.1.4. Βασικά βήματα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής.....	24
2.2. Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης	26
2.3. Υπολογισμοί Διατάραξης της Ελεύθερης Ενέργειας	27
2.3.1. Υπολογισμοί Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης προσδέτη-υποδοχέα.....	27
2.3.2. Σταδιοποίηση Υπολογισμών Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας μέσω της μεταβλητής σύζευξης λ.....	29
2.3.3. Εκτίμηση της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης μέσω της μεθόδου MBAR	31
2.3.4. Σύγκλιση των υπολογισμών Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης	32
3. Αποτελέσματα.....	34
3.1. Συστήματα.....	34
3.2. Επικύρωση της μεθόδου υπολογισμού της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας (ΔΔG)	36
3.2.1. Εισαγωγή	36
3.2.2. Προετοιμασία των συστημάτων και παράμετροι προσομοιώσεων	37
3.2.3. Προσομοιώσεις FEP/MD για την διατάραξη γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1	38
3.2.4. Υπολογισμός του ΔΔG.....	39
3.3. Υπολογισμοί Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας (ΔΔG) μεταξύ γλουταμινικού και β-καρβαμιδικού συζευγμένα με τον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA	41
3.3.1. Εισαγωγή	41
3.3.2. Προετοιμασία των συστημάτων και παράμετροι προσομοιώσεων	41
3.3.3. Προσομοιώσεις FEP/MD για την διατάραξη γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό	43
3.3.4. Υπολογισμός του ΔΔG και του σφάλματος κλειστού κύκλου	44
4. Συμπεράσματα.....	59

5. Μελλοντικές Μελέτες	61
Παράρτημα 1	62
Παράρτημα 2	68
Παράρτημα 3	87
Βιβλιογραφία	94

1. Εισαγωγή

1.1. Η νευροτοξίνη BMAA

Η β-N-μεθυλάμινο-L-αλανίνη ή BMAA (β-N-methylamino-L-alanine) είναι ένα μη-πρωτεϊνικό αμινοξύ (Εικόνα 1α) ανάλογο της αλανίνης (Εικόνα 1β), το οποίο απομονώθηκε πρώτη φορά στα τέλη του 1960 από τους καρπούς του ενδογενούς φυτού της περιοχής Guam του Ειρηνικού Ωκεανού (Pacific Ocea), κύκας (cycad seeds) [1-2]. Το κύκας είναι ένα φυτό όμοιο με φοινικοειδές που ευδοκιμεί σε ζώνες τροπικού (tropic) και υποτροπικού (subtropic) κλίματος (Εικόνα 1γ) [1]. Στις αρχές του 1950, το BMAA θεωρήθηκε ως νευροτοξίνη έπειτα από παρατήρηση πολύ αυξημένων περιστατικών συμπλέγματος αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης/Πάρκινσον (amyotrophic lateral sclerosis/Parkinsonism dementia complex, ALS/PD) ανάμεσα στον πληθυσμό Chamorro, της Guam [3]. Επιπλέον, το BMAA έχει απομονωθεί από εγκεφαλικό ιστό ασθενών με Alzheimer και ALS, εκτός της περιοχής Guam [3]. Θεωρείται ότι ο τρόπος έκθεσης του ανθρώπου στην νευροτοξίνη BMAA είναι η διατροφή [1-3].



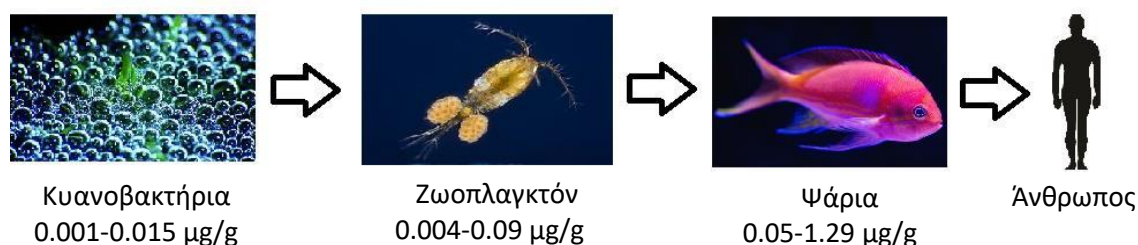
Εικόνα 1. (α) Η νευροτοξίνη BMAA, (β) Το αμινοξύ αλανίνη, (γ) Το φοινικοειδές φυτό κύκας.

1.2. Έκθεση του ανθρώπου στην νευροτοξίνη BMAA

Η θεωρία ότι το BMAA μπορεί να δρα ως περιβαλλοντική νευροτοξίνη έγινε έπειτα από την παρατήρηση αυξημένων περιστατικών συμπλέγματος αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης/ Πάρκινσον (amyotrophic lateral sclerosis/ Parkinsonism dementia complex, ALS/PD) ανάμεσα στον πληθυσμό Chamorro της περιοχής Guam [1-2]. Το BMAA μέσω της διατροφής περνά στον ανθρώπινο οργανισμό και δρα ως νευροτοξίνη είτε μέσω της ενσωμάτωσής του σε πρωτεϊνικά μόρια, είτε δρώντας στην ελεύθερη μορφή του. Στο χερσαίο οικοσύστημα της Guam, η παραγωγή του γίνεται από κυανοβακτήρια του γένους *Nostoc*, τα οποία αναπτύσσονται συμβιωτικά με άλλους μικροοργανισμούς στις ρίζες του φυτού κύκας. Οι καρποί του κύκας χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή ενός είδους αλευριού, παραδοσιακού συστατικού της διατροφής του πληθυσμού Chamorro. Εναλλακτικά, κατέληγε στον πληθυσμό μέσω της κατανάλωσης ενός είδους νυχτερίδας του γένους *Pteropus* (flying foxes), το οποίο τρέφεται από τους καρπούς του κύκας [2-3]. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά την μετάβασή στα διαδοχικά υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας, η συγκέντρωση του BMAA αυξάνεται, δηλαδή παρατηρείται το φαινόμενο της

βιομεγέθυνσης (biomagnification). Συγκεκριμένα, μελέτες για την συγκέντρωση του BMAA στα διάφορα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας έδειξαν ότι η συγκέντρωση του BMAA στα κυανοβακτήρια ήταν 72 $\mu\text{g/g}$, στους καρπούς του κύκας 98 $\mu\text{g/g}$, στη νυχτερίδα του γένους *Pteropus* 3602 $\mu\text{g/g}$ και, τελικά, στον πληθυσμό Chamorro 634 $\mu\text{g/g}$. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε $\mu\text{g BMAA/g}$ ξηρού βάρους [2].

Η νευροτοξίνη BMAA δεν συναντάται μόνο σε χερσαία οικοσυστήματα, αλλά και σε υδάτινα οικοσυστήματα, όπου παράγεται από τα περισσότερα γένη κυανοβακτηρίων που αναπτύσσονται σχηματίζοντας κηλίδες (cyanobacteria blooms) επιφανειακά των υδάτων [3]. Η ανάπτυξη κηλίδων κυανοβακτηρίων ευνοείται σε εύκρατα υδάτινα περιβάλλοντα με μεγάλο περιεχόμενο θρεπτικών συστατικών. Τα θρεπτικά συστατικά απορρίπτονται συχνά στα υδάτινα σώματα και αποτελούν ανθρωπογενείς περιβαλλοντικούς ρύπους οδηγώντας στο φαινόμενο του ευτροφισμού των υδάτων [4]. Η παραγωγή του BMAA στα υδάτινα οικοσυστήματα μπορεί να οδηγήσει στην μεταβίβασή του σε οργανισμούς των ανώτερων επιπέδων της τροφικής αλυσίδας, ακόμη και στον άνθρωπο, ενώ και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται το φαινόμενο της βιομεγέθυσής του. Συγκεκριμένα, τα κυανοβακτήρια που παράγουν BMAA καταναλώνονται από ζωοπλαγκτόν, τα οποία καταναλώνονται από ψάρια ή μαλάκια. Τελικά, το BMAA καταλήγει στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελώντας πιθανή παγκόσμια απειλή για την ανθρώπινη υγεία (Εικόνα 2) [3-4]. Στην Εικόνα 2 οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε $\mu\text{g BMAA/g}$ ξηρού βάρους και είναι ενδεικτικές, καθώς εξαρτώνται από το συγκεκριμένο υδάτινο σώμα. Δεν δίνονται δεδομένα συγκέντρωσης του BMAA στον ανθρώπινο οργανισμό [3].



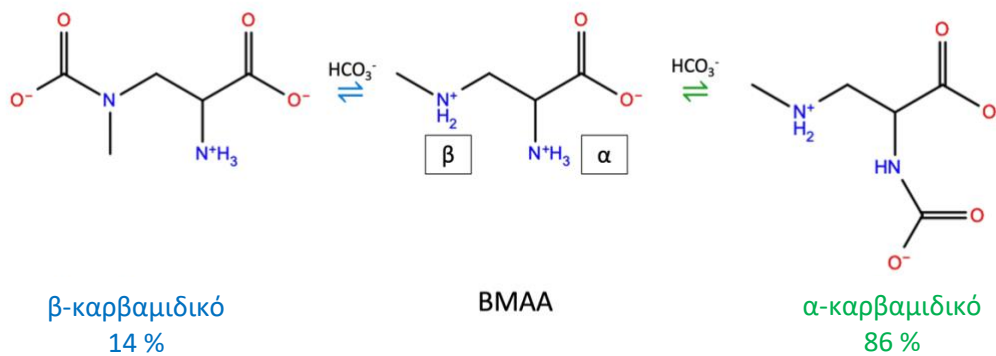
Εικόνα 2. Έκθεση του ανθρώπου στην νευροτοξίνη BMAA μέσω της τροφικής αλυσίδας. Οι τιμές συγκέντρωσης και η εικόνα λήφθηκαν από τις βιβλιογραφικές πηγές [3] και [5], αντίστοιχα.

1.3. Παραγωγή των α - και β - καρβαμιδικών νευροτοξικών παραγώγων της BMAA μέσω της αντίδρασης καρβαμύλιωσης

Σε φυσιολογικές συνθήκες (pH 7.0) οι αμινομάδες βρίσκονται σε πρωτονιομένη, ενώ οι καρβοξυλομάδες σε αποπρωτονιομένη μορφή. Το BMAA έχει δύο αμινομάδες στην πλευρική του αλυσίδα, την πρωτεύουσα (primary) ή α -αμινομάδα και τη δευτερεύουσα (secondary) ή β -αμινομάδα, με τιμές pK_a 6.63 και 9.76, αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα των τιμών pK_a , σε συνθήκες ουδέτερου pH οι α - και β -αμινομάδες βρίσκονται αποπρωτονιομένες σε διαφορετικά επίπεδα και, συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πειραματικά ότι το 86 % του BMAA βρίσκεται σε α -αποπρωτονιομένη μορφή,

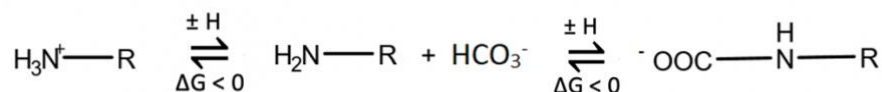
ενώ το 14 % του ΒΜΑΑ βρίσκεται σε β-αποπρωτονιομένη μορφή [1].

Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχει περίσσεια διττανθρακικών ιόντων, καθώς αποτελούν το κύριο ρυθμιστικό μέσο (buffering system) για τη διατήρηση ουδέτερων συνθηκών pH. Έχει βρεθεί ότι το ΒΜΑΑ αλληλεπιδρά με το διττανθρακικό ιόν μέσω μιας αντίδρασης που ονομάζεται καρβαμυλίωση [1]. Το αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι η παραγωγή δύο καρβαμιδικών παραγώγων του ΒΜΑΑ. Λόγω των ποσοστών που προκύπτουν από τις τιμές pK_a , παράγεται 86 % α-καρβαμιδικού παραγώγου και 14 % β-καρβαμιδικού παραγώγου του ΒΜΑΑ (Εικόνα 3) [1].

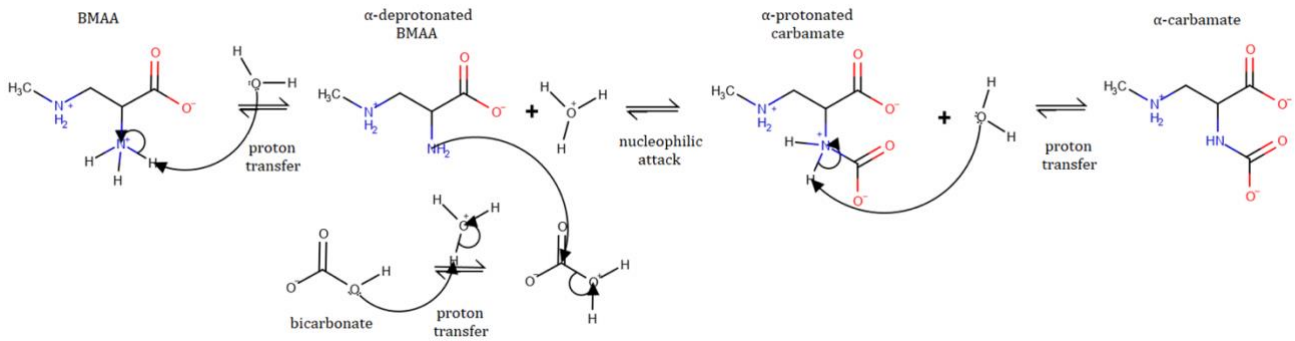


Εικόνα 3. Το ΒΜΑΑ σε ισορροπία με τα α- και β-καρβαμιδικά παράγωγα.

Πρώτο βήμα του μηχανισμού της αντίδρασης καρβαμυλίωσης αποτελεί η απόσπαση της πρωτονίου από την πρωτονιομένη αμινομάδα του ΒΜΑΑ, με αποτέλεσμα την αύξηση της πυρηνόφιλης φύσης (nucleophilicity) της αμινομάδας. Στη συνέχεια, η πυρηνόφιλη αμίνη προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα, είτε του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) ή του διττανθρακικού ιόντος (HCO_3^-), οπότε προκύπτει το εκάστοτε καρβαμιδικό παράγωγο του ΒΜΑΑ. Τελικά, το καρβαμιδικό παράγωγο σταθεροποιείται μέσω μη ομοιοπολικών ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 4) [1]. Ο μηχανισμός της αντίδρασης καρβαμυλίωσης για το α-καρβαμιδικό παράγωγο του ΒΜΑΑ δίνεται με περισσότερη λεπτομέρεια στην Εικόνα 5 [5].



Εικόνα 4. Ο μηχανισμός της αντίδρασης καρβαμυλίωσης [1].

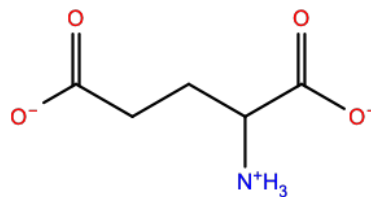


Εικόνα 5. Ο μηχανισμός της αντίδρασης καρβαμύλωσης για το σχηματισμό του α -καρβαμιδικού παραγώγου του BMAA [5].

1.4. Γλουταμινικό ιόν και Γλουταμινικοί υποδοχείς

Γλουταμινικό ιόν

Το γλουταμινικό ιόν (Εικόνα 6) είναι ένας αμινοξικός νευροδιαβιβαστής που ανήκει στην κατηγορία των διεγερτικών αμινοξέων (Excitatory Amino Acids, EAA) διότι προκαλεί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή αύξηση του δυναμικού της μεμβράνης. Αποτελεί το κυριότερο διεγερτικό αμινοξύ στην περιοχή του εγκεφάλου που επάγει την λειτουργία των περισσότερων γλουταμινικών υποδοχέων [6-7].

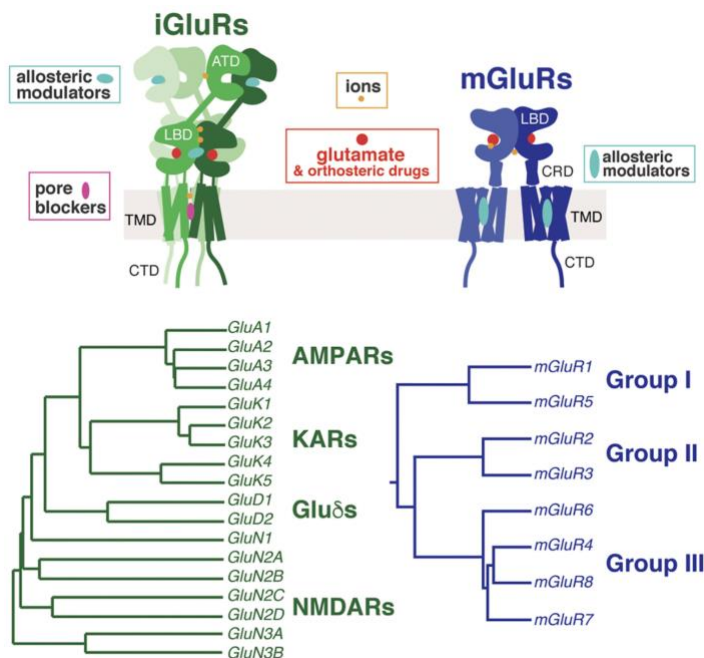


Εικόνα 6. Το γλουταμινικό ιόν.

Γλουταμινικοί υποδοχείς

Οι γλουταμινικοί υποδοχείς είναι μια κατηγορία διαμεμβρανικών πρωτεϊνών υπεύθυνες για την μεταφορά νευρικών ώσεων μεταξύ των νευρικών κυττάρων. Η δράση των περισσότερων γλουταμινικών υποδοχέων επάγεται από το γλουταμινικό ιόν ή μόρια με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά [6-7]. Οι γλουταμινικοί υποδοχείς δρουν ως μεσολαβητές για την μεταφορά διεγερτικών συναπτικών ώσεων (excitatory synaptic transmissions) μέσω του κατάλληλου ελέγχου των επιπέδων συγκέντρωσης ιόντων εκτός και εντός της κυτταρικής μεμβράνης, κυρίως Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} και Cl^- . Δυσλειτουργία του ρυθμιστικού αυτού συστήματος μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του κυττάρου λόγω διεγερτικής νευροτοξικότητας (excitotoxicity). Η θανάτωση του νευρικού κυττάρου λόγω διεγερτικής νευροτοξικότητας περιλαμβάνει την παρατεταμένη εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων (παρατεταμένη αύξηση του δυναμικού της μεμβράνης), μεταβολές στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} και, κατά συνέπεια, την επαγωγή ενζυμικών και πυρηνικών (enzymatic and nuclear) μηχανισμών κυτταρικής απόπτωσης [8].

Οι γλουταμινικοί υποδοχείς μπορεί να είναι είτε ιονοτροπικοί (ionotropic) είτε μεταβοτροπικοί (metabotropic) [7]. Οι **ιονοτροπικοί γλουταμινικοί υποδοχείς** ή iGluRs (ionotropic glutamate receptors) είναι αντλίες ιόντων επαγόμενες από συγκεκριμένα μόρια προσδέτες (ligand-gated ion channels). Μπορούν να χωριστούν επιπλέον σε τέσσερις υποκατηγορίες, τους AMPA (α-άμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλοισοξαζολοπροπιονικό οξύ), τους καϊνικούς (kainite), τους δέλτα και τους NMDA (N-μέθυλο-D-ασπαρτικό οξύ) γλουταμινικούς υποδοχείς [6-7]. Οι **μεταβοτροπικοί γλουταμινικοί υποδοχείς** ή mGluRs (metabotropic glutamate receptors) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συνδέονται στο εσωτερικό του κυττάρου με G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors). Ανάλογα με την ομολογία των αλληλουχιών τους (sequence homologies) κατηγοριοποιούνται σε τρεις υποομάδες, τις 1, 2 και 3 [7]. Οι ιονοτροπικοί και οι μεταβοτροπικοί γλουταμινικοί υποδοχείς, όπως και οι υποκατηγορίες τους, παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 7 [7].



Εικόνα 7. Ιονοτροπικοί (iGluRs) και μεταβοτροπικοί (mGluRs) γλουταμινικοί υποδοχείς. Οι ιονοτροπικοί γλουταμινικοί υποδοχείς και οι υποκατηγορίες τους παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα, ενώ οι μεταβοτροπικοί και οι υποκατηγορίες τους με μπλε χρώμα. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [7].

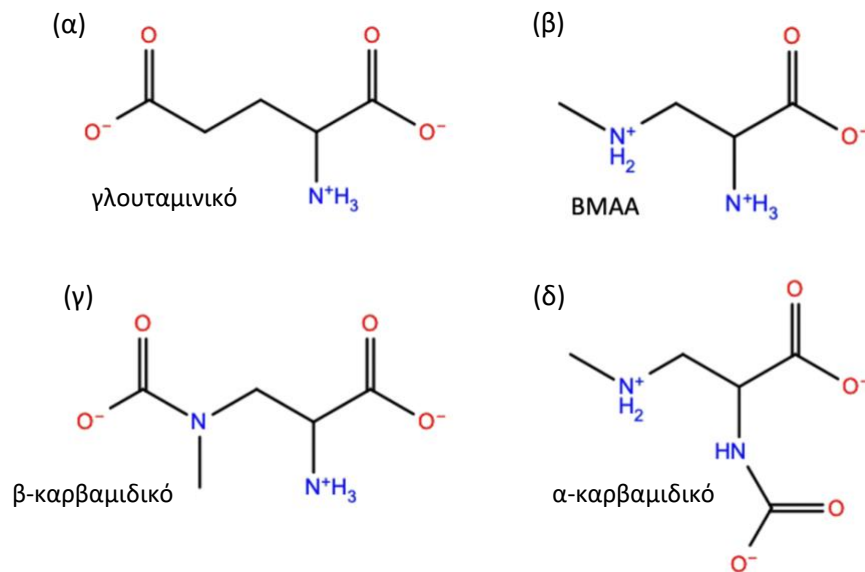
1.5. Βιολογική σημασία της BMAA και των καρβαμιδικών του παραγώγων

Το γλουταμινικό ιόν είναι φυσικός αγωνιστής των γλουταμινικών υποδοχέων. Η σύνδεσή του στην περιοχή πρόσδεσης των γλουταμινικών υποδοχέων έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, η μελέτη των οποίων είναι χρήσιμη για την δομική σύγκριση του γλουταμινικού με το BMAA και τα καρβαμιδικά του παράγωγα [1],[8]. Το πρώτο χαρακτηριστικό της πρόσδεσης στους γλουταμινικούς υποδοχείς είναι ότι ο προσδέτης πρέπει να έχει δύο καρβοξυλομάδες, οι οποίες επιτρέπουν τον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του προσδέτη και των πλευρικών ομάδων

των αμινοξέων της περιοχής πρόσδεσης. Επιπλέον, οι δύο καρβοξυλομάδες πρέπει να απέχουν μεταξύ τους 3.0–4.5 Å. Αυτή η απόσταση αναφέρεται στο πόσο απομακρυσμένες μεταξύ τους είναι οι καρβοξυλομάδες όταν ο προσδέτης περιστρέφεται ώστε να υιοθετήσει την απαιτούμενη διαμόρφωση προκειμένου να συνδεθεί αποτελεσματικά στην περιοχή πρόσδεσης. Το τελευταίο χαρακτηριστικό είναι ότι η ανθρακική αλυσίδα του προσδέτη πρέπει να αποτελείται από τέσσερα με πέντε άτομα άνθρακα. Δηλαδή, πρέπει το μόριο να είναι αρκετά μικρό ώστε να προσδέσεται στην περιοχή πρόσδεσης [1].

Συγκρίνοντας το ΒΜΑΑ και τα καρβαμιδικά του παράγωγα με το γλουταμινικό ιόν ως προς τα χαρακτηριστικά πρόσδεσης στους γλουταμινικούς υποδοχείς, παρατηρούνται τα εξής. Αρχικά, το ΒΜΑΑ αποτελείται από μόνο μία καρβοξυλομάδα. Το γεγονός αυτό πιθανότατα εμποδίζει τη δημιουργία αρκετών δεσμών υδρογόνου ώστε αυτό να σταθεροποιηθεί στην περιοχή πρόσδεσης. Παρόλα αυτά, παρουσία διττανθρακικών ιόντων η πρόσδεση είναι επιτρεπτή, λόγω των δομικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν τα καρβαμιδικά του παράγωγα. Και τα δύο καρβαμιδικά παράγωγα περιέχουν δύο καρβοξυλομάδες. Επιπλέον, καθώς δεν περιέχουν δύσκαμπτες ομάδες, όπως διπλούς δεσμούς ή αρωματικούς δακτυλίους, μπορούν να υιοθετήσουν την κατάλληλη διαμόρφωση κατά τη πρόσδεση, η οποία θα επιτρέπει οι δυο καρβοξυλομάδες να απέχουν μεταξύ τους 3.0–4.5 Å. Τέλος, το α-καρβαμιδικό παράγωγο αποτελείται από πέντε, ενώ το β-καρβαμιδικό παράγωγο από τέσσερα άτομα άνθρακα (Εικόνα 8) [1].

Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις και τα δύο καρβαμιδικά παράγωγα του ΒΜΑΑ πληρούν τις προϋποθέσεις πρόσδεσης με τους γλουταμινικούς υποδοχείς. Εκτός αυτών των χαρακτηριστικών, περιέχουν, επιπλέον, μία μεθυλομάδα και μια αμινομάδα στη θέση που το γλουταμινικό έχει ένα δευτεροταγές άτομο άνθρακα. Η αμινομάδα ίσως επιτρέπει τη δημιουργία επιπλέον δεσμού υδρογόνου στην περιοχή πρόσδεσης. Η επιπλέον μεθυλομάδα μπορεί να συνεισφέρει στην περιοχή υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων της περιοχής πρόσδεσης, σταθεροποιώντας αποτελεσματικότερα την πρόσδεση των καρβαμιδικών παραγώγων στον γλουταμινικό υποδοχέα [1].

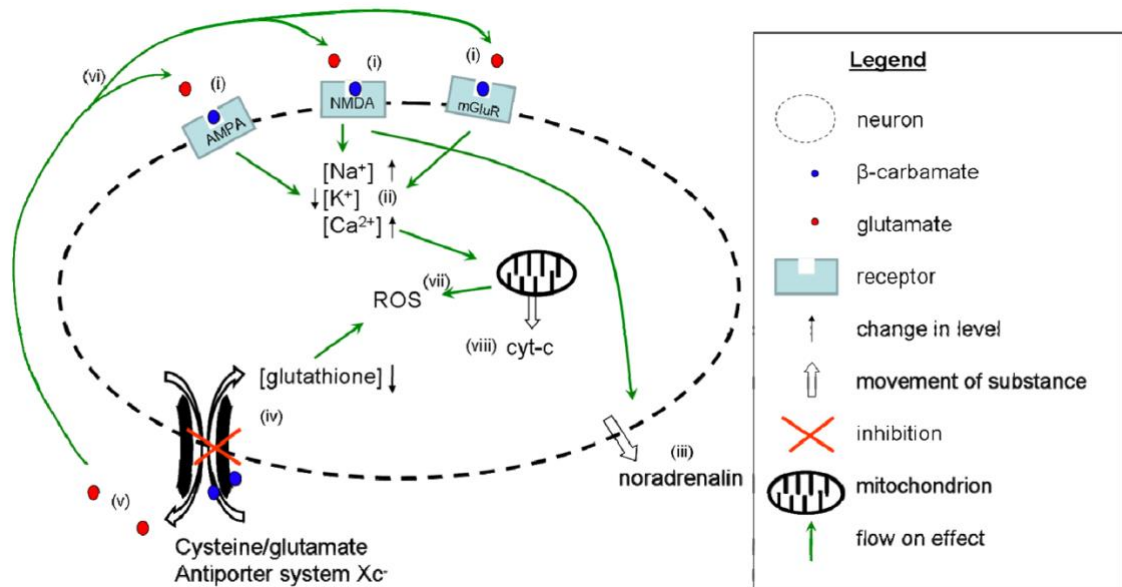


Εικόνα 8. (α) Γλυταμινικό, (β) BMAA, (γ) β-καρβαμιδικό και (δ) α-καρβαμιδικό παράγωγο του BMAA.

Βάσει των παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα καρβαμιδικά παράγωγα ίσως συνδέονται ισχυρότερα στους γλυταμινικούς υποδοχείς σε σχέση με το γλυταμινικό ιόν, ενεργοποιώντας έτσι μια σειρά από κυτταρικές διεργασίες που οδηγούν στις προαναφερθείσες νευροεκφυλιστικές νόσους [1], [8].

Παρότι ο μηχανισμός δράσης του BMAA δεν είναι γνωστός, η ευρύτερα διαδεδομένη υπόθεση δράσης του είναι η εξής, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 9 [8]. Όταν το BMAA αλληλεπιδρά με το διττανθρακικό ιόν στον ανθρώπινο οργανισμό παράγονται καρβαμιδικά παράγωγα που έχουν παρόμοια δομή με το νευροδιαβιβαστή γλυταμινικό ιόν. Τα καρβαμιδικά παράγωγα μπορούν να προσδεθούν και να ενεργοποιήσουν πολλούς γλυταμινικούς υποδοχείς (Εικόνα 9i), οδηγώντας έτσι σε μεταβολές της φυσιολογικής κυτταρικής ιοντικής συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα συγκέντρωσης του Na^+ και Ca^{2+} αυξάνονται, ενώ τα επίπεδα συγκέντρωσης K^+ μειώνονται (Εικόνα 9ii) [8]. Η ισχυρή πρόσδεση των καρβαμιδικών παραγώγων στους υποδοχείς οδηγεί, επίσης, στην εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης (αύξηση του δυναμικού της μεμβράνης, depolarization) και, άρα, στην αύξηση της διαπερατότητάς (permeability) της μεμβράνης. Η αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης έχει ως συνέπεια την απελευθέρωση νοραδρεναλίνης (noradrenalin) στον εξωκυττάριο χώρο (Εικόνα 9iii). Τα καρβαμιδικά παράγωγα θεωρείται ότι δρουν, επιπλέον, και ως αναστολείς του συστήματος αντιμεταφοράς κυστεΐνης/γλυταμινικού (Xc^-), εμποδίζοντας την πρόσληψη κυστεΐνης από το κύτταρο (Εικόνα 9iv). Κατά αυτό τον τρόπο τα κυτταρικά επίπεδα γλυταθειόνης ελαττώνονται (glutathione depletion) και, άρα, υπάρχει αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου ROS, δηλαδή αύξηση του οξειδωτικού στρες (oxidative stress) του κυττάρου. Ταυτόχρονα, μέσω του συστήματος Xc^- πραγματοποιείται αύξηση της απελευθέρωσης γλυταμινικού ιόντος από το κύτταρο (Εικόνα 9v). Η περίσσεια γλυταμινικού μπορεί να προσδεθεί, επίσης, στην περιοχική πρόσδεση των γλυταμινικών υποδοχέων συμβάλλοντας και εκείνο στην καταστροφή του κυττάρου λόγω διεγερτικής νευροτοξικότητας (excitotoxicity) (Εικόνα 9vi). Η αύξηση στην

ενδοκυττάρια συγκέντρωση του Ca^{2+} οδηγεί στην απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας του μιτοχονδρίου, οδηγώντας σε απελευθέρωση ROS στο κυτόπλασμα (επιπλέον αύξηση της συγκέντρωσης ROS) (Εικόνα 9vii). Εκτός αυτού, γίνεται απελευθέρωση κυτοχρώματος-c (cytochrome-c) από τα μιτοχόνδρια, το οποίο ευθύνεται για την επαγωγή μηχανισμών κυτταρικής απόπτωσης (Εικόνα 9viii) [8].



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της υπόθεσης μηχανισμού δράσης του BMAA στα νευρικά κύτταρα. Η εικόνα λήφθηκε από τη βιβλιογραφική πηγή [8].

1.6. Αποτελέσματα Προηγούμενων Υπολογιστικών Ερευνών

Ο μηχανισμός δράσης του BMAA και των καρβαμιδικών παραγώγων του προσδεμένων σε γλουταμινικούς υποδοχείς δεν έχει μελετηθεί έως τώρα. Οι υπολογιστικές, αλλά και οι πειραματικές, έρευνες που αφορούν αυτό το θέμα είναι, επομένως, περιορισμένες. Η περισσότερη έρευνα, δε, αφορά την πρόσδεση του γλουταμινικού ιόντος στους γλουταμινικούς υποδοχείς. Κάποιες από τις κυριότερες πιο πρόσφατες μελέτες που αφορούν το σύστημα υπό μελέτη παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Η συγγένεια πρόσδεσης του BMAA και των καρβαμιδικών παραγώγων του σε γλουταμινικούς υποδοχείς σε σύγκριση με τον φυσικό αγωνιστή (γλουταμινικό ιόν) έχει διερευνηθεί πρόσφατα από το εργαστήριο της Δρ. Ζωής Κούρνια [5]. Στις μελέτες αυτές, εφαρμόστηκαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής του BMAA και των καρβαμιδικών παραγώγων του στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA, έτσι ώστε να μελετηθεί η σταθερότητα των μορίων στην περιοχή πρόσδεσης S1/S2 του υποδοχέα AMPA (PDB ID: 1FTJ) [9]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το β-καρβαμιδικό παράγωγο του BMAA παρουσιάζει ιδιαίτερη σταθερότητα στον υποδοχέα AMPA σε σύγκριση με τον φυσιολογικό αγωνιστή, το γλουταμινικό ιόν [5]. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε συνδυασμό με υπολογισμούς Διατάραξης

Ελεύθερης Ενέργειας προκειμένου να υπολογιστεί η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης του ΒΜΑΑ σε σύγκριση με το γλουταμινικό ιόν στον υποδοχέα AMPA. Τα αποτελέσματα της μελέτης (-1.6 ± 0.2 kcal/mol) έδειξαν ότι το γλουταμινικό ιόν και το β-καρβαμιδικό ιόν έχουν συγκρίσιμη συγγένεια πρόσδεσης στον υποδοχέα AMPA [5].

Η πρόσδεση κάποιου μορίου-προσδέτη, όπως είναι το γλουταμινικό ιόν, στην περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα AMPA ενεργοποιεί τον υποδοχέα προκαλώντας μια διαμορφωτική αλλαγή, η οποία έχει ως συνέπεια την διάνοιξη του ιοντικού καναλιού. Η ενεργειακή μελέτη της πρόσδεσης του γλουταμινικού ιόντος στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA έχει διερευνηθεί από τον Heinzelmann και τους συνεργάτες του [10]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε συνδυασμό με υπολογισμούς Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας προκειμένου να υπολογιστεί η απόλυτη ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης του γλουταμινικού ιόντος στην περιοχή πρόσδεσης S1/S2 του υποδοχέα AMPA (PDB ID: 1FTJ) [10]. Η υπολογισμένη ενέργεια πρόσδεσης (-8.5 ± 1.8 kcal/mol) [10] είναι σε συμφωνία με την πειραματικά υπολογισμένη (-8.3 kcal/mol) [9]. Η πειραματικά υπολογισμένη ενέργεια πρόσδεσης έχει μετρηθεί με πειράματα ανταγωνιστικής δέσμευσης γλουταμινικού υποδοχέα AMPA με ραδιοεπισημασμένο γλουταμινικό ιόν [9]. Έρευνα στο ίδιο θέμα πραγματοποιήθηκε, επίσης, από τον Yonkunas και τους συνεργάτες του. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί Umbrella Sampling και προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής. Εκτιμήθηκε ότι η πρόσδεση του γλουταμινικού επάγει την διαμορφωτική αλλαγή της περιοχής πρόσδεσης S1/S2 με απελευθέρωση ενέργειας περίπου ίσης με 4 kcal/mol [11].

Τέλος, οι Yu και Lau χρησιμοποίησαν τον αλγόριθμο SMwST (String method with swarms of trajectories) για την εκτίμηση του πιο πιθανού μονοπατιού που ακολουθείται από το γλουταμινικό ιόν κατά την πορεία πρόσδεσής τους στην περιοχή πρόσδεσης S1/S2 του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA και ενεργειακή εκτίμηση αυτού του μονοπατιού [12]. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε η δομή της ελεύθερης μορφής της περιοχής πρόσδεσης S1/S2 (PDB: 1FTO) [10] και η δομή της περιοχής πρόσδεσης S1/S2 του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA σε σύζευξη με το γλουταμινικό ιόν. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το πιο πιθανό μονοπάτι για την μετάβαση του γλουταμινικού ιόντος από την ελεύθερη κατάσταση στην κατάσταση πρόσδεσης έχει ελεύθερη ενέργεια ίση με -8.8 kcal/mol [12], η οποία βρίσκεται σε συμφωνία με την πειραματικά υπολογισμένη (-8.3 kcal/mol) [10].

1.7. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Όπως εξηγήθηκε παραπάνω όταν το ΒΜΑΑ αλληλεπιδρά με το διττανθρακικό ιόν στον ανθρώπινο οργανισμό παράγονται καρβαμιδικά παράγωγα που έχουν παρόμοια δομή με το νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό ιόν. Πιστεύεται ότι το ΒΜΑΑ και τα καρβαμιδικά παράγωγά προσδέονται στο σημείο πρόσδεσης γλουταμινικών υποδοχέων προκαλώντας νευρικά συμπτώματα ασθενειών όπως το Πάρκινσον, η Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση και το Αλτσχάιμερ. Ο μηχανισμός δράσης του

BMAA και των καρβαμιδικών παραγώγων του προσδεμένων σε γλουταμινικούς υποδοχείς δεν έχει μελετηθεί έως τώρα.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της συγγένειας πρόσδεσης του BMAA και των καρβαμιδικών παραγώγων του στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA σε σύγκριση με το φυσικό αγωνιστή, γλουταμινικό ιόν. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα συμβάλλουν στην κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο το BMAA οδηγεί σε δυσλειτουργία των νευρικών κυττάρων, οδηγώντας σε νευροεκφυλιστικές νόσους. Για το σκοπό αυτό θα χρησιμοποιηθούν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε συνδυασμό με υπολογισμούς Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας προκειμένου να υπολογιστεί η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης του β-καρβαμιδικού παραγώγου του BMAA και του φυσικού αγωνιστή, γλουταμινικό ιόν, στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA.

2. Θεωρητικό υπόβαθρο μεθόδων

2.1. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (ΜΔ)

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics, MD, ΜΔ) ανήκουν στις τεχνικές μοριακής προσομοίωσης και σκοπό έχουν την διερεύνηση δομικών, δυναμικών και θερμοδυναμικών ιδιοτήτων σύνθετων μοριακών συστημάτων. Τα μοριακά συστήματα αναπαρίστανται ως ένα σύνολο σωματιδίων (particles) που αναπαριστούν άτομα ή ομάδες ατόμων. Η μελέτη τους βασίζεται στις αρχές της κλασικής μηχανικής και συγκεκριμένα η εξίσωση κίνησης του Νεύτωνα ολοκληρώνεται αριθμητικά παράγοντας διαμορφώσεις (configurations) του συστήματος [13]. Οι διαμορφώσεις αυτές αποτελούν την τροχιά (trajectory) του συστήματος, η οποία περιγράφει τις συντεταγμένες, τις ταχύτητες και τις επιταχύνσεις των ατόμων του συστήματος ως συνάρτηση του χρόνου της προσομοίωσης. Τελικά, μέσω των αρχών της στατιστικής μηχανικής οι πληροφορίες που συλλέγονται στην μικροσκοπική κλίμακα οδηγούν σε πληροφορίες που αφορούν μακροσκοπικές ιδιότητες του συστήματος.

2.1.1. Η Συνάρτηση της Δυναμικής Ενέργειας (Πεδίο Δυνάμεων)

Στις προσομοιώσεις ΜΔ το μοριακό σύστημα προς μελέτη αναπαρίσταται από ένα σύνολο σωματιδίων (particles) που αναπαριστούν άτομα ή ομάδες ατόμων. Η συνολική ενέργεια του συστήματος δίνεται από το άθροισμα της κινητικής και της δυναμικής ενέργειας του συστήματος σύμφωνα με την εξίσωση (2.1):

$$H = K + V = \frac{1}{2}mv^2 + V(\mathbf{r}) \quad (2.1)$$

Όπου, K είναι η κινητική ενέργεια του συστήματος και V η δυναμική ενέργεια του συστήματος.

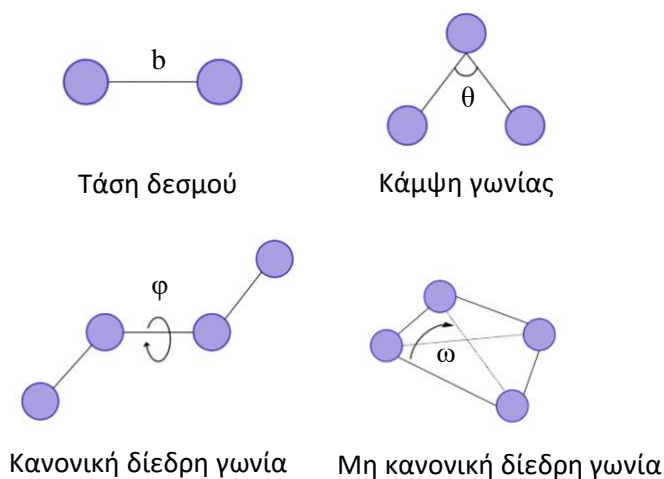
Για τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας του συστήματος χρησιμοποιούνται εμπειρικές εξισώσεις που επιτρέπουν τον υπολογισμό της ενέργειας του συστήματος συναρτήσει των συντεταγμένων των σωματιδίων που το αποτελούν. Οι εξισώσεις αυτές περιλαμβάνουν εμπειρικές παραμέτρους και αριθμητικές προσεγγίσεις, οι οποίες λαμβάνονται από πειραματικά αποτελέσματα και από κβαντομηχανικούς υπολογισμούς απλών μοντέλων ενώσεων. Λόγω της εμπειρικής φύσης των εξισώσεων πολλές φορές δεν είναι ακριβείς υπολογιστικά. Παρόλα αυτά, οδηγούν σε μία ρεαλιστική αναπαράσταση του συστήματος με μικρές υπολογιστικές απαιτήσεις. Ένας σημαντικός περιορισμός αυτών των εμπειρικών εξισώσεων είναι ότι αλλαγές στην τοπολογία και την χημεία του συστήματος δεν μπορούν να μοντελοποιηθούν. Δηλαδή, δεν μπορούν να μοντελοποιηθούν γεγονότα όπως η δημιουργία ή το σπάσιμο δεσμών [13].

Η δυναμική ενέργεια του συστήματος περιλαμβάνει όρους για την περιγραφή των δεσμικών (bonded) και των μη δεσμικών (non-bonded) αλληλεπιδράσεων:

$$V(\mathbf{r}) = V_{bonded} + V_{non-bonded} \quad (2.2)$$

Ο όρος των δεσμικών αλληλεπιδράσεων αναφέρεται στην περιγραφή των ενδομοριακών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ ατόμων που βρίσκονται συνδεδεμένα μέσω δεσμού (Εικόνα 10). Συμπεριλαμβάνει όρους για την περιγραφή της τάσης των δεσμών (bond stretching), της κάμψης γωνιών (angle bending) και τις διεδρες γωνίες (torsional angles). Η περιγραφή των διεδρων γωνιών περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση τεσσάρων ατόμων και χωρίζεται στους όρους των “κανονικών” διεδρων γωνιών (“proper” torsion dihedrals) και των “μη κανονικών” διεδρων γωνιών (“improper” torsion dihedrals) [13]. Συνολικά, ο όρος των δεσμικών αλληλεπιδράσεων περιγράφεται από την εξίσωση (2.3), οι όροι της οποίας αναλύονται στη συνέχεια.

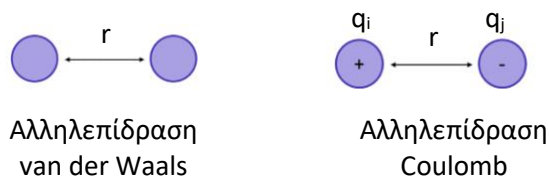
$$V_{bonded} = V_{bonds} + V_{angles} + V_{dihedrals} + V_{impropers} \quad (2.3)$$



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση των όρων των δεσμικών αλληλεπιδράσεων.

Ο όρος των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων αφορά την περιγραφή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (electrostatic) και των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων van der Waals (Εικόνα 11). Για την μοντελοποίηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιείται ο νόμος του Coulomb, ενώ οι αλληλεπιδράσεις van der Waals περιγράφονται μέσω της δυναμικής Lenard-Jones [13]. Συνολικά, ο όρος των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων περιγράφεται από την εξίσωση (2.4), οι όροι της οποίας αναλύονται παρακάτω.

$$V_{non-bonded} = V_{vdW} + V_{electrostatic} \quad (2.4)$$



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση των όρων των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων.

Τάση Δεσμών (Bond Stretching)

Ο όρος της τάσης δεσμών αφορά στην περιγραφή της δόνησης ανάμεσα σε δύο άτομα που είναι συνδεδεμένα με ομοιοπολικό δεσμό. Περιγράφεται από ένα αρμονικό δυναμικό σύμφωνα με τον νόμο του Hooke:

$$V_{bonds} = \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 \quad (2.5)$$

Όπου, k_b είναι η σταθερά του ελατηρίου, b_0 είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων στην ισορροπία (μήκος ισορροπίας του δεσμού) και b είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων.

Κάμψη Γωνιών (Angle Bending)

Ο όρος της κάμψης γωνιών αφορά στην περιγραφή της δόνησης τριών ατόμων συνδεδεμένα μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς και περιγράφεται επίσης σύμφωνα με τον νόμο του Hooke:

$$V_{angles} = \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.6)$$

Όπου, k_θ είναι η σταθερά κάμψης της γωνίας, θ_0 είναι η γωνία μεταξύ των τριών ατόμων στην ισορροπία και θ είναι η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ των τριών ατόμων.

Κανονικές Δίεδρες Γωνίες (Proper Torsion Dihedrals)

Αυτός ο όρος χρησιμοποιείται για την μοντελοποίηση του φράγματος περιστροφής που αναπτύσσεται μεταξύ δύο ατόμων που χωρίζονται με τρεις ομοιοπολικούς δεσμούς. Συγκεκριμένα, το φράγμα περιστροφής αφορά τον μεσαίο δεσμό της δίεδρης γωνίας που σχηματίζεται μεταξύ των τεσσάρων ατόμων. Το δυναμικό σε αυτή την περίπτωση θεωρείται περιοδικό και περιγράφεται μέσω της συνήμιτονοειδούς συνάρτησης:

$$V_{dihedrals} = \sum_{dihedrals} k_\varphi (1 + \cos[n\varphi - \delta]) \quad (2.7)$$

Όπου, k_φ είναι η σταθερά της περιστροφής, το n αναπαριστά την περιοδικότητα του φαινομένου περιστροφικής παρεμπόδισης, φ είναι η γωνία μεταξύ του επιπέδου που

σχηματίζεται από τα τρία πρώτα από τα τέσσερα άτομα και του επιπέδου που σχηματίζεται από τα τρία τελευταία από τα τέσσερα άτομα και δ είναι η γωνία ελάχιστης ενέργειας.

Μη κανονικές Διέδρες Γωνίες (Improper Torsion Dihedrals)

Ο όρος των μη κανονικών διεδρων γωνιών χρησιμοποιείται για την διατήρηση της τετραεδρικής γεωμετρίας γύρω από ένα χειρόμορφο άτομο, καθώς επίσης και την διατήρηση της επίπεδης διαμόρφωσης γύρω από συγκεκριμένα άτομα [13]. Για την περιγραφή αυτού του όρου χρησιμοποιείται ένα αρμονικό δυναμικό σύμφωνα με τον νόμο του Hooke:

$$V_{impropers} = \sum_{impropers} k_{\omega} (\omega - \omega_0)^2 \quad (2.8)$$

Στην συγκεκριμένη περίπτωση ω είναι η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ του επιπέδου που σχηματίζουν τα περιφερικά άτομα και του επιπέδου που ορίζεται από το κεντρικό άτομο και δύο περιφερικά άτομα. Επιπλέον, k_{ω} είναι η σταθερά κάμψης της γωνίας και ω_0 είναι η γωνία στην ισορροπία.

Ηλεκτροστατικές Αλληλεπιδράσεις

Για την μοντελοποίηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιείται ο νόμος του Coulomb:

$$V_{electrostatic} = \sum_{i,j} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (2.9)$$

Όπου, r_{ij} είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων i και j που έχουν φορτία q_i και q_j , αντίστοιχα, και ϵ_0 είναι η διηλεκτρική σταθερά του κενού.

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρές ακόμα και σε μεγάλη απόσταση μεταξύ των ατόμων (φθίνουν αργά) και έτσι θεωρούνται αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας (long range interactions) [13].

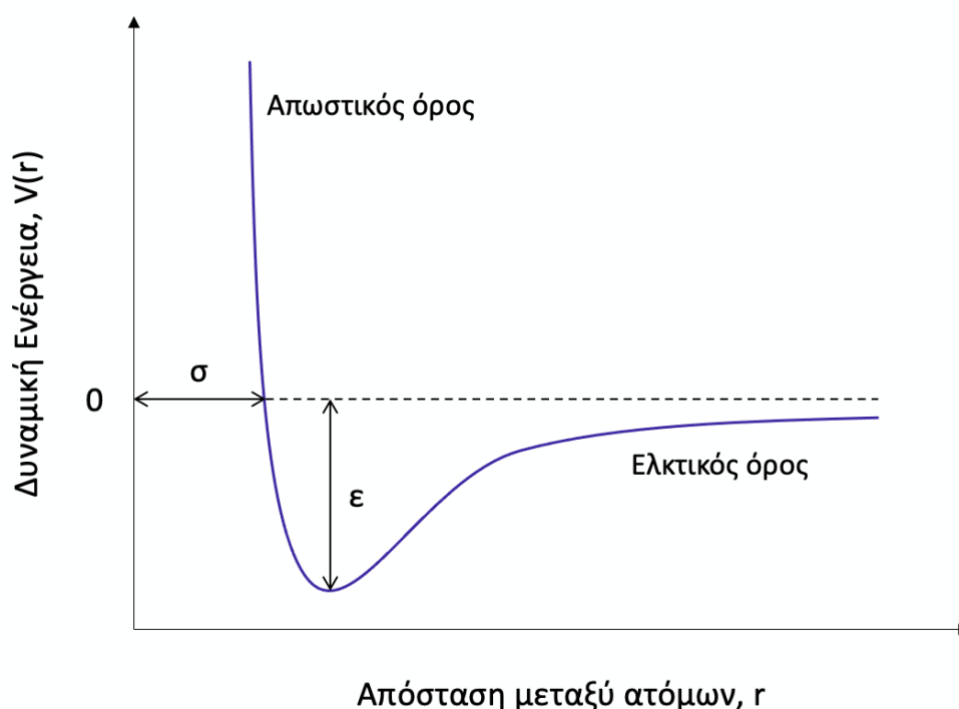
Αλληλεπιδράσεις van der Waals

Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals δρουν σε άτομα που είναι γειτονικά μεταξύ τους. Σε μικρή απόσταση μεταξύ των ατόμων είναι απωστικές, εμφανίζουν ένα βάθος δυναμικού σε κάποια βέλτιστη απόσταση και έπειτα είναι ελκτικές σε μεγαλύτερες αποστάσεις. Περιγράφονται μέσω της δυναμικής Lenard-Jones:

$$V_{vdW} = \sum_{i,j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.10)$$

Όπου, r_{ij} είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων i και j , το μέγεθος σ_{ij} ονομάζεται ακτίνα van der Waals και είναι η απόσταση μεταξύ των μορίων στην οποία η δυναμική ενέργεια είναι ίση με μηδέν. Το μέγεθος ϵ_{ij} υποδηλώνει την ισχύ της αλληλεπίδρασης

(το βάθος του δυναμικού). Σχηματικά το δυναμικό Lenard-Jones παρουσιάζεται στο Εικόνα 12. Οι αλληλεπιδράσεις vdW θεωρούνται μικρής εμβέλειας (short range) [13].



Εικόνα 12. Το δυναμικό Lenard-Jones. Το μέγεθος σ είναι η ακτίνα van der Waals και ϵ είναι το βάθος του δυναμικού.

Συνολικά, η εξίσωση δυναμικής ενέργειας περιγράφεται από την εξίσωση (2.11):

$$V(\mathbf{r}) = \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} k_\phi (1 + \cos[n\phi - \delta]) + \sum_{impropers} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{i,j} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \sum_{i,j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.11)$$

Ο όρος πεδίο δυνάμεων (force field) αναφέρεται στις μαθηματικές εκφράσεις που συμπεριλαμβάνονται στην συνάρτηση της δυναμικής ενέργειας, είναι δηλαδή ένας μαθηματικός τρόπος έκφρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων, και επίσης αποτελεί μια βάση δεδομένων για την ανάθεση τιμών στις παραμέτρους αυτών των όρων. Η επιλογή του κατάλληλου πεδίου δυνάμεων έγκειται στις ανάγκες του συγκεκριμένου συστήματος προς μελέτη [13].

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν το πεδίο δυνάμεων OPLS-AA και τα ff14SB/GAFF2. Το GAFF2 (General AMBER Force Field 2), χρησιμοποιείται για την παραμετροποίηση μικρών μορίων και είναι συμβατό με τα πεδία δυνάμεων πρωτεϊνών του AMBER, όπως είναι το ff14SB. Η περιγραφή του πεδίου δυνάμεων OPLS-AA γίνεται από την εξίσωση (2.12) που παρουσιάζεται στην συνέχεια.

$$V(\mathbf{r}) = \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsion} V_1^i (1 + \cos[\varphi_i + f_i 1]) + \frac{V_2^i}{2} (1 + \cos[2\varphi_i + f_i 2]) + \frac{V_3^i}{2} (1 + \cos[3\varphi_i + f_i 3]) + \sum_i \sum_j \left[\frac{q_i q_j}{r_{ij}} e^2 + 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right] f_{ij} \quad (2.12)$$

Στην εξίσωση αυτή οι πρώτοι τρεις όροι αφορούν τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις (τάση δεσμών, κάμψη γωνιών και διέδρες γωνίες). Οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις γίνονται με χρήση του νόμου του Coulomb (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις) και του δυναμικού Lenard-Jones (αλληλεπιδράσεις van der Waals) [23].

Η περιγραφή των πεδίων δυνάμεων ff14SB/GAFF2 γίνεται από την εξίσωση (2.13) που παρουσιάζεται στην συνέχεια.

$$V(\mathbf{r}) = \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} \frac{U_n}{2} (1 + \cos[n\varphi_i - \gamma]) + \sum_{i < j} \left[\frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} + \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] \quad (2.13)$$

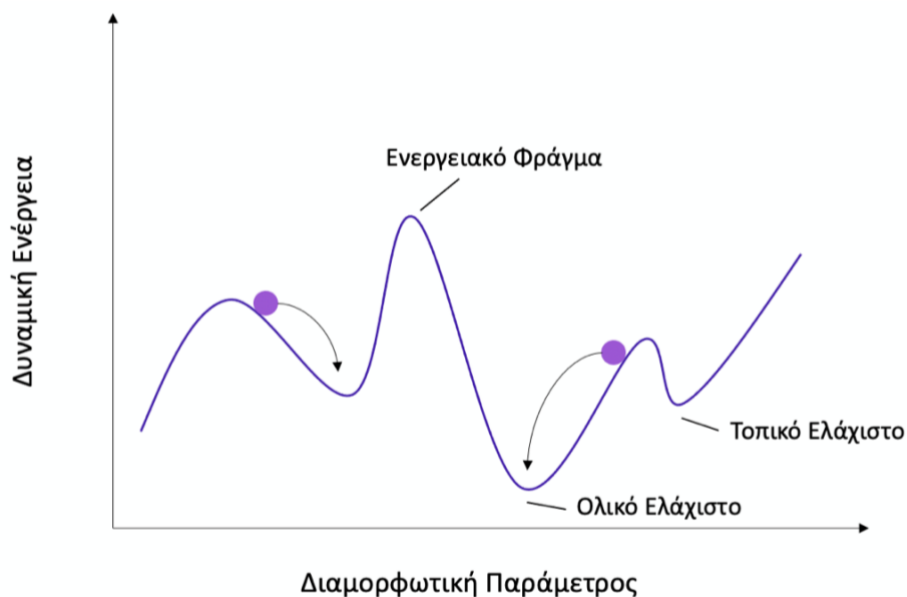
Αντίστοιχα, οι πρώτοι τρεις όροι αφορούν τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις (τάση δεσμών, κάμψη γωνιών και διέδρες γωνίες), ενώ οι δύο τελευταίοι περιγράφουν τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις [34].

2.1.2. Ελαχιστοποίηση της Ενέργειας του Συστήματος

Η αρχική δομή του συστήματος που προκύπτει μετά την εφαρμογή του κατάλληλου πεδίου δυνάμεων πολλές φορές περιέχει ατέλειες, οι οποίες πρέπει να διορθωθούν καθώς στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσουν στην αστάθεια της προσομοίωσης ΜΔ. Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος εξασφαλίζει την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων van der Waals, διαστρεβλωμένων γωνιών ή μηκών δεσμών και στερεοχημικών ατελειών (steric clashes) που μπορεί να υπάρχουν. Στόχος της ελαχιστοποίησης της ενέργειας είναι να εντοπιστεί ένα τοπικό ελάχιστο της εξίσωσης δυναμικής ενέργειας του συστήματος. Η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας εμφανίζει πολλά τοπικά ελάχιστα και ένα ολικό ελάχιστο [13]. Επομένως, η ενέργεια του συστήματος στο σημείο τοπικού ελαχίστου μπορεί να είναι πολύ υψηλότερη από ότι στο ολικό ελάχιστο.

Το τοπικό ελάχιστο της συνάρτησης δυναμικής ενέργειας του συστήματος εντοπίζεται μέσω αλγορίθμων ελαχιστοποίησης. Έστω μία δεδομένη συνάρτηση f , η οποία εξαρτάται από τις μεταβλητές x_1, x_2, \dots, x_n . Ως τοπικό ελάχιστο της f ορίζεται το σημείο στο οποίο η πρώτη παράγωγος της f ως προς κάθε μεταβλητή x_i ισούται με μηδέν και, επιπλέον, όλες οι δεύτερες παράγωγοι της f είναι θετικές:

$$\frac{\partial f}{\partial x_i} = 0 \quad (2.14) \quad \text{και} \quad \frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} > 0 \quad (2.15)$$



Εικόνα 13. Παράδειγμα ενέργειας του συστήματος ως συνάρτηση κάποιας διαμορφωτικής παραμέτρου.

Η αριθμητική διαδικασία εύρεσης του τοπικού ελαχίστου περιλαμβάνει την σταδιακή αλλαγή των συντεταγμένων του συστήματος. Σε κάθε νέα διαμόρφωση υπολογίζεται η δυναμική ενέργεια του συστήματος έως ότου βρεθεί η διαμόρφωση με την ελάχιστη ενέργεια.

2.1.3. Υπολογισμός της Τροχιάς του Συστήματος

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένα οι προσομοιώσεις ΜΔ βασίζονται στον δεύτερο νόμο κίνησης του Νεύτωνα. Για ένα μοριακό σύστημα N ατόμων, η συνολική δύναμη που δέχεται κάθε σωματίδιο i κάθε χρονική στιγμή υπολογίζεται ως εξής:

$$\mathbf{F}_i = m_i \mathbf{a}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}, i = 1, 2, \dots, N \quad (2.16)$$

Όπου, m_i είναι η μάζα του ατόμου i , \mathbf{a}_i είναι το διάνυσμα επιτάχυνσης και \mathbf{r}_i το διάνυσμα θέσης του ατόμου i . Η συνολική δύναμη που ασκείται σε κάθε σωματίδιο i κάθε χρονική στιγμή μπορεί επίσης να εκφραστεί ως οι αρνητικές παράγωγοι της δυναμικής ενέργειας του συστήματος:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i}, i = 1, 2, \dots, N \quad (2.17)$$

Συνδυάζοντας τις δύο παραπάνω εξισώσεις:

$$\frac{dV}{dt} = -m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}, i = 1, 2, \dots, N \quad (2.18)$$

Η παραπάνω εξίσωση επιλύεται αριθμητικά παράγοντας την τροχιά (trajectory) του μοριακού συστήματος, η οποία περιγράφει τη χρονική εξέλιξη της θέσης, της ταχύτητας και της επιτάχυνσης των σωματιδίων του μοριακού συστήματος.

Αρχικά, για την αριθμητική ολοκλήρωση της παραπάνω εξίσωσης μέσω των συνήθων αλγορίθμων απαιτούνται αρχικές συνθήκες για την θέση και την ταχύτητα των σωματιδίων του συστήματος. Η αρχική διαμόρφωση του συστήματος είναι συνήθως μια δομή που έχει προκύψει από πειράματα περίθλασης ακτινών Χ, πυρηνικού μοριακού συντονισμού (NMR) ή ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τέτοιες δομές μπορούν να βρεθούν από την βάση δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank, PDB) [14]. Οι αρχικές ταχύτητες λαμβάνονται από κάποια κατανομή, συνήθως την κατανομή Maxwell-Boltzmann, σε συγκεκριμένη θερμοκρασία [13]. Επιπλέον, επιλέγεται ένα μικρό βήμα ολοκλήρωσης. Το βήμα ολοκλήρωσης περιορίζεται από την μεγαλύτερη συχνότητα δόνησης μεταξύ δυο ατόμων του συστήματος, δηλαδή την δόνηση του δεσμού C-H στην περίπτωση πρωτεϊνικών συστημάτων. Η δόνηση αυτή έχει περίοδο $\delta t = 1$ fs, επομένως, το βήμα ολοκλήρωσης που θα επιλεγεί δεν μπορεί να είναι μικρότερο από 1 fs. Συνήθως, επιλέγεται βήμα $\delta t = 2$ fs [13].

Οι πληροφορίες που προκύπτουν από την τροχιά στο μικροσκοπικό επίπεδο μπορούν να συνδεθούν με μακροσκοπικές ιδιότητες του μοριακού συστήματος, όπως είναι η πίεση και η ενέργεια, μέσω της στατιστικής μηχανικής. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης στατιστικών συνόλων (ensemble), τα οποία περιγράφουν μια συλλογή από πιθανές διαμορφώσεις ενός συστήματος, οι οποίες μπορεί να έχουν διαφορετικές μικροσκοπικές καταστάσεις αλλά παρόμοιες μακροσκοπικές καταστάσεις.

2.1.4. Βασικά βήματα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

Τα βασικά βήματα που ακολουθούνται για την πραγματοποίηση προσομοιώσεων MD αναλύονται στη συνέχεια.

Προετοιμασία του Συστήματος

Αυτό το βήμα εστιάζει την προετοιμασία του επιθυμητού μοριακού συστήματος προς μελέτη. Αρχικά, είναι απαραίτητη η επιλογή μιας αρχικής δομής του πρωτεϊνικού συστήματος. Αυτή η δομή συνήθως λαμβάνεται από την βάση δεδομένων πρωτεϊνών (Protein Data Bank, PDB) [14]. Οι δομές που βρίσκονται στη βάση δεδομένων πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα πειραματικών τεχνικών όπως είναι η περίθλαση ακτινών Χ, η ηλεκτρονική μικροσκοπία και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR).

Αφού χτιστεί η αρχική δομή του πρωτεϊνικού συστήματος προς μελέτη, πραγματοποιείται διαλυτοποίηση, ουδετεροποίηση και εφαρμογή του πεδίου δυνάμεων. Το βήμα της προετοιμασίας εξαρτάται από το σύστημα που μελετάται, οπότε απαιτεί ιδιαίτερο χειρισμό ανάλογα την περίπτωση [13].

Ελαχιστοποίηση της Ενέργειας του Συστήματος

Η αρχική δομή του συστήματος που προκύπτει έπειτα από το στάδιο της προετοιμασίας του συστήματος πολλές φορές περιέχει ατέλειες, οι οποίες πρέπει να διορθωθούν καθώς στη συνέχεια μπορεί να οδηγήσουν στην αστάθεια της προσομοίωσης ΜΔ. Η διόρθωση των ατελειών της αρχικής δομής γίνεται μέσω του σταδίου της ελαχιστοποίησης της ενέργειας του συστήματος, όπου εξασφαλίζεται η απομάκρυνση των ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων van der Waals, διαστρεβλωμένων γωνιών ή μηκών δεσμών και στερεοχημικών ατελειών (steric clashes) που μπορεί να υπάρχουν. Όπως, ήδη εξηγήθηκε, στόχος της ελαχιστοποίησης της ενέργειας είναι να εντοπιστεί ένα τοπικό ελάχιστο της εξίσωσης δυναμικής ενέργειας του συστήματος [13].

Εξισορρόπηση του Συστήματος

Η εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιείται συνήθως σε δύο στάδια και σκοπός είναι το σύστημα να οδηγηθεί στις συνθήκες του ανθρώπινου σώματος, δηλαδή, σε θερμοκρασία 310 K και πίεση 1 bar.

Το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται σε κανονικό (NVT) στατιστικό σύνολο, στο οποίο ο αριθμός των σωματιδίων (N), ο όγκος (V) και η θερμοκρασία του συστήματος (T) είναι σταθερά. Αυτό το στατιστικό σύνολο ονομάζεται αλλιώς και ισόθερμο-ισόχωρο. Η θερμοκρασία του συστήματος υπολογίζεται βάση της κινητικής ενέργειας και, άρα, της ταχύτητας των σωματιδίων του συστήματος [13]:

$$K = \frac{3N}{2} k_B T \Rightarrow \sum_{j=1}^N \frac{1}{2} m_j v_j^2 = \frac{3N}{2} k_B T \quad (2.19)$$

Η θερμοκρασία του συστήματος πρέπει να έχει φτάσει ένα πλατό στην επιθυμητή θερμοκρασία στο χρόνο της εξισορρόπησης αυτής. Εάν η θερμοκρασία δεν έχει σταθεροποιηθεί σε αυτόν τον χρόνο, η NVT εξισορρόπηση συνεχίζεται για επιπλέον χρονικό διάστημα.

Το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται σε ισόθερμο-ισοβαρές (NPT) στατιστικό σύνολο, στο οποίο ο αριθμός των σωματιδίων (N), η πίεση (P) και η θερμοκρασία του συστήματος (T) είναι σταθερά. Παρόμοια, η πίεση και άρα η πυκνότητα του συστήματος πρέπει να σταθεροποιηθεί στις απαραίτητες τιμές στο χρόνο της εξισορρόπησης. Εάν αυτό δεν έχει επιτευχθεί σε αυτόν τον χρόνο, η NPT εξισορρόπηση συνεχίζεται για επιπλέον χρονικό διάστημα.

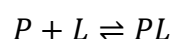
Παραγωγή τροχιάς

Μετά το πέρας των δύο σταδίων εξισορρόπησης το σύστημα έχει σταθεροποιηθεί στις επιθυμητές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, οπότε μπορεί να ακολουθήσει η παραγωγή της τροχιάς του συστήματος. Για το σκοπό αυτό το σύστημα προσομοιώνεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο των σταδίων της εξισορρόπησης. Το χρονικό διάστημα προσομοίωσης μπορεί να είναι της τάξεως των

μερικών ns και μπορεί να φτάσει ακόμη και έως ms, ανάλογα με τις ανάγκες και το μέγεθος του εκάστοτε μελετώμενου συστήματος [13].

2.2. Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης

Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεση ενός μορίου-προσδέτη σε μία πρωτεΐνη για τη δημιουργία συμπλόκου είναι από τις πιο βασικές θερμοδυναμικές ιδιότητες ενός βιολογικού συστήματος καθώς αυτό καθορίζει το πόσο ισχυρά προσδένεται το μικρό μόριο και άρα καθορίζει και τη δραστικότητα ενός φαρμάκου. Η πρόσδεση ενός μορίου-προσδέτη (ligand, L) σε μία πρωτεΐνη (protein, P) για τη δημιουργία συμπλόκου (PL) περιγράφεται από την ακόλουθη αμφίδρομη χημική αντίδραση:



Η αδιάστατη σταθερά ισορροπίας (σταθερά πρόσδεσης) K_b^o της παραπάνω αντίδρασης ορίζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων του προϊόντος [PL] προς τα αντιδρώντα [P], [L], πολλαπλασιασμένα με την συγκέντρωση πρότυπων συνθηκών c^o :

$$K_b^o = c^o \frac{[PL]}{[L][P]} \quad (2.20)$$

Όπου, c^o είναι η συγκέντρωση πρότυπων συνθηκών (standard state concentration), η οποία συνήθως είναι ίση με 1 mol/L σε σταθερή πίεση 1 atm. Έχοντας ορίσει τα παραπάνω, η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης κατά Gibbs δίνεται ως:

$$\Delta G_{bind}^o = -k_B T \ln K_b^o \quad (2.21)$$

Όπου, k_B είναι η σταθερά Boltzmann και T η θερμοκρασία του συστήματος.

Η σταθερά ισορροπίας εκφράζεται διαφορετικά ως ο λόγος των πιθανοτήτων (P) το σύστημα να βρίσκεται στην κατάσταση του συμπλόκου (PL) προς την κατάσταση όπου το μόριο-προσδέτης και η πρωτεΐνη βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή (P+L):

$$K_b^o = \frac{P_1}{P_0} \quad (2.22)$$

Όπου, P_1 είναι η πιθανότητα το μόριο-προσδέτης να βρίσκεται σε σύζευξη με την πρωτεΐνη και P_0 η πιθανότητα τα δύο μόρια να βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή. Κατά αυτό τον τρόπο η σταθερά ισορροπίας και άρα η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης θα μπορούσε να υπολογιστεί μετρώντας τον αριθμό των διαμορφώσεων του συστήματος στην κατάσταση συμπλόκου και στην κατάσταση όπου τα μόρια προσδέτη και πρωτεΐνης βρίσκονται ελεύθερα (για παράδειγμα Εικόνα 14, $\Delta G1$).

2.3. Υπολογισμοί Διατάραξης της Ελεύθερης Ενέργειας

Οι υπολογισμοί Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας (Free Energy Perturbation, FEP) σε συνδυασμό με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής είναι υψηλής ακρίβειας, αλλά υψηλού υπολογιστικού κόστους, υπολογιστικοί μέθοδοι που αποσκοπούν στην πρόβλεψη της ενέργειας πρόσδεσης ενός μικρού μορίου-προσδέτη σε έναν πρωτεϊνικό στόχο. Βασίζονται στην χρήση ενός θερμοδυναμικού κύκλου, ο οποίος εμπεριέχει μια σειρά μη φυσικών (nonphysical) ενδιάμεσων σταδίων [15]. Λόγω της ύπαρξης αυτών των μη φυσικών σταδίων οι υπολογισμοί αυτοί ανήκουν στην κατηγορία των αλχημικών μεθόδων. Τελικά, η ελεύθερη ενέργεια μεταξύ δύο φυσικών τελικών σταδίων (physical end states) προκύπτει ως το άθροισμα της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ όλων των ενδιάμεσων αλχημικών σταδίων [15]. Στη συγκεκριμένη εργασία θα δοθεί έμφαση στους υπολογισμούς Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης. Δηλαδή, οι υπολογισμοί αφορούν τη διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (ΔG) μεταξύ ενός μορίου αναφοράς και ενός μελετώμενου μορίου που προσδένεται σε ένα συγκεκριμένο πρωτεϊνικό στόχο.

2.3.1. Υπολογισμοί Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης προσδέτη-υποδοχέα

Για να υπολογιστεί η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης μέσω προσομοιώσεων μετρώντας τον αριθμό των διαμορφώσεων του συστήματος στην κατάσταση συμπλόκου και στην κατάσταση όπου τα μόρια προσδέτη και πρωτεΐνης βρίσκονται ελεύθερα, θα χρειαζόταν ταυτόχρονα ένας πολύ μεγάλος υπολογιστικός χρόνος για να γίνει σωστή δειγματοληψία. Επομένως, η μέθοδος αυτή δεν είναι ρεαλιστική.

Για το λόγο αυτό προκύπτει η ανάγκη χρησιμοποίησης αλχημικών μεθόδων υπολογισμού της ελεύθερης ενέργειας κατά τους οποίους αποφεύγεται η δειγματοληψία τέτοιων περιοχών με τη χρήση αλχημικών μετασχηματισμών, δηλαδή χρησιμοποίησης μη φυσικών μονοπατιών σε έναν θερμοδυναμικό κύκλο [15]. Στο θερμοδυναμικό αυτό κύκλο μπορεί να συγκριθούν δύο χημικά ανάλογα μόρια με υπολογισμούς Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας (Relative Free Energy Perturbation calculations) Πρόσδεσης. Οι υπολογισμοί αυτοί χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις όπου αυτό που ενδιαφέρει είναι η Σχετική Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης μεταξύ δύο αναλόγων μορίων-προσδετών σε μία πρωτεΐνη-στόχος. Μέσω της μεθόδου αυτής υπολογίζεται η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (ΔG) μεταξύ του μορίου αναφοράς και ενός μελετώμενου μορίου σε ένα συγκεκριμένο πρωτεϊνικό στόχο [16].

Μέσω των υπολογισμών Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης αποφεύγεται η προσομοίωση των διαδικασιών πρόσδεσης και απομάκρυνσης (binding and unbinding events) των μορίων-προσδετών στην πρωτεΐνη-στόχος, κάτι το οποίο θα απαιτούσε μεγάλο υπολογιστικό κόστος. Συγκεκριμένα, λαμβάνεται υπόψη το γεγονός ότι η ελεύθερη ενέργεια είναι μία καταστατική ιδιότητα, δηλαδή εξαρτάται μόνο από την αρχική και την τελική κατάσταση του συστήματος. Επομένως, η διαδρομή με την οποία το σύστημα οδηγείται από την αρχική στην τελική κατάσταση δεν επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα. Μία απεικόνιση του θερμοδυναμικού κύκλου

που χρησιμοποιείται στους υπολογισμούς Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας φαίνεται στην Εικόνα 14 [16]. Στον θερμοδυναμικό κύκλο η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια μεταξύ των μορίων A και B ($\Delta\Delta G$) μπορεί να υπολογιστεί μέσω δύο πιθανών διαδρομών. Η πρώτη περίπτωση είναι το απευθείας μονοπάτι, το οποίο υποδεικνύεται στο σχήμα μέσω των μπλε οριζόντιων βελών (ΔG_1 και ΔG_2). Σύμφωνα με αυτή τη διαδρομή η διαφορά ελεύθερης ενέργειας μπορεί να εκτιμηθεί ως:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1 \quad (2.23)$$

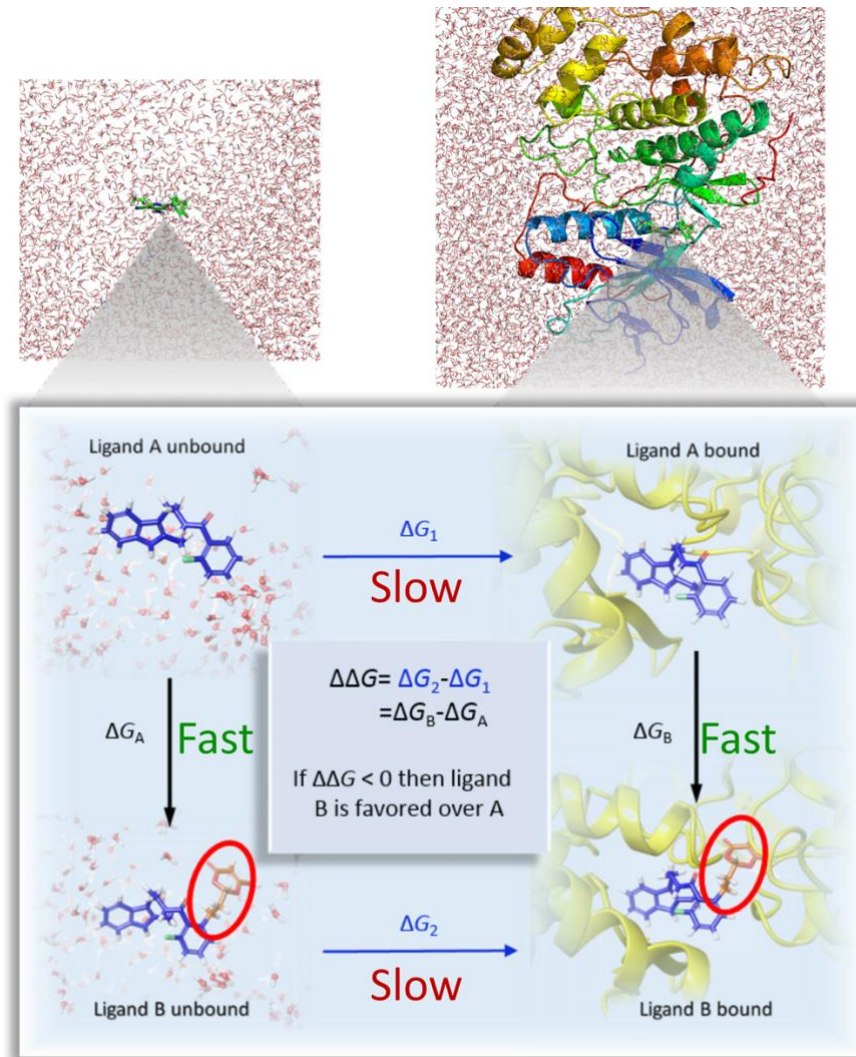
Λόγω της μεγάλης διαφοράς που έχει η αρχική με την τελική κατάσταση του συστήματος ο υπολογισμός αυτός έχει μεγάλο υπολογιστικό κόστος και επομένως είναι δύσκολο να προσομοιωθεί. Επομένως μπορούμε να υπολογίσουμε τη Σχετική Ελεύθερη Ενέργεια πρόσδεσης μέσω των μαύρων κάθετων βελών. Στο αλχημικό αυτό μονοπάτι, το μόριο A μετασχηματίζεται στο μόριο B σε ελεύθερη μορφή, όσο και προσδεμένο στην πρωτεΐνη. Επειδή τα μόρια A και B είναι χημικά ανάλογα, σε αυτή την περίπτωση το υπολογιστικό κόστος είναι πολύ μικρότερο από ότι στον υπολογισμό των ΔG_1 και ΔG_2 . Στην περίπτωση αυτή η διαφορά ελεύθερης ενέργειας είναι:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_B - \Delta G_A \quad (2.24)$$

Λόγω του κλειστού θερμοδυναμικού κύκλου που χρησιμοποιείται, η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια που υπολογίζεται μέσω της αλχημικής διαδρομής είναι ίση με αυτή μέσω της απευθείας διαδρομής:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_B - \Delta G_A \quad (2.25)$$

Τελικά, αν η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια μεταξύ των μορίων A και B προκύψει αρνητική, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το μόριο B έχει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στην πρωτεΐνη-στόχος σε σχέση με το μόριο A ($\Delta G_2 < \Delta G_1$) [16].



Εικόνα 14. Ο κλειστός θερμοδυναμικός κύκλος που χρησιμοποιείται στους υπολογισμούς Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [16].

2.3.2. Σταδιοποίηση Υπολογισμών Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας μέσω της μεταβλητής σύζευξης λ

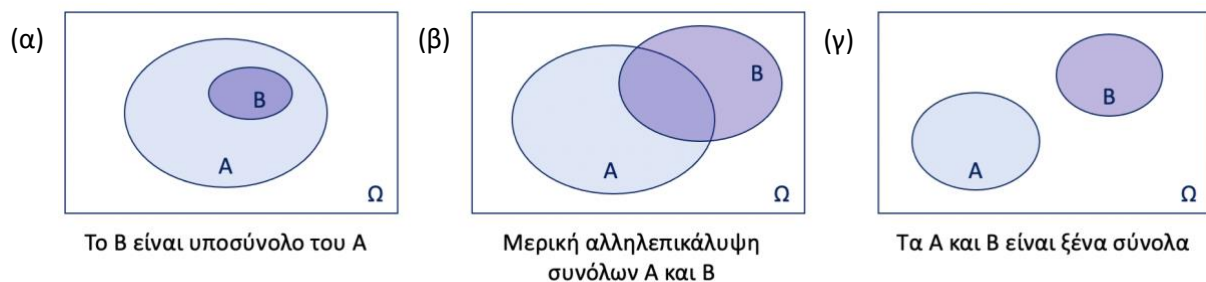
Το 1995 προτάθηκε από τον Zwanzig [17] η εξής σχέση υπολογισμού της διαφοράς στην ελεύθερη ενέργεια μεταξύ δύο καταστάσεων A και B:

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = G_B - G_A = -RT \ln \left\langle e^{-\frac{(V_B - V_A)}{RT}} \right\rangle_A \quad (2.26)$$

Σύμφωνα με αυτή τη σχέση, η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των καταστάσεων A και B μπορεί να υπολογιστεί ως ο φυσικός λογάριθμος της μέσης τιμής της κατανομής Boltzmann της διαφοράς της δυναμικής ενέργειας μεταξύ των δύο τελικών καταστάσεων, ως προς την κατάσταση A. Δηλαδή, γίνεται υπολογισμός της δυναμικής ενέργειας που θα έχει η κατάσταση B σε μία συγκεκριμένη διαμόρφωση, η οποία αφαιρείται από την δυναμική ενέργεια της κατάστασης A στην ίδια διαμόρφωση. Άρα, τελικά, η διαφορά ελεύθερης ενέργειας υπολογίζεται

χρησιμοποιώντας τις εκτιμώμενες δυναμικές ενέργειες. Στην πράξη έχει παρατηρηθεί ότι ο απευθείας υπολογισμός της διαφοράς στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης με χρήση της εξίσωσης του Zwanzig δεν οδηγεί σε ακριβή αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η απόλυτη τιμή της διαφοράς στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης για το μετασχηματισμό του μορίου A στο B και, αντιστρόφως, του B στο A, δεν παρουσιάζει το ίδιο αποτέλεσμα. Αυτό συμβαίνει λόγω μικρής αλληλοεπικάλυψης του χώρου των φάσεων των δύο καταστάσεων (poor phase-space overlap) [15].

Ο χώρος των φάσεων ενός συστήματος περιγράφει όλες τις πιθανές διαμορφώσεις που μπορεί να βρεθεί ένα σύστημα στη θερμοδυναμική ισορροπία. Η αλληλοεπικάλυψη του χώρου των φάσεων (phase-space overlap) μεταξύ δύο θερμοδυναμικών καταστάσεων εκφράζει το βαθμό στον οποίο οι πιθανές διαμορφώσεις της αρχικής κατάστασης είναι επίσης πιθανές διαμορφώσεις της τελικής κατάστασης. Η ακρίβεια των υπολογισμών Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας αυξάνει, όσο αυξάνει η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ του χώρου των φάσεων της αρχικής και της τελικής κατάστασης του συστήματος που μελετάται. Στην ιδανική περίπτωση ο χώρος των φάσεων της μίας κατάστασης είναι υποσύνολο της άλλης κατάστασης (Εικόνα 15α). Οι χώροι των φάσεων των δύο καταστάσεων μπορεί επίσης να αλληλεπικαλύπτονται μόνο κατά ένα μέρος (Εικόνα 15β), ακόμα και να μην αλληλεπικαλύπτονται καθόλου (Εικόνα 15γ) [18].



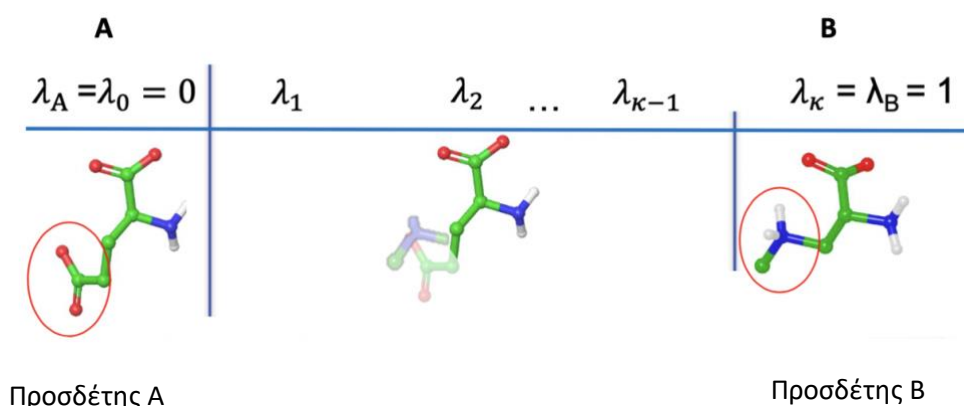
Εικόνα 15. Πιθανές περιπτώσεις συσχέτισης των χώρων των φάσεων μεταξύ δύο καταστάσεων A και B.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αύξηση της ακρίβειας των υπολογισμών είναι η χρήση πολλαπλών ενδιαμέσων καταστάσεων για τη μετάβαση από το σύστημα A στο σύστημα B. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται σταδιοποίηση και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή της μεταβλητής σύζευξης λ (coupling parameter λ), η οποία επιτρέπει την ομαλή μετάβαση από το μόριο-προσδέτη A στο μόριο-προσδέτη B. Η μεταβλητή σύζευξης λ παίρνει τιμές στο διάστημα $[0, 1]$. Για $\lambda = 0.0$ προκύπτει η δομή του μορίου A, ενώ για $\lambda = 1.0$ προκύπτει η δομή του μορίου B (Εικόνα 16) [15-16]. Όλες οι ενδιάμεσες τιμές του λ αντιστοιχούν σε καταστάσεις που δεν έχουν φυσική σημασία και όπου οι ιδιότητες του μορίου είναι γραμμικός συνδυασμός των ιδιοτήτων των καταστάσεων A και B. Για παράδειγμα, η δυναμική ενέργεια στην κατάσταση λ του ανοιχτού συνόλου (0, 1):

$$V(\lambda) = \lambda V_B + (1 - \lambda)V_A \quad (2.27)$$

Τελικά, η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια μεταξύ της κατάστασης A και B προκύπτει ως το άθροισμα των διαφορών στην ελεύθερη ενέργεια κάθε μετασχηματισμού λ_k σε λ_{k+1} :

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = \sum_{k=0}^{k=n-1} \Delta G_{\lambda_k \rightarrow \lambda_{k+1}} \quad (2.28)$$



Εικόνα 16. Χρήση της μεταβλητής σύζευξης λ για το μετασχηματισμό του προσδέτη A σε προσδέτη B. Η τιμή $\lambda=0.0$ αντιστοιχεί στην κατάσταση του προσδέτη A, η $\lambda=1.0$ στην κατάσταση του προσδέτη B, ενώ οι ενδιάμεσες τιμές λ δεν έχουν φυσική σημασία. Η εικόνα λήφθηκε από την βιβλιογραφική πηγή [5].

Το υπολογιστικό κόστος της μεθόδου αυξάνει με αύξηση του αριθμού των τιμών λ που χρησιμοποιούνται, οπότε απαιτείται συμβιβασμός μεταξύ επιθυμητής ακρίβειας και υπολογιστικού κόστους [19].

2.3.3. Εκτίμηση της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης μέσω της μεθόδου MBAR

Όπως εξηγήθηκε παραπάνω η εκτίμηση της διαφοράς στην ελεύθερη ενέργεια δύο καταστάσεων A και B μέσω της εξίσωσης του Zwanzig απαιτεί δειγματοληψία (sampling) μόνο από τη μία εκ των δύο καταστάσεων. Μια μέθοδος εκτίμησης της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας που λαμβάνει υπόψη και τις δύο καταστάσεις του συστήματος και, επομένως, εμφανίζει μεγαλύτερη ακρίβεια, είναι η μέθοδος Bennet acceptance ratio (BAR) [20]:

$$\Delta G^{BAR}(A \rightarrow B) = -\beta^{-1} \ln \frac{\langle f(\beta[U_{A(r)} - U_{B(r)} + C]) \rangle_B}{\langle f(\beta[U_{B(r)} - U_{A(r)} + C]) \rangle_A} + C \quad (2.29)$$

Όπου, ο αριθμητής του κλάσματος είναι ο μέσος όρος του στατιστικού συνόλου μιας συνάρτησης f . Η f παίρνει ως όρισμα την διαφορά μεταξύ της δυναμικής ενέργειας της κατάστασης A και της δυναμικής ενέργειας της κατάστασης B για μια συγκεκριμένη διαμόρφωση r μείον μία σταθερά C . Η διαφορά αυτή είναι πολλαπλασιασμένη με τη σταθερά β ($\beta = k_B^{-1}T^{-1}$). Η σταθερά C λαμβάνεται από δεδομένα της κατανομής ισορροπίας $f(B)$. Ο παρονομαστής είναι ο μέσος όρος του

συνόλου της ίδιας συνάρτησης με αρνητικό πρόσημο. Η εξίσωση λύνεται επαναληπτικά. Λαμβάνεται μία τιμή για το C, στη συνέχεια, υπολογίζεται το ΔG και λαμβάνεται ΔG = C ως επόμενη εκτίμηση της C. Η διαδικασία σταματάει όταν η μεταβολή της τιμής του ΔG είναι αμελητέα. Έχει βρεθεί ότι η στατιστικά καλύτερη επιλογή που ελαχιστοποιεί το σφάλμα μπορεί να υπολογιστεί από την συνάρτηση Fermi:

$$f(x) = \frac{1}{1+e^x} \quad (2.28) \text{ και } C = \Delta G \quad (2.30)$$

Η επέκταση της μεθόδου BAR ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι καταστάσεις σταδιοποίησης του μετασχηματισμού είναι η μέθοδος multistate BAR (MBAR). Η μέθοδος MBAR αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο εκτίμησης της διαφοράς στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης [21].

2.3.4. Σύγκλιση των υπολογισμών Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης

Η σύγκλιση των υπολογισμών της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης πρέπει να ελέγχεται ώστε τα αποτελέσματα να έχουν φυσικό νόημα. Για τον έλεγχο της σύγκλισης της συγκεκριμένης μεθόδου, συνήθως γίνεται χρήση ενδιάμεσων χημικών μορίων τα οποία σχηματίζουν έναν κλειστό κύκλο μεταξύ των δύο μορίων A και B. Η πραγματοποίηση υπολογισμών κλειστού κύκλου είναι ένας τρόπος επικύρωσης ότι οι υπολογισμοί που πραγματοποιούνται έχουν μικρό σφάλμα, εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι η ελεύθερη ενέργεια είναι καταστατική ιδιότητα και επομένως δίνεται από το άθροισμα των αλλαγών κάθε σταδίου. Κατά συνέπεια, η συνολική ενέργεια του κλειστού κύκλου θα πρέπει να ισούται με μηδέν. Για το λόγο αυτό η επιλογή των ενδιάμεσων μορίων που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να εξασφαλίζει τη μεγαλύτερη δυνατή επικάλυψη μεταξύ των διαμορφωτικών χώρων [19].

Ένας ακόμη τρόπος να εξασφαλιστεί η ακρίβεια των υπολογισμών είναι η χρήση περισσότερων παραθύρων λ μεταξύ των μετασχηματισμών. Βέβαια, η μέθοδος αυτή αυξάνει ταυτόχρονα και το υπολογιστικό κόστος της μεθόδου, για αυτό απαιτείται η επιλογή βέλτιστου αριθμού παραθύρων λ. Ένας πιθανός τρόπος να ελέγξει κανείς σε ποιες περιοχές του μετασχηματισμού απαιτείται πυκνότερη σταδιοποίηση είναι μέσω των διαγραμμάτων μέσης τιμής στατιστικού συνόλου της παραγώγου της υπολογισμένης ελεύθερης ενέργειας $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_\lambda$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ. Μέσω των διαγραμμάτων αυτών μπορεί να εκτιμηθεί η απαίτηση πυκνότερης σταδιοποίησης σε συγκεκριμένα σημεία κατά την πορεία του μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, στις περιοχές όπου η κλίση της καμπύλης αλλάζει απότομα, ο αριθμός των παραθύρων/τιμών λ που χρησιμοποιούνται χρειάζεται να είναι πιο πυκνός ώστε οι υπολογισμοί να έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται συμβιβασμός μεταξύ επιθυμητής ακρίβειας και υπολογιστικού κόστους [19].

Εκτός των παραπάνω η πραγματοποίηση τουλάχιστον τριών αντιγράφων στους υπολογισμούς είναι σημαντική ώστε να παρατηρηθεί η επαναληψιμότητά τους. Τα

αντίγραφα χρησιμοποιούν τις ίδιες αρχικές συνθήκες και τις ίδιες ή παραπλήσιες θέσεις των σωματιδίων του συστήματος, αλλά διαφορετικές αρχικές ταχύτητες οι οποίες αποδίδονται στα σωματίδια τυχαία από κάποια κατανομή, όπως είναι η κατανομή Maxwell-Boltzmann. Τέλος, σε κάθε περίπτωση είναι επιθυμητή η σύγκριση με πειραματικά ή άλλα υπολογιστικά αποτελέσματα, εάν αυτά υπάρχουν.

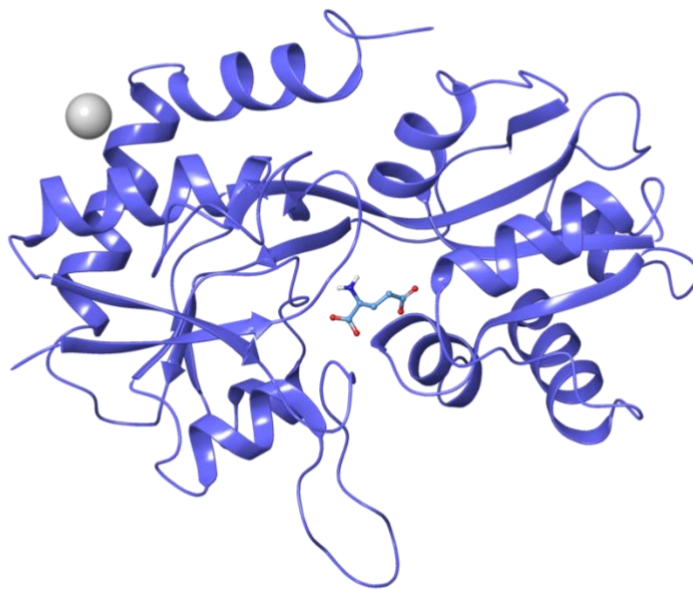
3. Αποτελέσματα

3.1. Συστήματα

Γλουταμινικός υποδοχέας

Για το σκοπό των προσομοιώσεων χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική κρυσταλλική δομή με PDB ID: 1FTJ [9]. Η συγκεκριμένη κρυσταλλική δομή αναφέρεται στην περιοχή πρόσδεσης S1/S2 του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA (GluR2) σε σύζευξη με το φυσικό αγωνιστή του, το γλουταμινικό ιόν. Η συγκεκριμένη κρυσταλλική δομή έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο περίθλασης ακτίνων X και έχει μετρηθεί με ανάλυση (resolution) 1.90 Å με θερμοκρασία 277 K και pH 6.5. Επιπλέον, τα γονίδια έκφρασης του υποδοχέα απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Rattus norvegicus* και στη συνέχεια εκφράστηκαν σε σύστημα *Escherichia coli* [9].

Η παραπάνω κρυσταλλική δομή αποτελείται από τρεις αλυσίδες περιοχής πρόσδεσης (A, B και C), η καθεμιά εκ των οποίων βρίσκεται σε σύζευξη με ένα γλουταμινικό ιόν. Από τη συγκεκριμένη δομή (PDB ID: 1FTJ) για την παρούσα μελέτη θα χρησιμοποιηθεί μόνο η αλυσίδα A, όπως έχει επιλεγθεί σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου της Δρ. Ζωής Κούρνια [5]. Η δομή που χρησιμοποιείται στα πλαίσια της παρούσας μελέτης απεικονίστηκε μέσω του εργαλείου Maestro [22] και φαίνεται στην Εικόνα 17.



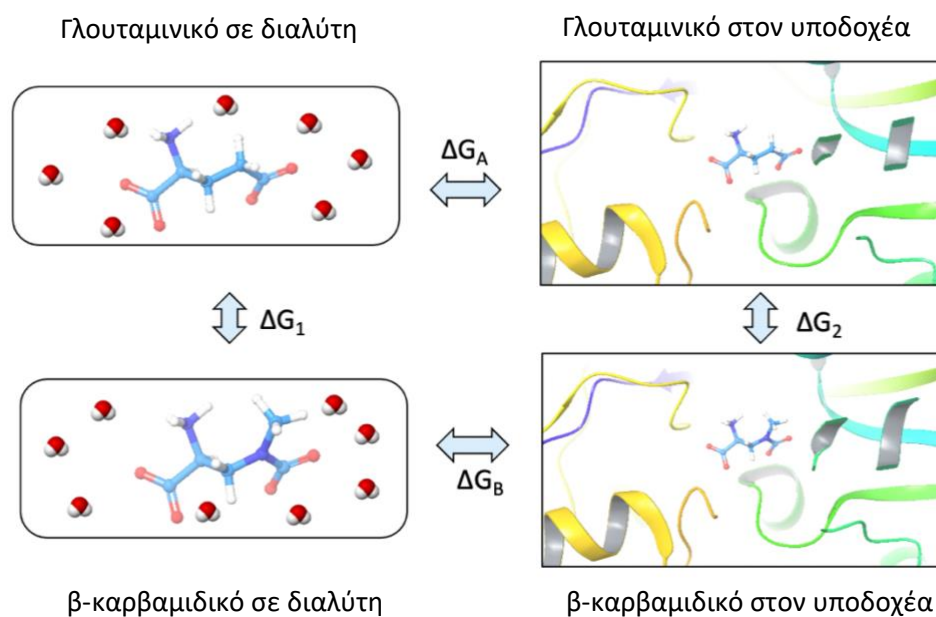
Εικόνα 17. Αλυσίδα A της πρωτεϊνικής κρυσταλλικής δομής (PDB ID: 1FTJ [9]) της περιοχής πρόσδεσης S1/S2 του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA σε σύζευξη με το γλουταμινικό ιόν.

Θερμοδυναμικός κύκλος υπολογισμών και ενδιάμεσα μόρια

Για τους υπολογισμούς Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης ($\Delta\Delta G$) μεταξύ γλουταμινικού και β -καρβαμιδικού συζευγμένα με τον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA χρησιμοποιήθηκε ο θερμοδυναμικός κύκλος που φαίνεται στη συνέχεια (Εικόνα 18). Όπως ήδη αναφέρθηκε νωρίτερα, η ελεύθερη ενέργεια είναι καταστατική ιδιότητα. Επομένως, για τον υπολογισμό της μέσω των υπολογισμών FEP σε συνδυασμό με προσομοιώσεις MD (FEP/MD), χρησιμοποιείται η παρακάτω έκφραση:

$$\Delta\Delta G_{glu \rightarrow betacarb} = \Delta G_{glu \rightarrow betacarb}^{com} - \Delta G_{glu \rightarrow betacarb}^{solv} = \Delta G_2 - \Delta G_1 \quad (3.1)$$

Επομένως, αντί να προσομοιωθεί η διαδικασία πρόσδεσης του γλουταμινικού στον υποδοχέα και του β -καρβαμιδικού στον υποδοχέα, πραγματοποιούνται υπολογιστικά πιο απλές προσομοιώσεις. Συγκεκριμένα, γίνονται προσομοιώσεις για το μετασχηματισμό του γλουταμινικού σε β -καρβαμιδικό σε διαλύτη και σε σύζευξη με τον υποδοχέα.

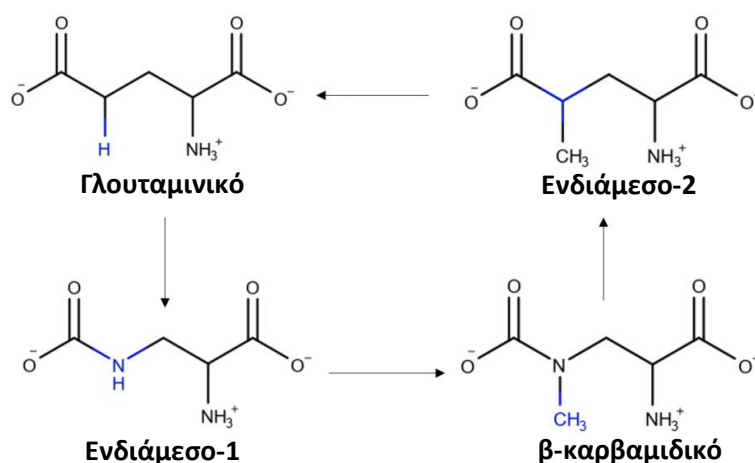


Εικόνα 18. Θερμοδυναμικός κύκλος υπολογισμών.

Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκαν δύο ενδιάμεσα μόρια, το ενδιάμεσο-1 και το ενδιάμεσο-2, τα οποία επιλέχθηκαν από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου της Δρ. Ζωής Κούρνια [5]. Η χρήση αυτών των δύο ενδιάμεσων μορίων είναι επιθυμητή ώστε να δημιουργηθεί ένας κλειστός κύκλος μεταξύ των δύο τελικών μορίων, δηλαδή του γλουταμινικού και του β -καρβαμιδικού. Αυτός είναι ένας τρόπος επικύρωσης ότι οι υπολογισμοί που πραγματοποιούνται έχουν μικρό σφάλμα, εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι η ελεύθερη ενέργεια είναι καταστατική ιδιότητα και επομένως δίνεται από το άθροισμα των αλλαγών κάθε σταδίου. Κατά συνέπεια, η συνολική ενέργεια του κλειστού κύκλου θα πρέπει να ισούται με μηδέν. Για το λόγο

αυτό η επιλογή των ενδιάμεσων μορίων που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να εξασφαλίζει τη μεγαλύτερη δυνατή επικάλυψη μεταξύ των διαμορφωτικών χώρων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, δηλαδή, πρέπει η μετατροπή του γλουταμινικού σε β-καρβαμιδικό να γίνει με όσο το δυνατόν ομαλότερο τρόπο, ώστε η ακρίβεια των υπολογισμών θα είναι υψηλότερη.

Για τις ανάγκες των υπολογισμών, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις μετασχηματισμοί, ο καθένας εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη και σε σύζευξη με τον υποδοχέα. Πιο αναλυτικά, γίνονται οι μετασχηματισμοί (i) γλουταμινικό σε ενδιάμεσο-1: μετατροπή ενός ατόμου άνθρακα (γλουταμινικό) σε άζωτο (ενδιάμεσο-1), (ii) ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμιδικό: προσθήκη μιας μεθυλομάδας στο άζωτο του ενδιάμεσου-1, (iii) β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο-2: μετατροπή του ατόμου αζώτου (β-καρβαμιδικό) σε άνθρακα (ενδιάμεσο-2) και, τέλος, (iv) ενδιάμεσο-2 σε γλουταμινικό: αφαίρεση της μεθυλομάδας από το ενδιάμεσο-2 και κλείσιμο του κύκλου (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Κλειστός κύκλος υπολογισμών. Η επιλογή του κλειστού κύκλου έγινε από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου της Δρ. Ζωής Κούρνια [5].

3.2. επικύρωση της μεθόδου υπολογισμού της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας (ΔΔG)

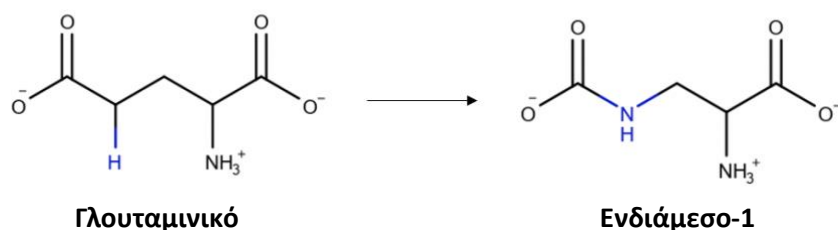
3.2.1. Εισαγωγή

Η επικύρωση της μεθοδολογίας υπολογισμού Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης μέσω υπολογισμών FEP σε συνδυασμό με προσομοιώσεις MD (FEP/MD) έγινε με χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS-AA [23] και του λογισμικού GROMACS 2021 [24]. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης μεταξύ του γλουταμινικού και του ενδιάμεσου-1. Οι υπολογισμοί αυτοί έχουν ήδη πραγματοποιηθεί παλαιότερα από το εργαστήριο με τη χρήση του ίδιου πεδίου δυνάμεων, αλλά του λογισμικού NAMD 2.14 [25]. Για την επικύρωση της μεθοδολογίας που έχει ακολουθηθεί χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GROMACS 2021. Αρχικός στόχος, λοιπόν, ήταν η αναπαραγωγή των ήδη υπαρχόντων αποτελεσμάτων του εργαστηρίου με χρήση του λογισμικού GROMACS

2021. Στη συνέχεια, εφόσον έχει πραγματοποιηθεί η επικύρωση, η ίδια μεθοδολογία επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί για τους υπολογισμούς της παρούσας εργασίας. Τελικά, η μεθοδολογία επικυρώθηκε, όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια, όμως αποφασίστηκε να μην χρησιμοποιηθεί για τους επόμενους υπολογισμούς λόγω προβλημάτων σχετικά με την εφαρμογή της σε GROMACS 2021 και της απαίτησης μεγάλου χρόνου επίλυσης αυτών των προβλημάτων.

3.2.2. Προετοιμασία των συστημάτων και παράμετροι προσομοιώσεων

Η δομή που χρησιμοποιήθηκε είναι η αλυσίδα A της κρυσταλλικής δομής της περιοχής πρόσδεσης του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA σε σύζευξη με τον φυσικό αγωνιστή του, γλουταμινικό ιόν. Η δομή αυτή έχει PDB ID: 1FTJ, όπως ήδη περιγράφηκε προηγουμένα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία της πρωτεϊνικής δομής με χρήση του εργαλείου Protein Preparation Wizard του υπολογιστικού πακέτου Schrödinger [26-27]. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη ώστε να διορθωθούν τυχόν κενά που πιθανόν υπάρχουν στην κρυσταλλική δομή, να αφαιρεθούν τα κρυσταλλικά νερά και να ελαχιστοποιηθεί η ενέργεια του συστήματος. Δηλαδή, ο σκοπός είναι να βρεθεί η πιο ρεαλιστική δομή του συστήματος. Έπειτα από το στάδιο της προετοιμασίας της δομής έγινε εξαγωγή του pdb αρχείου της πρωτεΐνης και του pdb αρχείου του γλουταμινικού, ξεχωριστά. Στη συνέχεια, σχεδιάστηκε η δομή του ενδιάμεσου-1 στο Maestro βάση της δομής του γλουταμινικού και η δομή εξάχθηκε, επίσης, σε μορφή pdb.



Εικόνα 20. Ο μετασχηματισμός γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1

Για την παραμετροποίηση του γλουταμινικού και του ενδιάμεσου-1 στο πεδίο δυνάμεων OPLS-AA χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα [LigParGen](#) [28], η οποία διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο από την ερευνητική ομάδα του Δρ. William L. Jorgensen. Ως αρχεία εισόδου χρησιμοποιήθηκαν τα pdb του γλουταμινικού και του ενδιάμεσου-1 και το αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή αρχείων gro και itp για κάθε μόριο ξεχωριστά. Το αρχείο gro είναι η αναπαράσταση του μορίου σε μορφή κατανοητή από το λογισμικό GROMACS, ενώ το itp αρχείο πρόκειται για το αρχείο παραμετροποίησης του μορίου (τοπολογία του μορίου, topology file). Στη συνέχεια, απαιτείται να γίνει συνένωση των αρχείων παραμέτρων των μορίων, να βρεθούν τα άτομα που θα μεταβληθούν κατά το μετασχηματισμό (perturbation) και να σημειωθούν στα αρχεία παραμέτρων. Στην περίπτωση των προσομοιώσεων του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη απαιτείται η δημιουργία συνολικού αρχείου

παραμέτρων. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε με χρήση κατάλληλων εντολών σε γλώσσα python.

Πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μετασχηματισμού του γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1, τόσο σε διαλύτη όσο και σε σύζευξη με τον υποδοχέα σε διαλύτη. Για το σκοπό αυτό το κάθε βήμα που περιγράφεται στη συνέχεια αναφέρεται τόσο στην περίπτωση του προσδέτη σε διαλύτη, όσο και στην περίπτωση του συμπλόκου σε διαλύτη. Για όλες τις προσομοιώσεις χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS-AA [23].

Το κάθε σύστημα ενυδατώθηκε σε κυβικό κουτί με μικρότερη απόσταση μεταξύ του προσδέτη και των ορίων του κουτιού να ισούται με 1.5 nm. Η ενυδάτωση έγινε χρησιμοποιώντας μόρια νερού TIP3P [29]. Στη συνέχεια, έγινε ουδετεροποίηση του συστήματος προσδέτη σε διαλύτη με ένα ιόν νατρίου, του συστήματος συμπλόκου με έξι ιόντα χλωρίου και προστέθηκε άλας χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 0.15 M.

Το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη αποτελείται συνολικά από ένα μόριο προσδέτη, 1596 μόρια διαλύτη, 6 ιόντα νατρίου και 5 ιόντα χλωρίου. Συνολικά, το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη αποτελείται από 4900 άτομα με μικρές διαφοροποιήσεις ανάλογα με το μέγεθος του προσδέτη. Αντίστοιχα, το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη αποτελείται από τον υποδοχέα, ένα ιόν ψευδαργύρου, ένα μόριο προσδέτη, 27821 μόρια διαλύτη, 80 ιόντα νατρίου και 86 ιόντα χλωρίου. Συνολικά, το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη αποτελείται από 88100 άτομα με μικρές διαφοροποιήσεις ανάλογα με το μέγεθος του προσδέτη.

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας για το κάθε σύστημα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 50000 βήματα ως μέγιστο πλήθος βημάτων και ως μέγιστο όριο δύναμης τα $10 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. Για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος απότομης κατάβασης/καθόδου/κλίσης (steepest descent).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση του κάθε συστήματος, αρχικά σε κανονικό (NVT) στατιστικό σύνολο και, στη συνέχεια, σε ισόθερμο-ισοβαρές (NPT) στατιστικό σύνολο. Η NVT εξισορρόπηση πραγματοποιήθηκε για 1 ns (500000 βήματα με 2 fs ανά βήμα). Η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 310 K και για τη ρύθμισή της χρησιμοποιήθηκε δυναμική Langevin με συντελεστή χρόνου 1.0 ps^{-1} . Η NPT εξισορρόπηση πραγματοποιήθηκε επίσης για 1 ns (500000 βήματα με 2 fs ανά βήμα). Για τη ρύθμιση της πίεσης σε 1 bar έγινε χρήση βαροστάτη Berendsen [30] με χρονική σταθερά 0.5 ps. Και στις δυο περιπτώσεις εξισορρόπησης έγινε χρήση του στοχαστικού πεπλεγμένου σχήματος (stochastic leap-frog) [31] για την ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα.

3.2.3. Προσομοιώσεις FEP/MD για την διατάραξη γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1

Για τον υπολογισμό της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης εφαρμόστηκε σταδιοποίηση μέσω της μεταβλητής σύζευξης λ. Συγκεκριμένα, για τον αληθινό μετασχηματισμό του γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1 εφαρμόστηκε σταδιοποίηση 31

παραθύρων/τιμών λ για το κάθε σύστημα. Τα πρώτα 11 παράθυρα/τιμές λ είναι ισαπέχοντα (λ 0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0) και χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων φορτίων (Coulomb). Τα υπόλοιπα 20 παράθυρα/τιμές λ είναι επίσης ισαπέχοντα (λ 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 0.30 0.35 0.40 0.45 0.50 0.55 0.60 0.65 0.70 0.75 0.80 0.85 0.90 0.95 1.00) και χρησιμεύουν στη ρύθμιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (van der Waals). Για κάθε παράθυρο/τιμή λ πραγματοποιήθηκε προσομοίωση μοριακής δυναμικής για 10 ns (5000000 βήματα με 2 fs ανά βήμα) σε ισόθερμο-ισοβαρές (NPT) στατιστικό σύνολο. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε βαροστάτης Parrinello-Rahman [32] για τη ρύθμιση της πίεσης σε 1 bar με χρονική σταθερά ίση με 2 ps. Όλες οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω υπολογιστικού χρόνου που παραχωρήθηκε από το Εθνικό Δίκτυο Υποδομών Τεχνολογίας και Έρευνας (ΕΔΥΤΕ) της Εθνικής Υπερυπολογιστικής δομής ARIS.

Όπως αναφέρθηκε, για τον μετασχηματισμό του γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1 χρησιμοποιήθηκαν 31 παράθυρα λ , για το καθένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε προσομοίωση μοριακής δυναμικής για 10 ns. Οι απαιτήσεις σε CPUs για τον μετασχηματισμό αυτό φαίνονται στον Πίνακα 1 για το σύστημα συμπλόκου και προσδέτη σε διαλύτη.

Πίνακας 1. Υπολογιστικές απαιτήσεις μετασχηματισμού γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1 για τα συστήματα προσδέτη και συμπλόκου σε διαλύτη.

Σύστημα Προσομοίωσης	Αριθμός Ατόμων	CPUs	Χρόνος (h/μετασχ.)
Σύμπλοκο σε διαλύτη	88100	1816	495
Προσδέτης σε διαλύτη	4900	124	342

3.2.4. Υπολογισμός του $\Delta\Delta G$

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο alchemical-analysis.py. Αυτό είναι ένα εργαλείο σε γλώσσα python για την ανάλυση των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας και διατίθεται ελεύθερα στο GitHub από την ερευνητική ομάδα του Δρ. David L. Mobley [33]. Η εκτίμηση της διαφοράς της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό του γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1 για το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη και του προσδέτη σε διαλύτη έγινε με τη μέθοδο MBAR. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στη συνέχεια (Πίνακας 2).

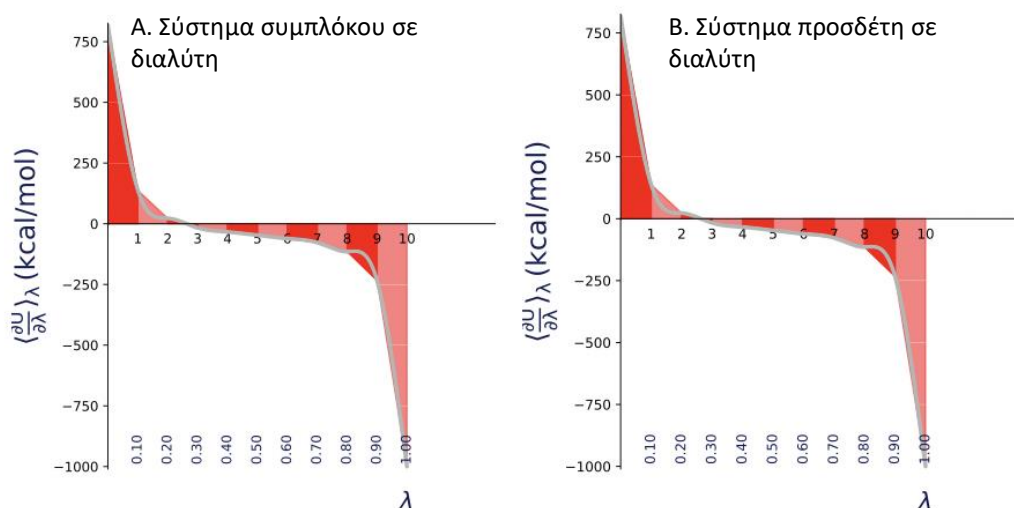
Πίνακας 2. Δεδομένα εκτίμησης της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης με τη μέθοδο MBAR.

Σύστημα Προσομοίωσης	Προσδέτης σε διαλύτη	Σύμπλοκο σε διαλύτη
ΔG (kcal/mol)	-56.4 ± 0.0	-53.8 ± 0.1
$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{σύμπλοκο}} - \Delta G_{\text{προσδέτης}} = 2.5 \pm 0.1$ kcal/mol		

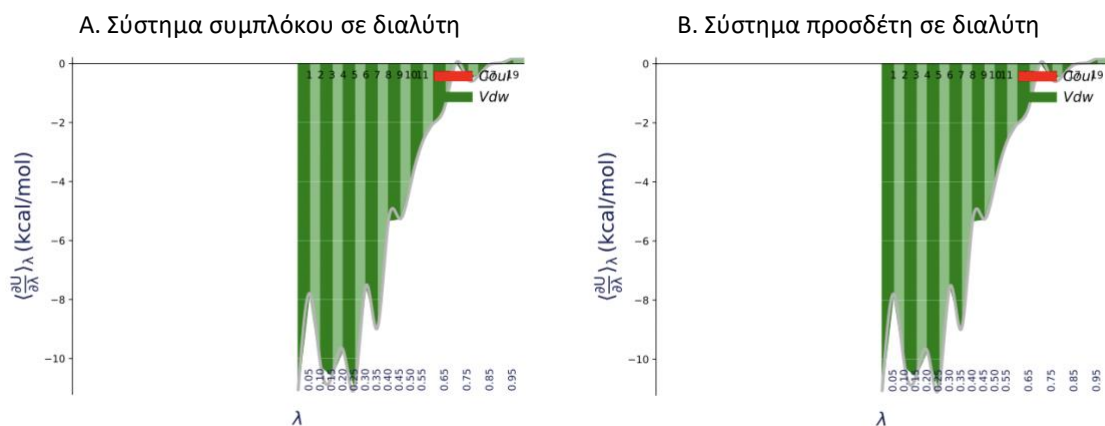
Επομένως, η Σχετική Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης για το μετασχηματισμό γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1 βρέθηκε ίση με $\Delta\Delta G = 2.5 \pm 0.1$ kcal/mol.

Ο ίδιος μετασχηματισμός έχει πραγματοποιηθεί παλαιότερα από το εργαστήριο της Δρ. Ζωής Κούρνια. Για το μετασχηματισμό έγινε χρήση πεδίου δυνάμεων OPLS-AA και λογισμικού NAMD 2.14 και η Σχετική Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης για το μετασχηματισμό γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1 βρέθηκε ίση με $\Delta G = 1.0 \pm 0.1$ kcal/mol. Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη το όριο της μεθόδου, το οποίο είναι 1.0 - 1.5 kcal/mol, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το αποτέλεσμα είναι εντός των επιθυμητών ορίων και επομένως η μεθοδολογία έχει επικυρωθεί. Λόγω, όμως, προβλημάτων κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας σε λογισμικό GROMACS 2021, καθώς και απαίτησης μεγάλου χρόνου επίλυσής τους, αποφασίστηκε να μην χρησιμοποιηθεί η ίδια μεθοδολογία στη συνέχεια των υπολογισμών.

Επιπλέον, για τα συστήματα προσδέτη σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη τυπώθηκαν και τα διαγράμματα μέσης τιμής στατιστικού συνόλου της παραγώγου της υπολογισμένης ελεύθερης ενέργειας $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_{\lambda}$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ (Εικόνες 21 και 22). Για λόγους ευκολίας στην παρατήρηση οι τιμές που αφορούν στην μεταβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Coulomb) και οι τιμές που αφορούν της αλληλεπιδράσεις van der Waals τυπώθηκαν ξεχωριστά. Μέσω των διαγραμμάτων αυτών μπορεί να εκτιμηθεί η απαίτηση πυκνότερης σταδιοποίησης σε συγκεκριμένα σημεία κατά την πορεία του μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, στις περιοχές όπου η κλίση της καμπύλης αλλάζει απότομα, ο αριθμός των παραθύρων/τιμών λ που χρησιμοποιούνται χρειάζεται να είναι πιο πυκνός ώστε οι υπολογισμοί να έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια [33]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, στις περιοχές 0-1, 9-10 των αλληλεπιδράσεων Coulomb για το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και του συμπλόκου σε διαλύτη είναι θεμιτή η χρήση πιο πυκνής σταδιοποίησης. Στην περίπτωση της μεταβολής των αλληλεπιδράσεων van der Waals δεν απαιτείται πυκνότερη σταδιοποίηση.



Εικόνα 21. Διαγράμματα $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_{\lambda}$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ για την μεταβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Coulomb). Φαίνεται η περίπτωση του (Α) συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη και (Β) προσδέτη σε διαλύτη.



Εικόνα 22. Διαγράμματα $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_\lambda$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ για την μεταβολή των αλληλεπιδράσεων van der Waals. Φαίνεται η περίπτωση του (Α) συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη και (Β) προσδέτη σε διαλύτη.

3.3. Υπολογισμοί Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας ($\Delta\Delta G$) μεταξύ γλουταμινικού και β -καρβαμιδικού συζευγμένα με τον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA

3.3.1. Εισαγωγή

Ο υπολογισμός της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης ($\Delta\Delta G$) μεταξύ του γλουταμινικού και του β -καρβαμιδικού σε σύζευξη με τον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA πραγματοποιήθηκε μέσω υπολογισμών FEP σε συνδυασμό με προσομοιώσεις MD (FEP/MD) με χρήση του πεδίου δυνάμεων ff14SB/GAFF2 [34] και του λογισμικού AMBER20 [35]. Για το σκοπό αυτό η δομή που χρησιμοποιήθηκε είναι η αλυσίδα A της κρυσταλλικής δομής της περιοχής πρόσδεσης του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA σε σύζευξη με τον φυσικό αγωνιστή του, γλουταμινικό ιόν. Για τις ανάγκες των υπολογισμών έγιναν προσομοιώσεις για το μετασχηματισμό του γλουταμινικού σε β -καρβαμιδικό σε διαλύτη και σε σύζευξη με τον υποδοχέα σε διαλύτη, σύμφωνα με τον θερμοδυναμικό κύκλο που περιγράφηκε προηγουμένα (Εικόνα 18). Επιπλέον, για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τα ενδιάμεσα μόρια που περιγράφηκαν προηγουμένα (Εικόνα 19).

3.3.2. Προετοιμασία των συστημάτων και παράμετροι προσομοιώσεων

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία της πρωτεϊνικής δομής με χρήση του εργαλείου Protein Preparation Wizard, του Schrödinger [26-27]. Η διαδικασία αυτή, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι απαραίτητη ώστε να διορθωθούν τυχόν κενά που πιθανόν υπάρχουν στην κρυσταλλική δομή, να αφαιρεθούν τα κρυσταλλικά νερά και να ελαχιστοποιηθεί η ενέργεια του συστήματος. Δηλαδή, ο σκοπός είναι να βρεθεί η πιο ρεαλιστική δομή του συστήματος. Έπειτα από το στάδιο της προετοιμασίας της δομής έγινε εξαγωγή του pdb αρχείου της πρωτεΐνης και του pdb αρχείου του γλουταμινικού, ξεχωριστά. Στη συνέχεια, έγινε σχεδιασμός της δομής του ενδιάμεσου-1, του β -καρβαμιδικού και του ενδιάμεσου-2 (Εικόνα 19) στο Maestro

βάση της δομής του γλουταμινικού. Όλες οι δομές εξάχθηκαν σε μορφή pdb για τις ανάγκες των επόμενων βημάτων.

Ακολούθησε η παραμετροποίηση των προσδετών με χρήση του υπολογιστικού πακέτου Antechamber [36] στο πεδίο δυνάμεων GAFF2 (General AMBER Force Field 2), που χρησιμοποιείται για την παραμετροποίηση μικρών μορίων και είναι συμβατό με τα πεδία δυνάμεων πρωτεϊνών του AMBER [34]. Στη συνέχεια, έγινε συνένωση των αρχείων παραμέτρων των μορίων, ώστε να βρεθούν τα άτομα που θα μεταβληθούν κατά το μετασχηματισμό και να σημειωθούν στα αρχεία παραμέτρων. Στην περίπτωση των προσομοιώσεων του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη απαιτείται η δημιουργία συνολικού αρχείου παραμέτρων.

Το σύμπλεγμα προσδέτη-πρωτεΐνης για καθένα από τα αντίστοιχα μόρια προσδετών κατασκευάστηκε μέσω του Maestro. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αρχείο pdb της πρωτεΐνης, έχοντας προηγούμενα αφαιρέσει τα άτομα υδρογόνου.

Τα αρχεία εισόδου για τους υπολογισμούς Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης μέσω του AMBER20 για το κάθε σύστημα, δημιουργήθηκαν αυτόματα με χρήση του υπολογιστικού πακέτου AMBER-DD Boost [37]. Το κάθε σύστημα (προσδέτη σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη) ενυδατώθηκε σε κυβικό κουτί με ίδιο αριθμό μορίων νερού. Η ενυδάτωση έγινε χρησιμοποιώντας μόρια νερού TIP4PEW. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα απαραίτητα ιόντα νατρίου και χλωρίου συγκέντρωσης 0.15 M, ώστε να γίνει ουδετεροποίηση του συστήματος. Προστέθηκε ο ίδιος αριθμός ιόντων και στα δύο συστήματα.

Το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη αποτελείται από τον υποδοχέα, ένα ιόν ψευδαργύρου, ένα μόριο προσδέτη, 17869 μόρια διαλύτη, 50 ιόντα νατρίου και 54 ιόντα χλωρίου. Συνολικά, το σύστημα του συμπλόκου αποτελείται από 75689 άτομα με μικρές διαφοροποιήσεις ανάλογα με το μέγεθος του προσδέτη. Αντίστοιχα, το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη αποτελείται συνολικά από ένα μόριο προσδέτη, 17869 μόρια διαλύτη, 50 ιόντα νατρίου και 54 ιόντα χλωρίου. Συνολικά, το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη αποτελείται από 53728 άτομα με μικρές διαφοροποιήσεις ανάλογα με το μέγεθος του προσδέτη.

Για τον υπολογισμό της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης μεταξύ γλουταμινικού και β-καρβαμιδικού πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μετασχηματισμού του γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1, του ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμιδικό, του β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2 και του ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό. Για το κάθε σύστημα η διαδικασία αυτή έγινε τόσο σε σύστημα προσδέτη σε διαλύτη, όσο και σε σύστημα όπου οι προσδέτες βρίσκονται σε σύζευξη με τον υποδοχέα. Για το σκοπό αυτό το κάθε βήμα που περιγράφεται στη συνέχεια αναφέρεται τόσο στην περίπτωση του συστήματος προσδέτη σε διαλύτη, όσο και στην περίπτωση του συμπλόκου σε διαλύτη. Για όλες τις προσομοιώσεις χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων ff14SB/GAFF2 και το λογισμικό AMBER20. Επιπλέον, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τρία αντίγραφα, ώστε να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των υπολογισμών.

Πραγματοποιήθηκαν δύο φάσεις ελαχιστοποίησης της ενέργειας για τα συστήματα των σταδίων $\lambda=0$ και $\lambda=1$. Στο πρώτο στάδιο ελαχιστοποίησης της ενέργειας χρησιμοποιήθηκαν 5000 κύκλοι ελαχιστοποίησης μέσω του αλγορίθμου απότομης κατάβασης/καθόδου/κλίσης (steepest descent). Επιπλέον, στο στάδιο αυτό εφαρμόστηκαν περιορισμοί αρμονικού ελατηρίου (harmonic restraints) για τον περιορισμό στην κίνηση των ατόμων της πρωτεΐνης και του προσδέτη, με σταθερά ελατηρίου $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Στο δεύτερο στάδιο ελαχιστοποίησης της ενέργειας χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, 5000 κύκλοι ελαχιστοποίησης και ο αλγόριθμος απότομης κατάβασης/καθόδου/κλίσης (steepest descent). Στο στάδιο αυτό δεν έγινε χρήση περιορισμών κίνησης ατόμων.

Στη συνέχεια, για τα συστήματα των σταδίων $\lambda=0$ και $\lambda=1$, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση σε κανονικό (NVT) στατιστικό σύνολο για την θέρμανση του διαλύτη από τους 0 K στους 600 K και, έπειτα, την σταθεροποίηση του συστήματος στους 310 K. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν περιορισμοί αρμονικού ελατηρίου (harmonic restraints) για τον περιορισμό στην κίνηση των ατόμων της πρωτεΐνης και του προσδέτη, με σταθερά ελατηρίου $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Η προσομοίωση αυτή πραγματοποιήθηκε για 4 ns (2000000 βήματα με 2 fs ανά βήμα).

Για την σταδιακή αφαίρεση των περιορισμών στην κίνηση του προσδέτη και της πρωτεΐνης, πραγματοποιούνται προσομοιώσεις σε ισόθερμο-ισοβαρές (NPT) στατιστικό σύνολο κατά τις οποίες η σταθερά του ελατηρίου μειώνεται σταδιακά. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται προσομοιώσεις με σταθερές 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1 και 0 $\text{kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Για τη ρύθμιση της πίεσης σε 1 bar χρησιμοποιείται βαροστάτης Monte-Carlo [38]. Για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 310 K χρησιμοποιείται δυναμική Langevin με συντελεστή χρόνου 2 ps^{-1} . Η κάθε προσομοίωση πραγματοποιείται για 0.4 ns (200000 βήματα με 2 fs ανά βήμα).

3.3.3. Προσομοιώσεις FEP/MD για την διατάραξη γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό

Για τον υπολογισμό της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης εφαρμόστηκε σταδιοποίηση μέσω της μεταβλητής σύζευξης λ . Για τον κάθε αλχημικό μετασχηματισμό (γλουταμινικό σε ενδιάμεσο-1, ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο-2, ενδιάμεσο-2 σε γλουταμινικό) (Εικόνα 19) εφαρμόστηκε σταδιοποίηση 25 παραθύρων/τιμών λ για το κάθε σύστημα του κάθε μετασχηματισμού (σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη). Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν τα λ : 0.000000, 0.176834, 0.229764, 0.269379, 0.302697, 0.332290, 0.359436, 0.384886, 0.409130, 0.432518, 0.455318, 0.477748, 0.500000, 0.522252, 0.544682, 0.567482, 0.590870, 0.615114, 0.640564, 0.667710, 0.697303, 0.730621, 0.770236, 0.823166, 1.000000. Η ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων φορτίων (Coulomb) και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (van der Waals) έγινε παράλληλα. Για κάθε παράθυρο/τιμή λ πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας, εξισορρόπηση του συστήματος σε NVT και NPT

στατιστικό σύνολο και τελικά προσομοίωση μοριακής δυναμικής για συλλογή δεδομένων προς ανάλυση.

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας για το κάθε παράθυρο/τιμή λ πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 5000 κύκλους ελαχιστοποίησης και αλγόριθμο απότομης κατάβασης/καθόδου/κλίσης (steepest descent).

Η NVT εξισορρόπηση πραγματοποιήθηκε για 1 ns (500000 βήματα με 2 fs ανά βήμα). Η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 310 K και για τη ρύθμισή της χρησιμοποιήθηκε δυναμική Langevin με συντελεστή χρόνου 2 ps^{-1} . Η NPT εξισορρόπηση πραγματοποιήθηκε για 4 ns (2000000 βήματα με 2 fs ανά βήμα). Για τη ρύθμιση της πίεσης σε 1 bar έγινε χρήση βαροστάτη Monte-Carlo.

Τελικά, για κάθε παράθυρο/τιμή λ πραγματοποιήθηκε προσομοίωση μοριακής δυναμικής για 10 ns (5000000 βήματα με 2 fs ανά βήμα) σε ισόθερμο-ισοβαρές (NPT) στατιστικό σύνολο. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε βαροστάτης Monte-Carlo για τη ρύθμιση της πίεσης σε 1 bar. Για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 310 K χρησιμοποιήθηκε δυναμική Langevin με συντελεστή χρόνου 2 ps^{-1} . Επιπλέον, η δειγματοληψία έγινε με χρήση της τεχνικής replica exchange. Συγκεκριμένα, η δειγματοληψία έγινε έτσι ώστε κάθε 100 βήματα να πραγματοποιείται τυχαία αλλαγή μεταξύ των θέσεων (positions) γειτονικών καταστάσεων σταδιοποίησης λ .

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τρία αντίγραφα (replicas), ώστε να παρατηρηθεί η επαναληψιμότητα των υπολογισμών.

Όπως αναφέρθηκε, για κάθε μετασχηματισμό (γλουταμινικό σε ενδιάμεσο-1, ενδιάμεσο-1 σε β -καρβαμινικό, β -καρβαμινικό σε ενδιάμεσο-2, ενδιάμεσο-2 σε γλουταμινικό) πραγματοποιήθηκε σταδιοποίηση 25 παραθύρων λ για καθένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε προσομοίωση μοριακής δυναμικής για 10 ns. Οι απαιτήσεις σε CPUs και GPUs για κάθε μετασχηματισμό παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 για κάθε σύστημα προσομοίωσης (προσδέτης σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη).

Πίνακας 3. Υπολογιστικές απαιτήσεις για κάθε μετασχηματισμό για τα συστήματα προσδέτη σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη.

Σύστημα Προσομοίωσης	Αριθμός ατόμων	CPUs	GPUs	Χρόνος (h/μετασχηματισμός)
Σύμπλοκο σε διαλύτη	75500	224	25	14
Προσδέτης σε διαλύτη	53800	224	25	4

3.3.4. Υπολογισμός του $\Delta\Delta G$ και του σφάλματος κλειστού κύκλου

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο FE-ToolKit [39-40]. Η εκτίμηση της διαφοράς της ελεύθερης ενέργειας για τον κάθε μετασχηματισμό για το σύστημα του συμπλόκου και του διαλύτη έγινε με τη μέθοδο MBAR. Τα αποτελέσματα για το κάθε ένα από τα τρία αντίγραφα καθώς και η μέση τιμή για

καθέναν από τους υπολογισμούς, παρατίθενται στη συνέχεια (Πίνακας 4). Συγκεκριμένα, συνοψίζονται τα αποτελέσματα της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης που προκύπτει από την αφαίρεση $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{σύμπλοκο}} - \Delta G_{\text{προσδέτης}}$ για τον κάθε μετασχηματισμό του κάθε αντιγράφου, καθώς επίσης και η μέση τιμή αυτών. Το σφάλμα στη μέση τιμή υπολογίστηκε ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των σφαλμάτων των επιμέρους τιμών των αντιγράφων.

Πίνακας 4. Δεδομένα εκτίμησης της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης με τη μέθοδο MBAR.

Μετασχηματισμός	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)			Μέση Τιμή (kcal/mol)
	Αριθμός αντιγράφου			
	1	2	3	
Γλουταμινικό → Ενδιάμεσο-1	-0.1 ± 0.0	-0.3 ± 0.0	-0.5 ± 0.0	-0.3 ± 0.0
Ενδιάμεσο-1 → β-καρβαμινικό	-2.5 ± 0.0	-2.4 ± 0.0	-2.5 ± 0.0	-2.4 ± 0.0
β-καρβαμινικό → Ενδιάμεσο-2	0.9 ± 0.0	1.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.0
Ενδιάμεσο-2 → Γλουταμινικό	1.0 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0.0
Συνολικό $\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	-1.8 ± 0.0	-3.1 ± 0.0	-1.5 ± 0.0	-2.1 ± 0.0
Σφάλμα Κλειστού Κύκλου (kcal/mol)	-1.8 ± 0.0	-3.1 ± 0.0	-1.5 ± 0.0	-0.6 ± 0.0

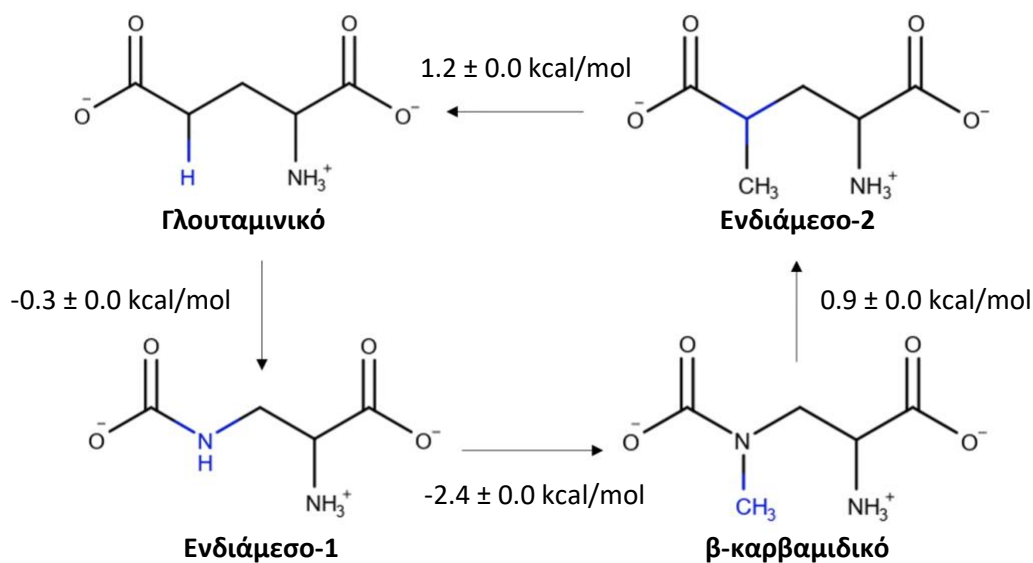
Τα αποτελέσματα Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης για τον κάθε μετασχηματισμό συνοψίζονται στην Εικόνα 23. Η Σχετική Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης για τον μετασχηματισμό γλουταμινικού σε β-καρβαμινικό μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας το ενδιάμεσο-2, ως εξής:

$$\Delta\Delta G = - (0.9 \pm 0.0) - (1.2 \pm 0.0) = -2.1 \pm 0.0 \text{ kcal/mol}$$

Η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ γλουταμινικού και β-καρβαμινικού είναι αρνητική. Αυτό σημαίνει ότι η συγγένεια πρόσδεσης του β-καρβαμινικού παραγώγου του BMAA είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τον φυσικό αγωνιστή του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA, γλουταμινικό. Όμως, όπως ήδη αναφέρθηκε προηγουμένως το όριο της μεθόδου είναι 1.0 - 1.5 kcal/mol. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη το όριο αυτό, βάση της τιμής της Σχετικής Ελεύθερης Ενέργειας Πρόσδεσης που υπολογίστηκε, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το β-καρβαμινικό έχει συγκρίσιμη και μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης από το γλουταμινικό ιόν. Αυτό σημαίνει ότι πιθανόν να συνδέεται στην περιοχή πρόσδεσης του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA με τον ίδιο τρόπο ή και ισχυρότερα.

Ο υπολογισμός της διαφοράς της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ γλουταμινικού και β-καρβαμινικού έχει πραγματοποιηθεί παλαιότερα από το εργαστήριο της Δρ. Ζωής

Κούρνια. Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος θερμοδυναμικός κύκλος και τα ίδια ενδιάμεσα μόρια. Επιπλέον, έγινε χρήση πεδίου δυνάμεων OPLS-AA και λογισμικού NAMD 2.14. Η διαφορά ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης για το μετασχηματισμό γλουταμινικού σε β-καρβαμιδικό βρέθηκε ίση με $\Delta G = -1.6 \pm 0.2$ kcal/mol [5]. Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη το όριο της μεθόδου, το οποίο είναι 1.0 - 1.5 kcal/mol, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι υπολογισμοί της παρούσας μελέτης συμπίπτουν με τους παλαιότερους του εργαστηρίου.



Εικόνα 23. Ο κλειστός κύκλος του γλουταμινικού, ενδιαμέσου-1, β-καρβαμιδικού και του ενδιαμέσου-2. Για κάθε μετασχηματισμό αναγράφεται η Σχετική Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης (ΔG).

Η συνολική ενέργεια του κλειστού κύκλου υπολογίζεται ως το άθροισμα των διαφορών ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης των τεσσάρων μετασχηματισμών (Εικόνα 23).

$$\Delta G = (-0.3 \pm 0.0) + (-2.4 \pm 0.0) + (0.9 \pm 0.0) + (1.2 \pm 0.0) \text{ kcal/mol}$$

$$= -0.6 \pm 0.0 \text{ kcal/mol}$$

Η τιμή αυτή δεν υπερβαίνει το όριο 1.0 - 1.5 kcal/mol και είναι κοντά στο μηδέν, όπως είναι και το επιθυμητό. Δηλαδή, σε κλειστό κύκλο η ενέργεια πρέπει να είναι ίση με μηδέν.

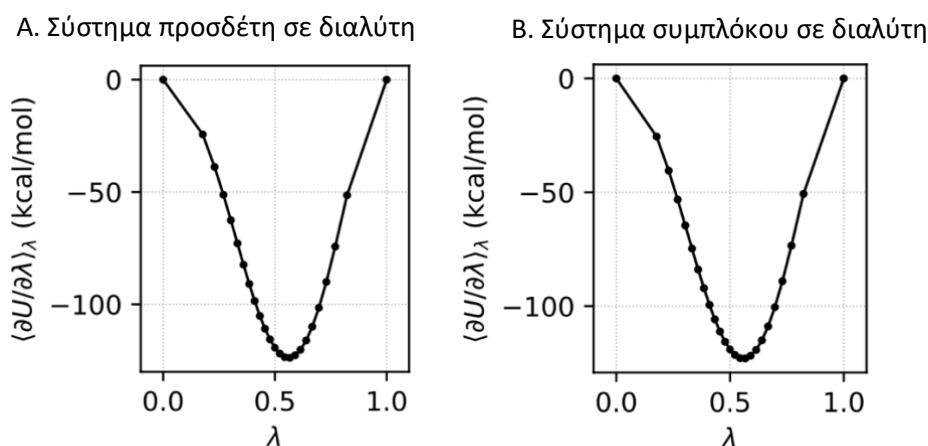
Επιπλέον, για τον έλεγχο επαρκούς σταδιοποίησης των συστημάτων τυπώθηκαν τα διαγράμματα μέσης τιμής στατιστικού συνόλου της παραγωγού της υπολογισμένης ελεύθερης ενέργειας $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_\lambda$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ . Τα διαγράμματα τυπώθηκαν για καθένα μετασχηματισμό (γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό) και για τα τρία αντίγραφα του συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη και

προσδέτη σε διαλύτη. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το αντίγραφο 1 (Εικόνες 24-27), ενώ τα αποτελέσματα για τα αντίγραφα 2 και 3 μπορούν να βρεθούν στο [Παράρτημα 1](#). Η μεταβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Coulomb) και οι τιμές που αφορούν της αλληλεπιδράσεις van der Waals πραγματοποιούνται ταυτοχρόνως.

Μέσω των διαγραμμάτων αυτών μπορεί να εκτιμηθεί η απαίτηση πυκνότερης σταδιοποίησης σε συγκεκριμένα σημεία κατά την πορεία του μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, στις περιοχές όπου η κλίση της καμπύλης αλλάζει απότομα, ο αριθμός των παραθύρων/τιμών λ που χρησιμοποιούνται χρειάζεται να είναι πιο πυκνός ώστε οι υπολογισμοί να έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια [33]. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, παρατηρείται ότι η κλίση της κάθε καμπύλης μεταβάλλεται ομαλά μεταξύ των διαδοχικών παραθύρων/τιμών λ και, επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης σε καμία από τις περιπτώσεις που παρουσιάζονται. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και με παρατήρηση των διαγραμμάτων που σχηματίζονται για τις περιπτώσεις των αντιγράφων 2 και 3.

Πορεία μετατροπής γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1

Η κλίση των καμπυλών της Εικόνας 24 μεταβάλλεται χωρίς να παρατηρούνται απότομες μεταβολές μεταξύ των διαδοχικών τιμών λ . Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης και η επιλογή 25 παραθύρων λ για την μετατροπή γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1 κρίνεται ικανοποιητική.

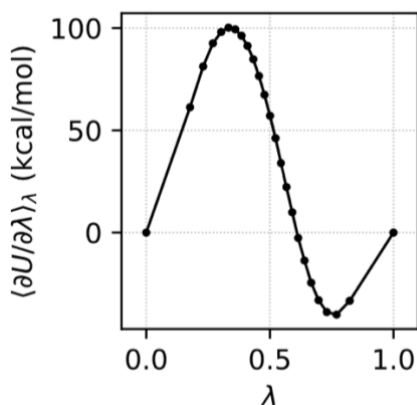


Εικόνα 24. Διαγράμματα $(\frac{\partial U}{\partial \lambda})_\lambda$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ για την περίπτωση (A) συστήματος προσδέτη σε διαλύτη και (B) συμπλόκου σε διαλύτη για τον μετασχηματισμό γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1.

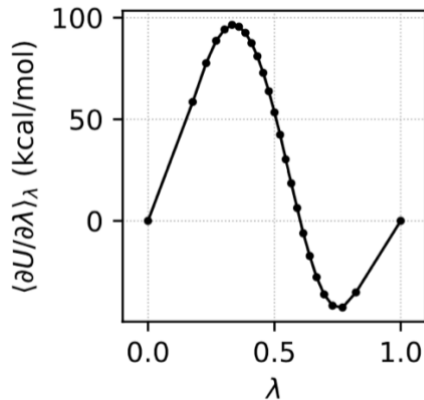
Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β -καρβαμικό

Όμοια, η κλίση των καμπυλών της Εικόνας 25 μεταβάλλεται ομαλά μεταξύ των διαδοχικών τιμών λ . Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης και η επιλογή 25 παραθύρων λ για την μετατροπή ενδιάμεσου-1 σε β -καρβαμικό κρίνεται ικανοποιητική.

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

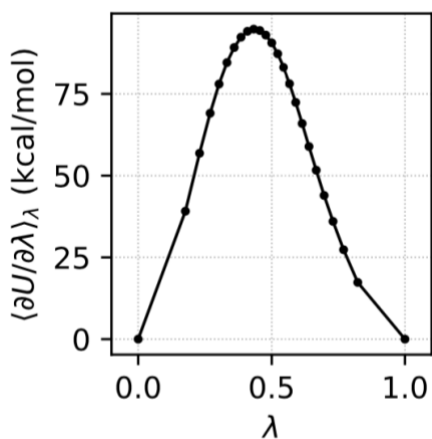


Εικόνα 25. Διαγράμματα $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_{\lambda}$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ για την περίπτωση (A) συστήματος προσδέτη σε διαλύτη και (B) συμπλόκου σε διαλύτη για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμιδικό.

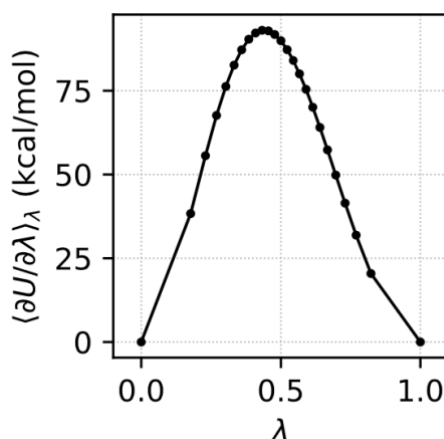
Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

Η κλίση των καμπυλών της Εικόνας 26 μεταβάλλεται ομαλά μεταξύ των διαδοχικών τιμών λ . Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης και η επιλογή 25 παραθύρων λ για την μετατροπή β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2 κρίνεται ικανοποιητική.

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



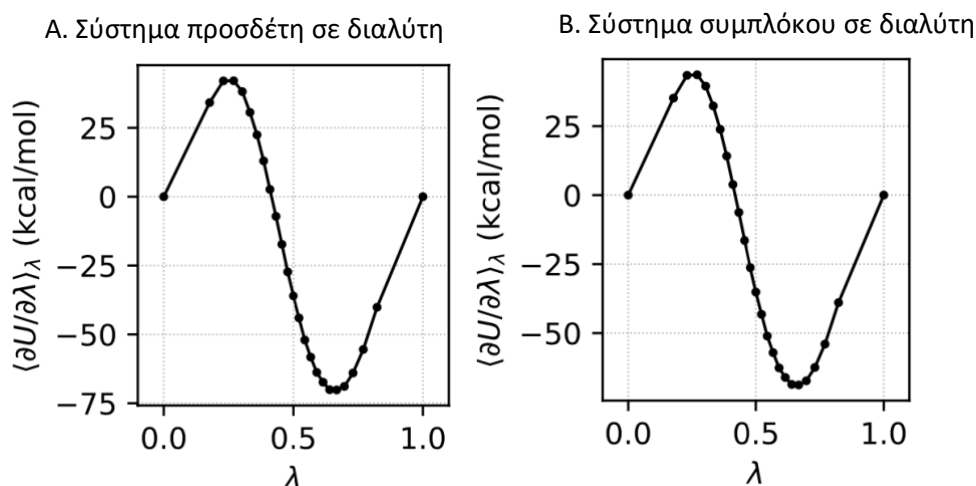
B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



Εικόνα 26. Διαγράμματα $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_{\lambda}$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ για την περίπτωση (A) συστήματος προσδέτη σε διαλύτη και (B) συμπλόκου σε διαλύτη για τον μετασχηματισμό β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2.

Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό

Η κλίση των καμπυλών της Εικόνας 27 μεταβάλλεται ομαλά μεταξύ των διαδοχικών τιμών λ . Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης και η επιλογή 25 παραθύρων λ για την μετατροπή ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν κρίνεται ικανοποιητική.



Εικόνα 27. Διαγράμματα $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_{\lambda}$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ για την περίπτωση (A) συστήματος προσδέτη σε διαλύτη και (B) συμπλόκου σε διαλύτη για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό.

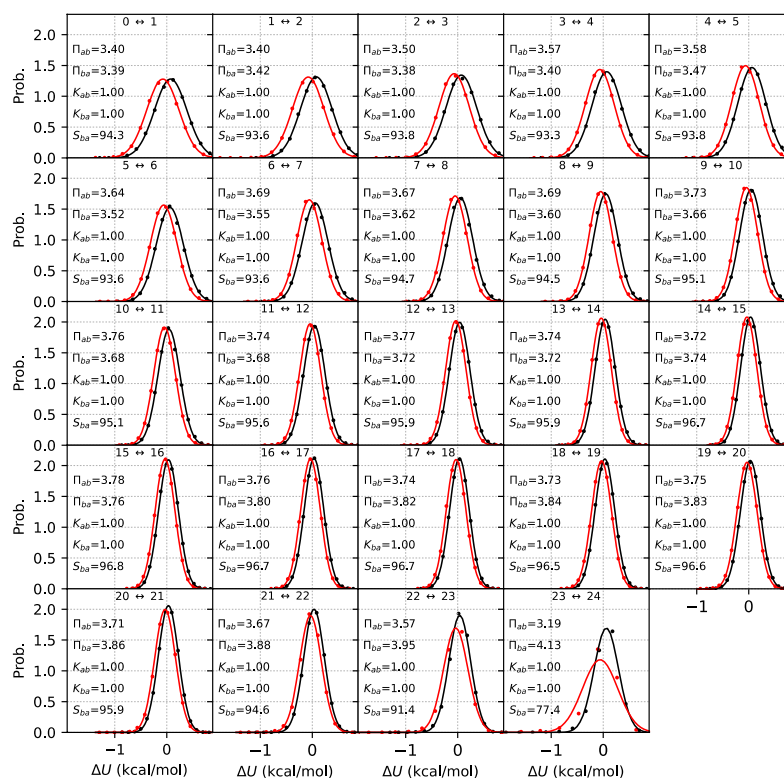
Τα αποτελέσματα αλληλοεπικάλυψης του χώρου των φάσεων μεταξύ της αρχικής και τελικής κατάστασης του συστήματος προσδέτη σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη για καθένα μετασχηματισμό (γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β -καρβαμιδικό, β -καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό) παρουσιάζονται παρακάτω για το αντίγραφο 1 (Εικόνες 28-35). Στις εικόνες παρατηρούνται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για διαδοχικές τιμές λ κάθε μετασχηματισμού και προς τις δύο κατευθύνσεις μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, οι μαύρες καμπύλες αφορούν τον εμπρός (forward) μετασχηματισμό ($\lambda_i \rightarrow \lambda_{i+1}$) και οι κόκκινες τον μετασχηματισμό αντίθετης κατεύθυνσης ($\lambda_{i+1} \rightarrow \lambda_i$) [18]. Επιπλέον, στα διαγράμματα φαίνονται και οι τιμές Π , K και Σ . Η Π ονομάζεται τιμή Wu-Kofke και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της σύγκλισης των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας. Θεωρείται ότι η προσομοίωση έχει επαρκής σύγκλιση όταν η Π είναι μεγαλύτερη της τιμής 0.5 [18]. Η τιμή του K υποδεικνύει ότι οι δύο κατανομές συμπίπτουν όταν $K = 1$. Τελικά, η τιμή Σ δείχνει το ποσοστό αλληλοεπικάλυψης των καμπυλών [18].

Σε κάθε μετασχηματισμό των συστημάτων συμπλόκου και διαλύτη παρατηρείται μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων. Αυτό σημαίνει ότι η επιλογή των ενδιάμεσων μορίων (ενδιάμεσο-1 και ενδιάμεσο-2) καθώς και η επιλογή 25 παραθύρων λ για κάθε διαδοχικό μετασχηματισμό είναι ικανοποιητική. Η μόνη περίπτωση στην οποία χρειάζεται πυκνότερη σταδιοποίηση είναι στην πορεία μετασχηματισμού ενδιάμεσου-1 σε β -καρβαμιδικό και συγκεκριμένα στο πρώτο

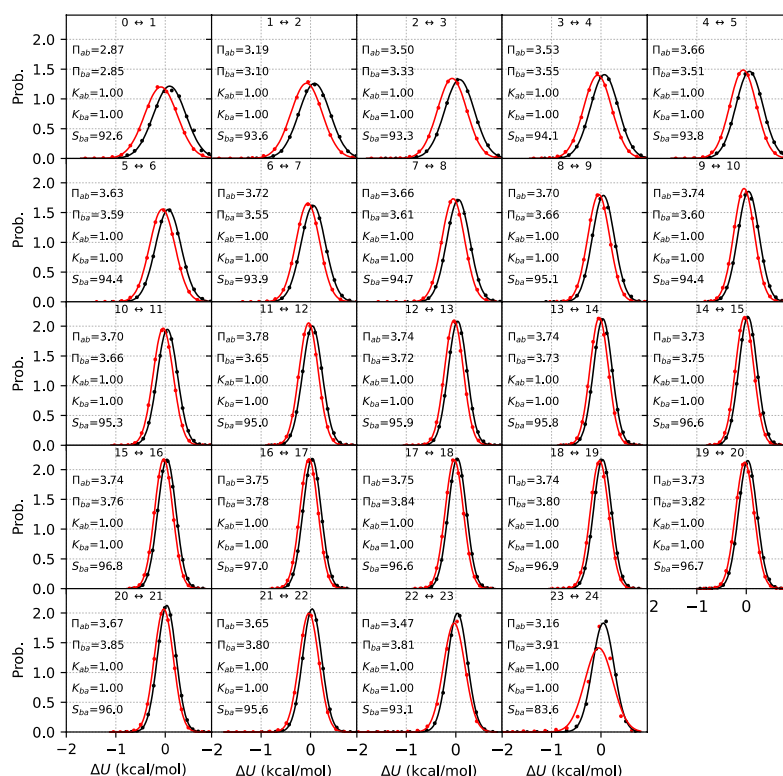
διαδοχικό ζεύγος ($1 \leftrightarrow 2$). Επομένως, συνολικά ο κάθε επιμέρους μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε ομαλά και, άρα, τα αποτελέσματα των υπολογισμών διαφοράς ελεύθερης ενέργειας είναι μεγάλης ακρίβειας. Οι ίδιες παρατηρήσεις προκύπτουν και από τα αποτελέσματα των αντιγράφων 2 και 3, τα οποία μπορούν να βρεθούν στο [Παράρτημα 2](#).

Πορεία μετατροπής γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (Εικόνα 28) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (Εικόνα 29) για την μετατροπή γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι γενικά υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 77.4-96.8% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 83.6-97.0% στο σύστημα συμπλόκου. Επιπλέον, οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($P_{ab} > 0.5$, $P_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).



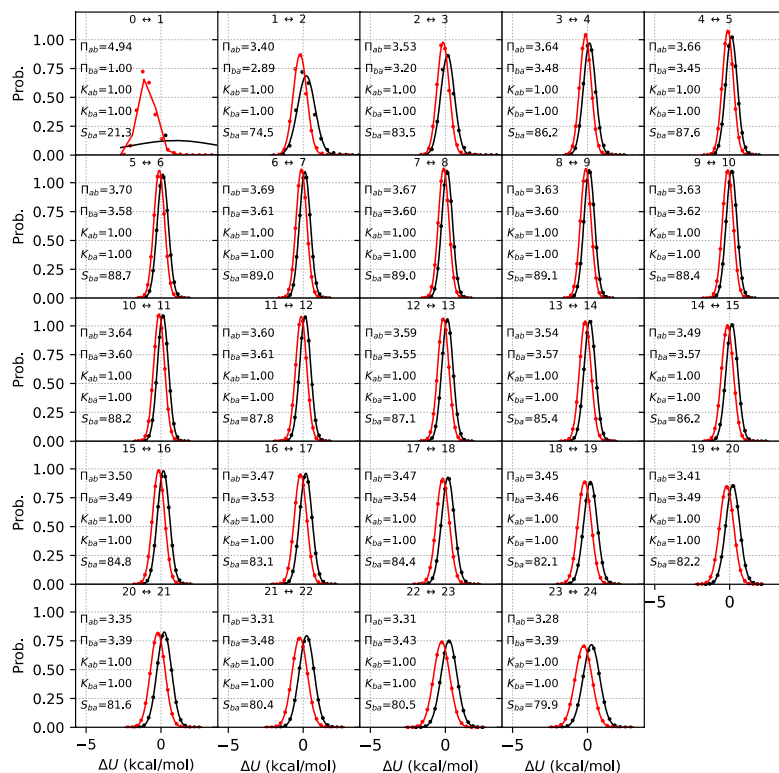
Εικόνα 28. Ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για τις διαδοχικές τιμές λ που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη της μετατροπής γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1.



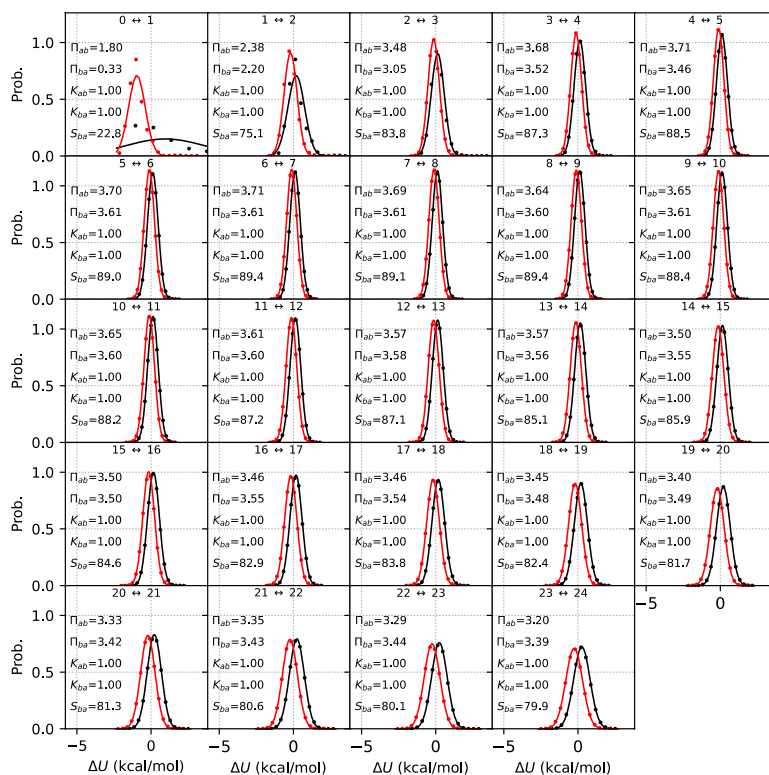
Εικόνα 29. Ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για τις διαδοχικές τιμές λ που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη της μετατροπής γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1.

Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμιδικό

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (Εικόνα 30) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (Εικόνα 31) για την μετατροπή ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμιδικό. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 74.5-89.0% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 75.1-89.4% στο σύστημα συμπλόκου. Η μόνη εξαίρεση εμφανίζεται στην περίπτωση του πρώτου διαδοχικού ζεύγους ($0 \leftrightarrow 1$). Η αλληλεπικάλυψη αυτή είναι σημαντικά μικρότερη από τις υπόλοιπες (21.3% για το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 22.8% για το σύστημα συμπλόκου) και, άρα, στην περιοχή αυτή χρειάζεται πυκνότερη σταδιοποίηση. Μάλιστα, στην περίπτωση του συστήματος συμπλόκου είναι $\Pi_{ba}=0.33$, επομένως η προσομοίωση του ζεύγους $0 \leftrightarrow 1$ δεν είναι επαρκούς σύγκλισης.



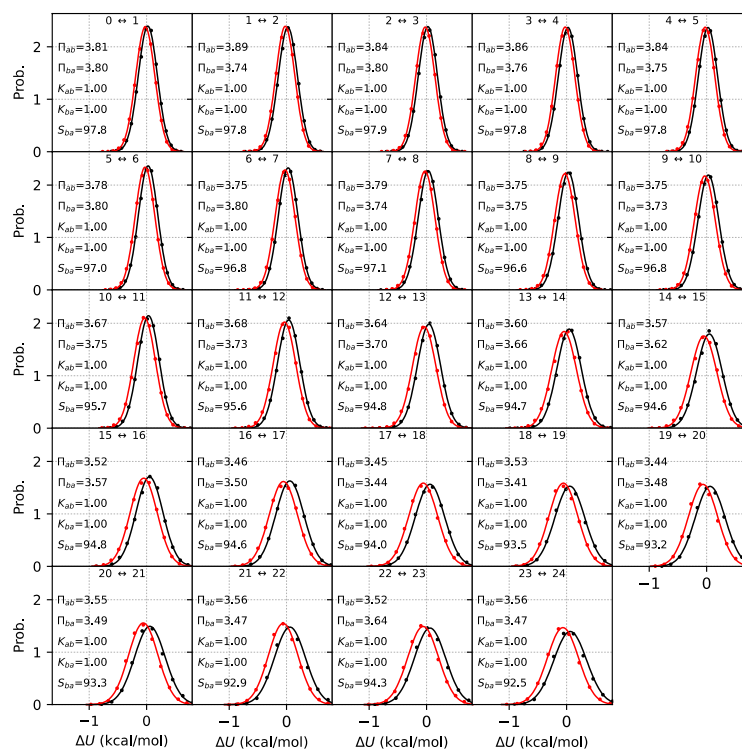
Εικόνα 30. Ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για τις διαδοχικές τιμές λ που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη της μετατροπής ενδιαμέσου-1 σε β-καρβαμικό.



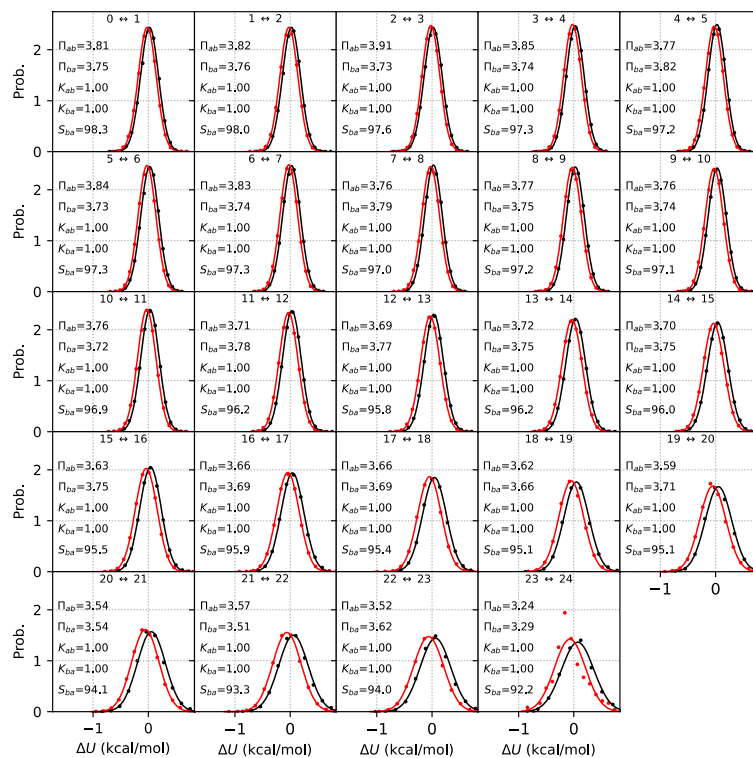
Εικόνα 31. Ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για τις διαδοχικές τιμές λ που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη της μετατροπής ενδιαμέσου-1 σε β-καρβαμικό.

Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (Εικόνα 32) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (Εικόνα 33) για την μετατροπή του β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 92.5-97.8% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 92.2-98.3% στο σύστημα συμπλόκου. Οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($\Pi_{ab} > 0.5$, $\Pi_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).



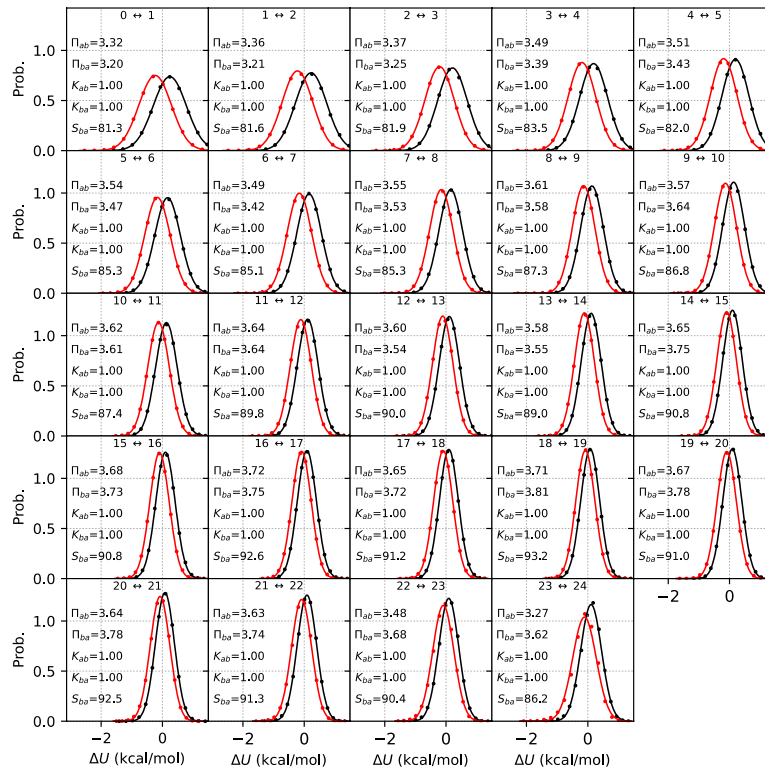
Εικόνα 32. Ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για τις διαδοχικές τιμές λ που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη της μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2.



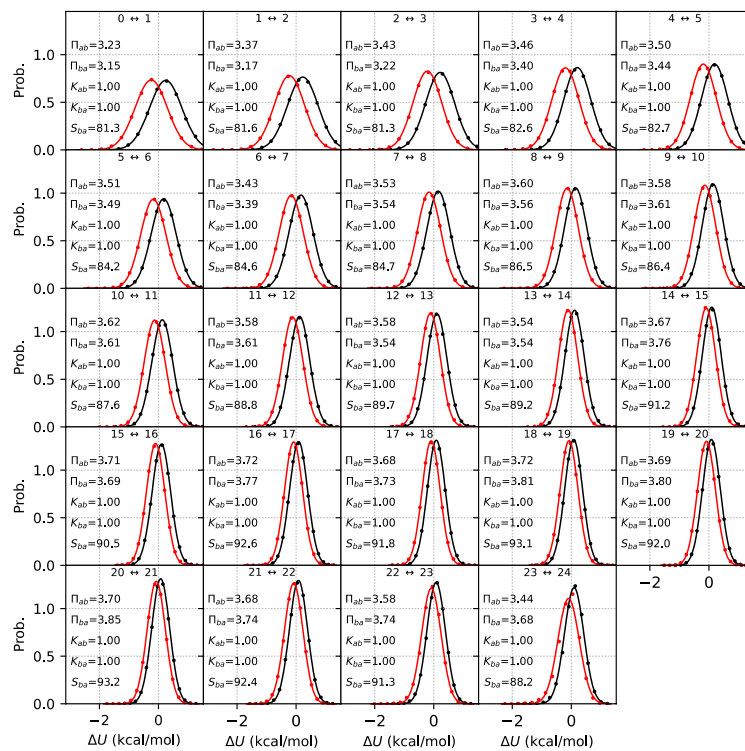
Εικόνα 33. Ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για τις διαδοχικές τιμές λ που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη της μετατροπής β -καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2.

Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (Εικόνα 34) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (Εικόνα 35) για την μετατροπή του ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 81.3-93.2% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 82.6-93.2% στο σύστημα συμπλόκου. Επιπλέον, οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($\Pi_{ab} > 0.5$, $\Pi_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).



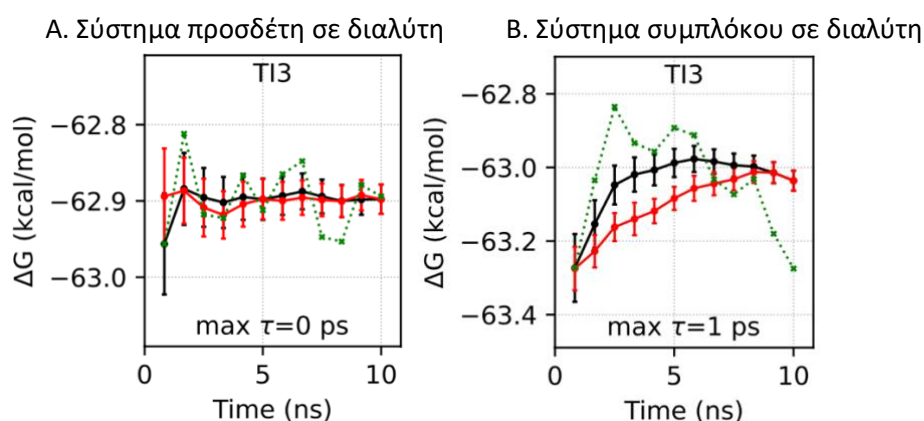
Εικόνα 34. Ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για τις διαδοχικές τιμές λ που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη της μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν.



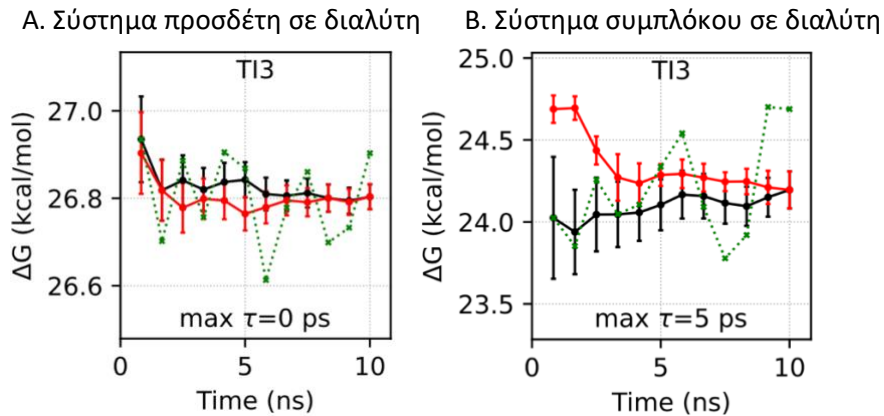
Εικόνα 35. Ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για τις διαδοχικές τιμές λ που χρησιμοποιήθηκαν για το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη της μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν.

Επιπλέον, τυπώθηκαν τα διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για κάθε μετασχηματισμό (γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό) για το αντίγραφο 1 (Εικόνες 36-39). Συγκεκριμένα, στα διαγράμματα η μαύρη καμπύλη αφορά τον εμπρός μετασχηματισμό και η κόκκινη καμπύλη τον μετασχηματισμό αντίθετης κατεύθυνσης. Η πράσινη καμπύλη απεικονίζει την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης για τον εμπρος μετασχηματισμό για κάθε τμηματική χρονοσειρά της προσομοίωσης ξεκινώντας από το χρονικό σημείο $t=0$ με διάστημα κατάτμησης ίσο με 1×10 ns. Το $\max \tau$ αποτελεί το χρόνο αυτοσυσχέτισης της τροχιάς με βάση την Χαμιλτονιανή του συστήματος. Αποτελεί μέτρο χρονικής σύγκλισης των μοριακών δυναμικών, όπου μικρότερο $\max \tau$ δηλώνει ταχύτερη σύγκλιση της προσομοίωσης [41].

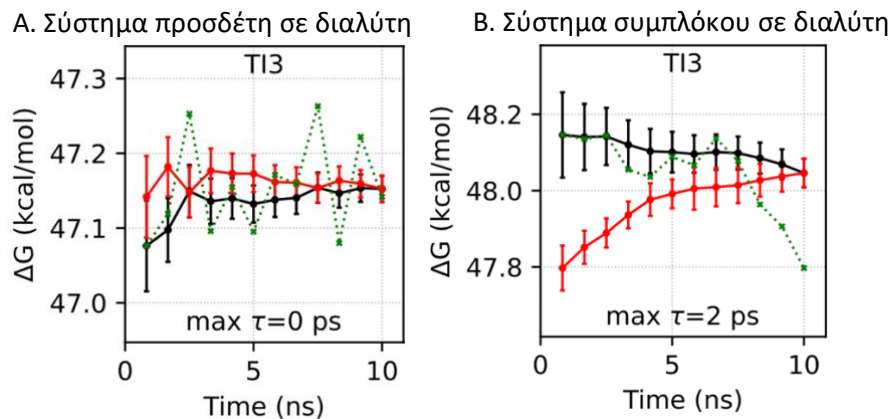
Παρατηρούμε ότι σε κάθε περίπτωση μετασχηματισμού υπάρχει σύγκλιση της ελεύθερης ενέργειας των μετασχηματισμών και των δύο κατευθύνσεων. Όπως είναι λογικό, το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη συγκλίνει ταχύτερα από το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη αφού αποτελείται από μικρότερο αριθμό ατόμων και, άρα, έχει μικρότερο αριθμό βαθμών ελευθερίας. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί από το μέτρο $\max \tau$, το οποίο ισούται με μηδέν σε όλες τις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη, σε αντίθεση με το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη. Τα ίδια συμπεράσματα εξαγονται και έπειτα από παρατήρηση των αντίστοιχων διαγραμμάτων για τους μετασχηματισμούς των αντιγράφων 2 και 3, τα οποία μπορούν να βρεθούν στο [Παράρτημα 3](#).



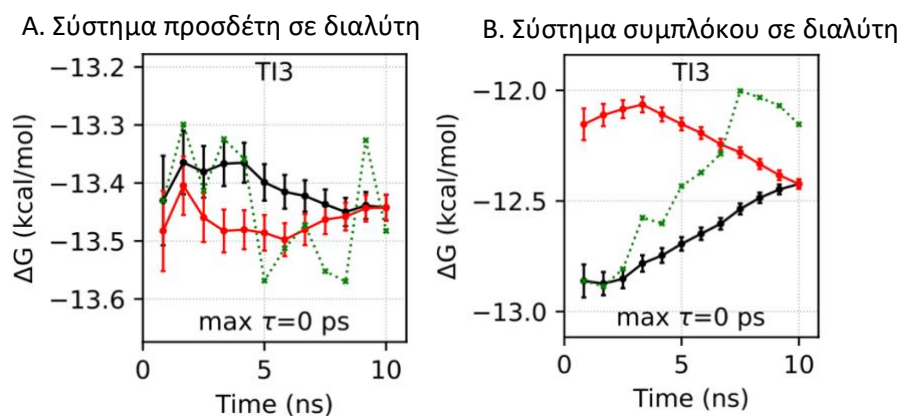
Εικόνα 36. Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1 για (A) το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (γλουταμινικό σε ενδιάμεσο-1) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (ενδιάμεσο-1 σε γλουταμινικό) με κόκκινο.



Εικόνα 37. Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμιδικό για (A) το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμιδικό) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο-1) με κόκκινο.



Εικόνα 38. Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2 για (A) το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο-2) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (ενδιάμεσο-2 σε β-καρβαμιδικό) με κόκκινο.



Εικόνα 39. Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσο-2 σε γλουταμινικό ιόν για (A) το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (ενδιάμεσο-2 σε γλουταμινικό ιόν) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (γλουταμινικό ιόν σε ενδιάμεσο-2) με κόκκινο.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συγγένεια πρόσδεσης της πιθανής νευροτοξίνης β-καρβαμιδικού παραγώγου του ΒΜΑΑ στην περιοχή πρόσδεσης αγωνιστών του γλουταμινικού υποδοχέα AMPA προκειμένου να συγκριθεί με αυτήν του φυσικού αγωνιστή, γλουταμινικού ιόντος. Για το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε συνδυασμό με υπολογισμούς Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας (FEP/MD) προκειμένου να υπολογιστεί η Σχετική Ελεύθερη Ενέργεια Πρόσδεσης μεταξύ του γλουταμινικού ιόντος και του β-καρβαμιδικού παραγώγου στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA.

Η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης μεταξύ γλουταμινικού και β-καρβαμιδικού στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA υπολογίστηκε ίση με -2.1 ± 0.0 kcal/mol. Λαμβάνοντας υπόψη το όριο της μεθόδου FEP/MD (1.0 - 1.5 kcal/mol) και το αρνητικό πρόσημο που προκύπτει στην διαφορά της ενέργειας, συμπεραίνεται ότι το β-καρβαμιδικό παράγωγο του ΒΜΑΑ έχει συγκρίσιμη και μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με το γλουταμινικό ιόν. Αυτό σημαίνει ότι είναι πιθανό να συνδέεται στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA με τον ίδιο τρόπο ή ισχυρότερα από τον φυσικό αγωνιστή του, γλουταμινικό ιόν, και άρα να δρα ως νευροτοξίνη.

Η συνολική ενέργεια κλειστού κύκλου των υπολογισμών βρέθηκε ίση με -0.6 ± 0.0 kcal/mol. Η τιμή αυτή δεν υπερβαίνει το όριο 1.0 – 1.5 kcal/mol της μεθόδου FEP/MD και είναι κοντά στο μηδέν, επομένως επικυρώνεται ότι οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν έχουν μικρό σφάλμα.

Βάσει των διαγραμμάτων μέσης τιμής στατιστικού συνόλου της παραγώγου της υπολογισμένης ελεύθερης ενέργειας $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_\lambda$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ που τυπώθηκαν για το κάθε σύστημα (προσδέτης σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη) και για κάθε πορεία μετασχηματισμού (γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό) προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μετατροπή του γλουταμινικού σε β-καρβαμιδικό έγινε με ομαλό τρόπο. Επομένως, η επιλογή 25 παραθύρων λ για κάθε μία από τις τέσσερις μετατροπές κρίνεται ικανοποιητική και δεν απαιτείται πυκνότερη σταδιοποίηση.

Βάσει των ιστογραμμάτων κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας των διαδοχικών τιμών λ κάθε μετασχηματισμού και κάθε συστήματος (προσδέτη σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη) και αντιγράφου (αντίγραφο 1, 2 και 3) συμπεραίνεται ότι έχει εξασφαλιστεί μεγάλη επικάλυψη μεταξύ των διαμορφωτικών χώρων αρχικής και τελικής κατάστασης σε κάθε περίπτωση. Η μόνη περίπτωση στην οποία χρειάζεται πυκνότερη σταδιοποίηση είναι στο πρώτο διαδοχικό ζεύγος (1 ↔ 2) της πορείας μετασχηματισμού γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1.

Βάσει παρατήρησης των διαγραμμάτων χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας που σχηματίστηκαν για καθένα μετασχηματισμό του κάθε συστήματος (προσδέτη σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη) και για καθένα από τα τρία αντίγραφα προκύπτει

ότι σε κάθε περίπτωση μετασχηματισμού υπάρχει σύγκλιση της ελεύθερης ενέργειας των μετασχηματισμών και των δύο κατευθύνσεων. Όπως είναι λογικό, το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη συγκλίνει ταχύτερα από το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη αφού αποτελείται από μικρότερο αριθμό ατόμων και, άρα, έχει μικρότερο αριθμό βαθμών ελευθερίας.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του σφάλματος κλειστού κύκλου της παρούσας εργασίας με το σφάλμα κλειστού κύκλου προηγούμενης μελέτης που πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο της Δρ. Ζωής Κούρνια για το ίδιο σύστημα με χρήση της μεθόδου NAMD/OPLS-AA (1.1 ± 0.1 kcal/mol) μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η μέθοδος της παρούσας εργασίας (AMBER/ff14SB/GAFF2) δίνει μικρότερο σφάλμα κλειστού κύκλου. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο που απαιτήθηκε για τις προσομοιώσεις σε κάθε περίπτωση μεθόδου, συμπεραίνεται ότι το AMBER έχει πιο εύκολο ροή εργασίας για τους υπολογισμούς διατάραξης ελεύθερης ενέργειας.

5. Μελλοντικές Μελέτες

Όπως ήδη έχει τονιστεί ο μηχανισμός δράσης του ΒΜΑΑ και των καρβαμιδικών παραγώγων του προσδεμένων σε γλουταμινικούς υποδοχείς δεν έχει μελετηθεί έως τώρα. Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματά μας συμβάλουν στην διερεύνηση του συγκεκριμένου θέματος, είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα προκειμένου ο μηχανισμός να γίνει πλήρως κατανοητός.

Επιπλέον, μπορούν να πραγματοποιηθούν προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής σε συνδυασμό με υπολογισμούς Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας προκειμένου να υπολογιστεί η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης του ΒΜΑΑ και του α-καρβαμιδικού παραγώγου του σε σύγκριση με το γλουταμινικό ιόν στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA.

Επιπλέον, επόμενο βήμα αποτελεί και η πραγματοποίηση προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής σε συνδυασμό με υπολογισμούς Απόλυτης Ελεύθερης Ενέργειας πρόσδεσης (π.χ. ΔG_A , Εικόνα 14) προκειμένου να υπολογιστεί η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης του β-καρβαμιδικού αναλόγου του ΒΜΑΑ και του γλουταμινικού ιόντος στον γλουταμινικό υποδοχέα AMPA. Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης του γλουταμινικού ιόντος στον AMPA που θα υπολογιστεί με αυτή τη μέθοδο θα μπορεί να συγκριθεί με ήδη υπάρχοντα πειραματικά [9] και υπολογιστικά [10] αποτελέσματα, που έχουν ήδη αναλυθεί στην παρούσα εργασία, για την επικύρωση της μεθόδου.

Παράρτημα 1

Διαγράμματα μέσης τιμής στατιστικού συνόλου της παραγώγου της υπολογισμένης ελεύθερης ενέργειας $\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \rangle_\lambda$ σε συνάρτηση με τη μεταβλητή σταδιοποίησης λ για καθένα μετασχηματισμό (γλουταμινικό σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β -καρβαμιδικό, β -καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό) για τα τρία αντίγραφα του συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη και προσδέτη σε διαλύτη. Οι μεταβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και των αλληλεπιδράσεων van der Waals γίνονται ταυτοχρόνως.

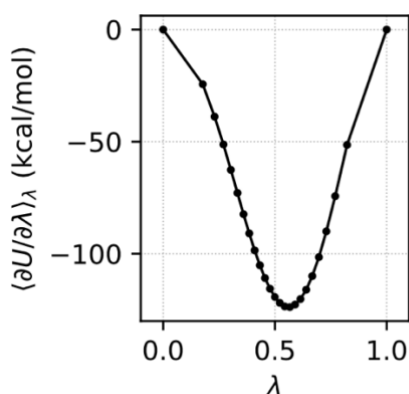
Με παρατήρηση αυτών των διαγραμμάτων για κάθε μετατροπή και για κάθε αντίγραφο εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης σε καμία από τις περιπτώσεις που παρουσιάζονται καθώς η κλίση όλων των καμπυλών μεταβάλλεται ομαλά μεταξύ των διαδοχικών σταδίων λ . Δηλαδή, βάσει των διαγραμμάτων, η επιλογή σταδιοποίησης με χρήση 25 παραθύρων λ σε καθεμιά από τις μετατροπές (γλουταμινικό σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β -καρβαμιδικό, β -καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό) είναι επαρκής.

Αντίγραφο 1

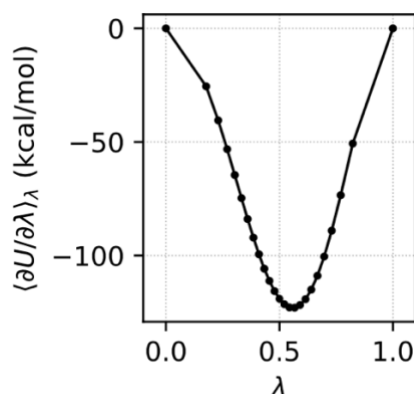
Για καθεμία από τις πορείες μετατροπής του αντιγράφου 1 προκύπτουν τα ίδια συμπεράσματα από τις κλίσεις των καμπυλών. Συγκεκριμένα, η κλίση όλων των καμπυλών για κάθε μετατροπή στο σύστημα του αντιγράφου 1 μεταβάλλεται ομαλά μεταξύ των διαδοχικών τιμών λ . Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης και η επιλογή 25 παραθύρων λ για τις μετατροπές γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β -καρβαμιδικό, β -καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό ιόν, κρίνεται ικανοποιητική.

Πορεία μετατροπής γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη

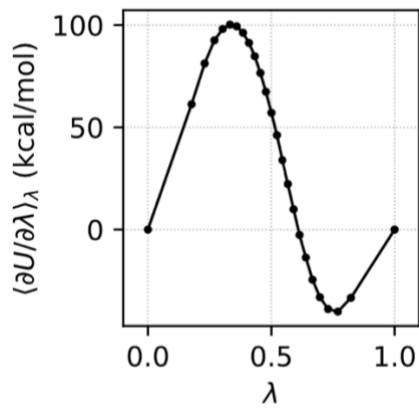


B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

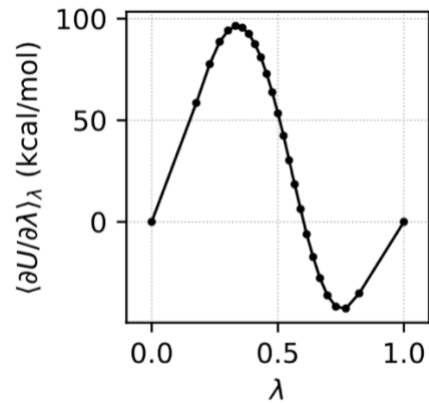


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμιδικό

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη

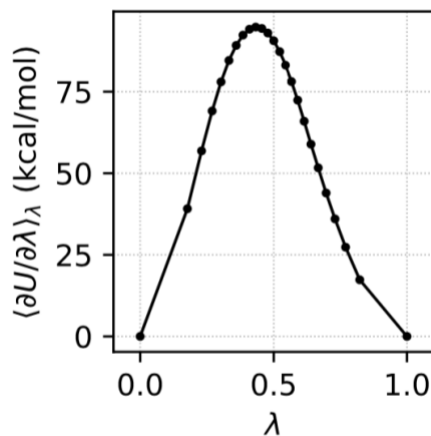


B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

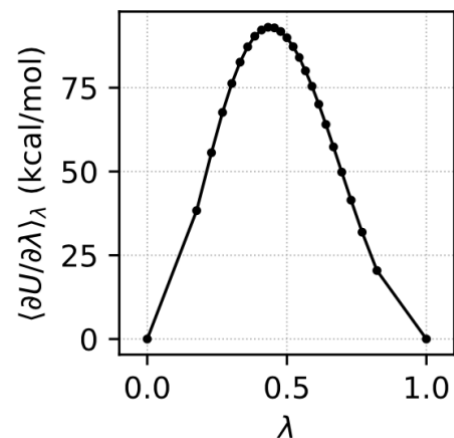


Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη

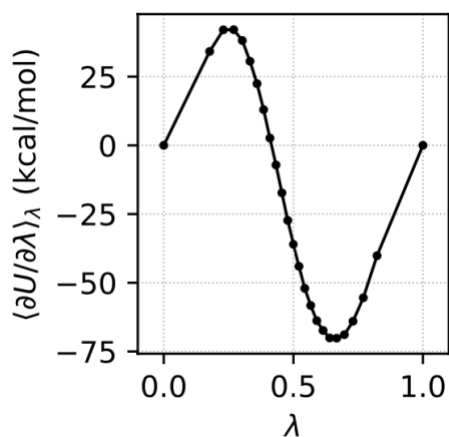


B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

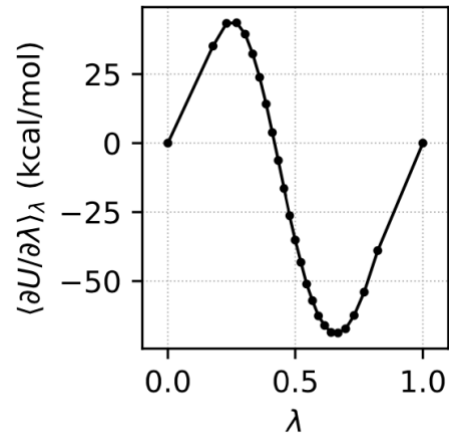


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



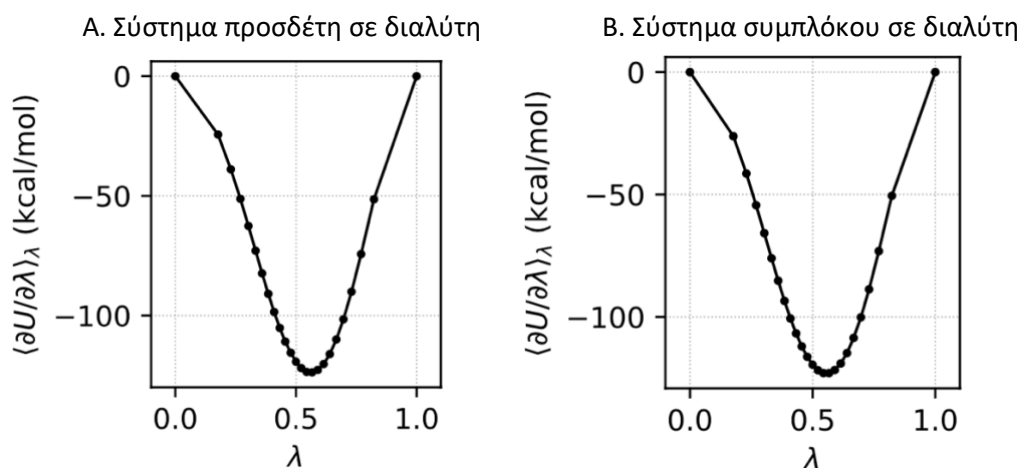
B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



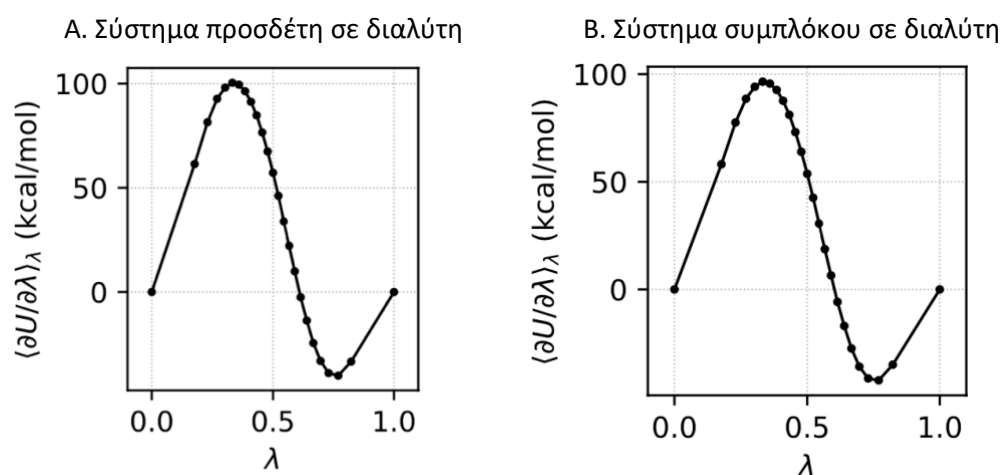
Αντίγραφο 2

Για καθεμία από τις πορείες μετατροπής του αντιγράφου 2 προκύπτουν τα ίδια συμπεράσματα με την περίπτωση του αντιγράφου 1. Συγκεκριμένα, η κλίση όλων των καμπυλών για κάθε μετατροπή στο σύστημα του αντιγράφου 2 μεταβάλλεται ομαλά μεταξύ των διαδοχικών τιμών λ . Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης και η επιλογή 25 παραθύρων λ για τις μετατροπές γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β -καρβαμιδικό, β -καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό ιόν, κρίνεται ικανοποιητική.

Πορεία μετατροπής γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1

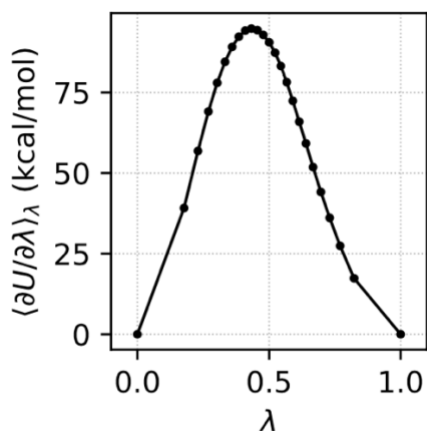


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β -καρβαμιδικό

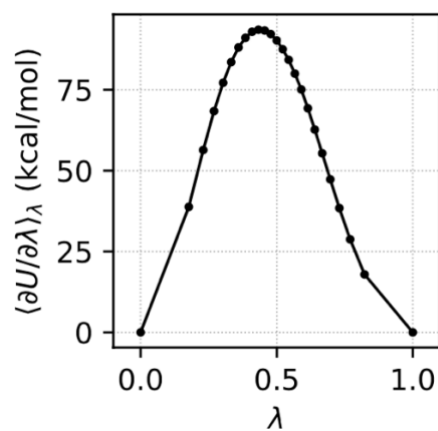


Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη

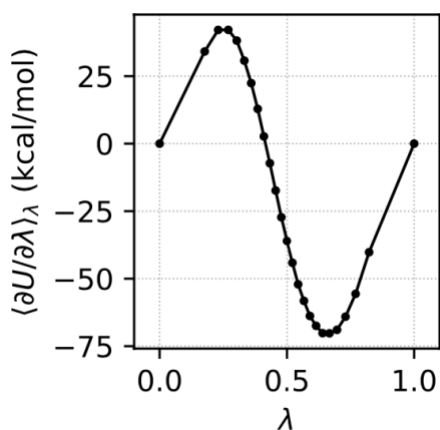


B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

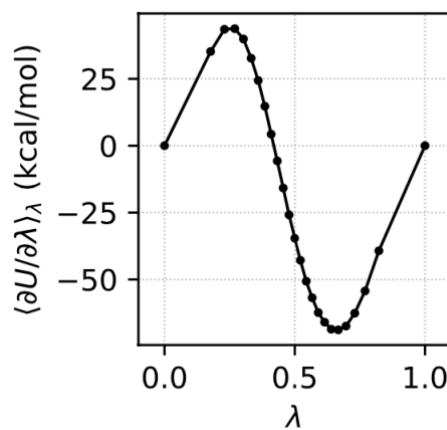


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



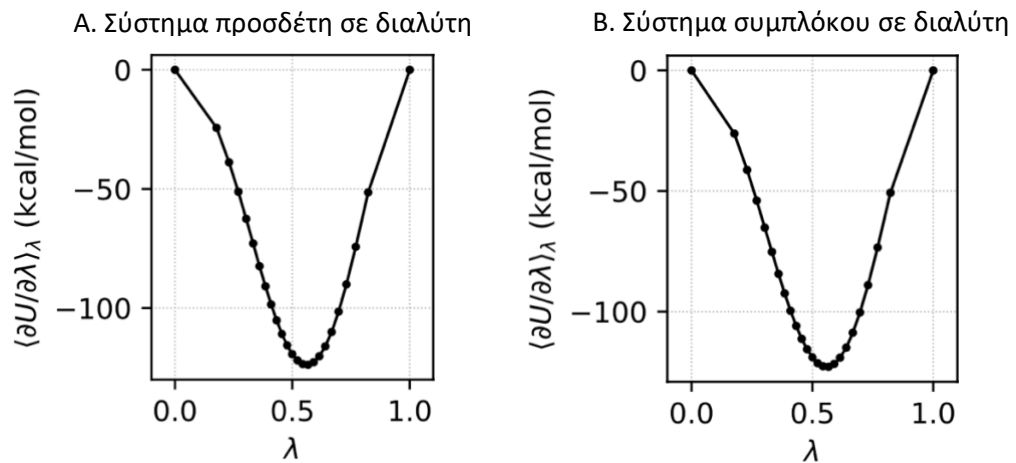
B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



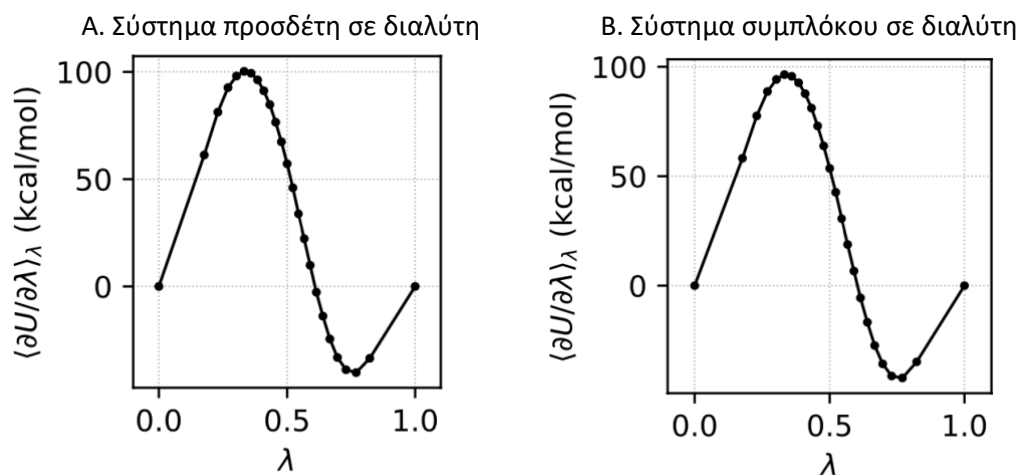
Αντίγραφο 3

Για καθεμία από τις πορείες μετατροπής του αντιγράφου 3 προκύπτουν τα ίδια συμπεράσματα με την περίπτωση του αντιγράφου 1. Συγκεκριμένα, η κλίση όλων των καμπυλών για κάθε μετατροπή στο σύστημα του αντιγράφου 3 μεταβάλλεται ομαλά μεταξύ των διαδοχικών τιμών λ . Επομένως, δεν υπάρχει ανάγκη πυκνότερης σταδιοποίησης και η επιλογή 25 παραθύρων λ για τις μετατροπές γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό ιόν, κρίνεται ικανοποιητική.

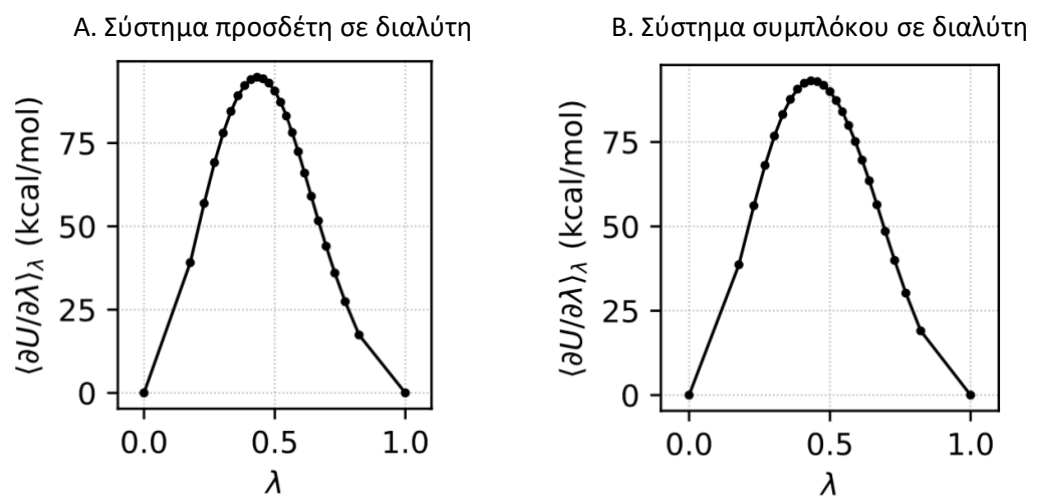
Πορεία μετατροπής γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1



Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμιδικό

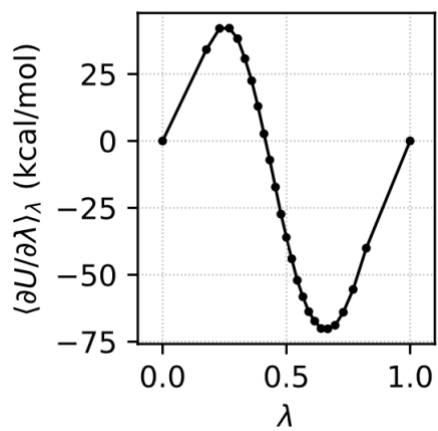


Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

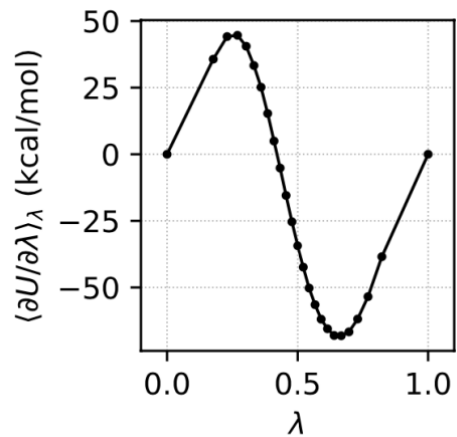


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



Παράρτημα 2

Αποτελέσματα αλληλοεπικάλυψης του χώρου των φάσεων μεταξύ της αρχικής και τελικής κατάστασης του συστήματος προσδέτη σε διαλύτη και συμπλόκου σε διαλύτη για καθένα μετασχηματισμό (γλουταμινικού σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό) για τα αντίγραφα 1, 2 και 3. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας για διαδοχικές τιμές λ κάθε μετασχηματισμού και προς τις δύο κατευθύνσεις μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, οι μαύρες καμπύλες αφορούν τον εμπρός μετασχηματισμό ($\lambda_i \rightarrow \lambda_{i+1}$) και οι κόκκινες τον μετασχηματισμό αντίθετης κατεύθυνσης ($\lambda_{i+1} \rightarrow \lambda_i$) [18]. Επιπλέον, στα διαγράμματα φαίνονται και οι τιμές Π , K και Σ . Η Π ονομάζεται τιμή Wu-Kofke χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της σύγκλισης των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας. Θεωρείται ότι η προσομοίωση είναι επαρκής σύγκλισης όταν η Π είναι μεγαλύτερη της τιμής 0.5 [18]. Η τιμή του K υποδεικνύει ότι οι δύο κατανομές συμπίπτουν όταν $K = 1$. Τελικά, η τιμή Σ δείχνει το ποσοστό αλληλοεπικάλυψης των καμπυλών [18].

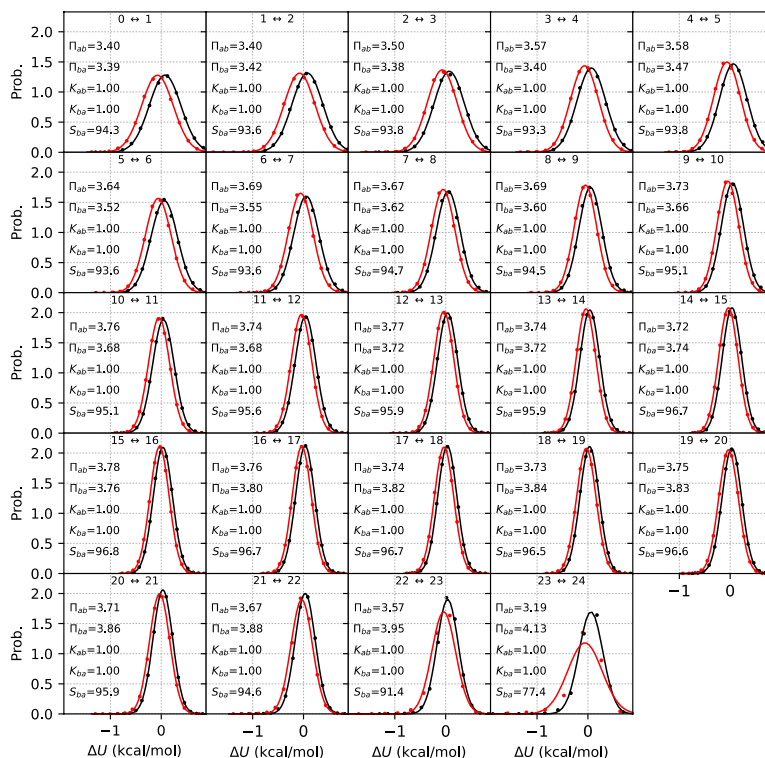
Σε κάθε μετασχηματισμό των συστημάτων συμπλόκου και διαλύτη παρατηρείται μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων. Επομένως, ο κάθε επιμέρους μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε ομαλά και, άρα, τα αποτελέσματα των υπολογισμών διαφοράς ελεύθερης ενέργειας είναι μεγάλης ακρίβειας. Η μόνη περίπτωση στην οποία χρειάζεται πυκνότερη σταδιοποίηση είναι στο πρώτο διαδοχικό ζεύγος ($1 \leftrightarrow 2$) της πορείας μετασχηματισμού ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμιδικό. Αυτό παρατηρείται σε όλα τα αντίγραφα.

Αντίγραφο 1

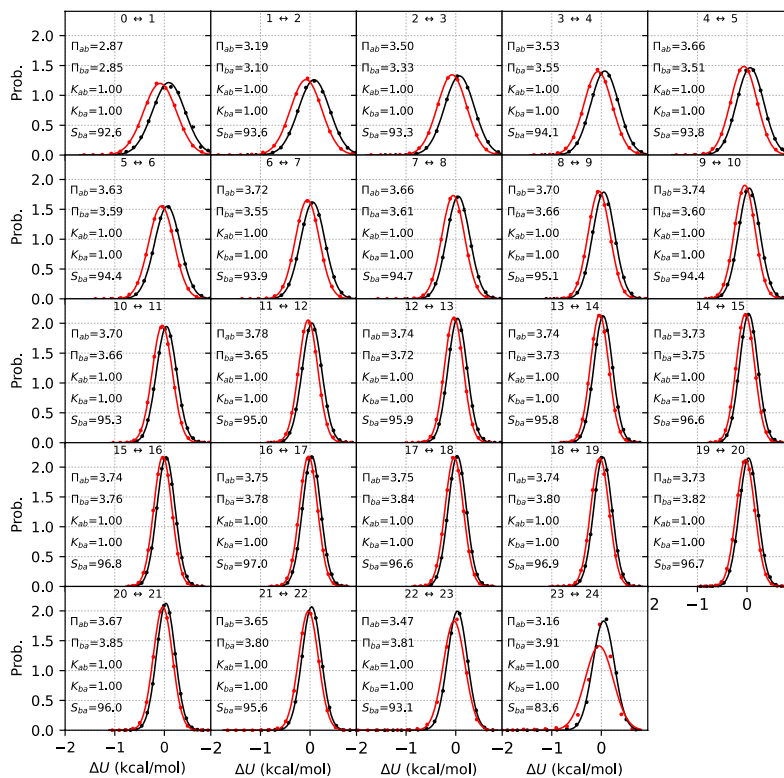
Πορεία μετατροπής γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1 του αντιγράφου 1. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι γενικά υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 77.4-96.8% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 83.6-97.0% στο σύστημα συμπλόκου. Επιπλέον, οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($\Pi_{ab} > 0.5$, $\Pi_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη

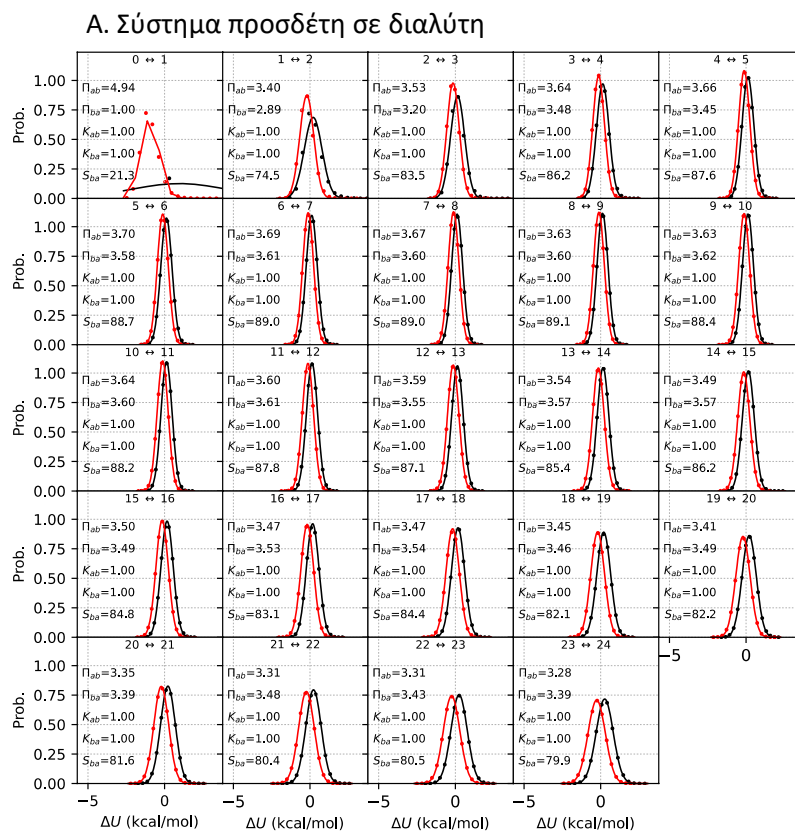


B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

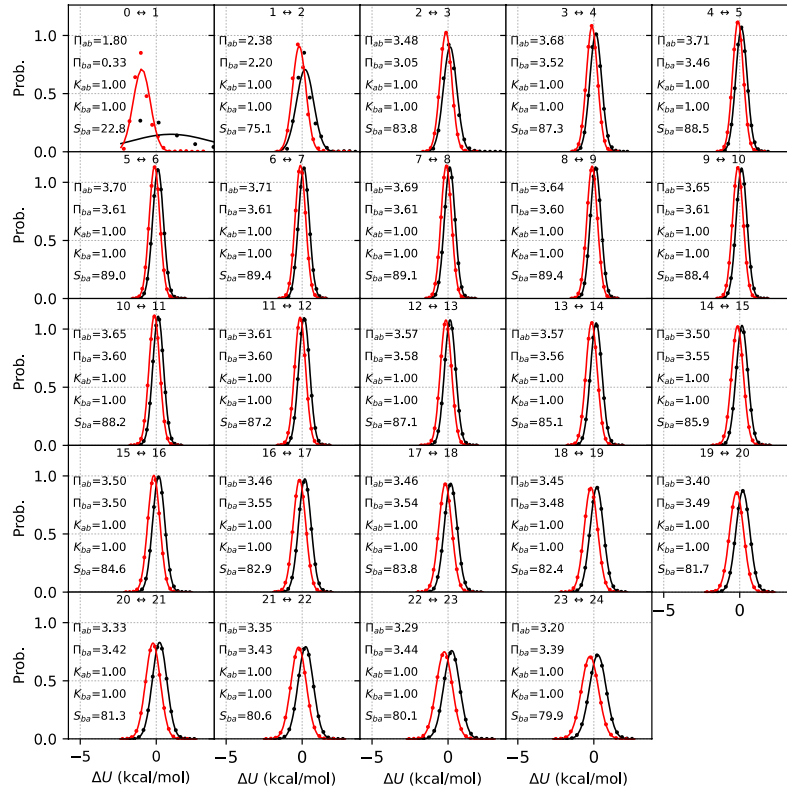


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμικό

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμικό του αντιγράφου 1. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 74.5-89.0% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 75.1-89.4% στο σύστημα συμπλόκου. Η μόνη εξαίρεση εμφανίζεται στην περίπτωση του πρώτου διαδοχικού ζεύγους ($0 \leftrightarrow 1$). Η αλληλεπικάλυψη αυτή είναι σημαντικά μικρότερη από τις υπόλοιπες (21.3% για το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 22.8% για το σύστημα συμπλόκου) και, άρα, στην περιοχή αυτή χρειάζεται πυκνότερη σταδιοποίηση. Μάλιστα, στην περίπτωση του συστήματος συμπλόκου είναι $\Pi_{ba}=0.33$, επομένως η προσομοίωση του ζεύγους $0 \leftrightarrow 1$ δεν είναι επαρκούς σύγκλισης.



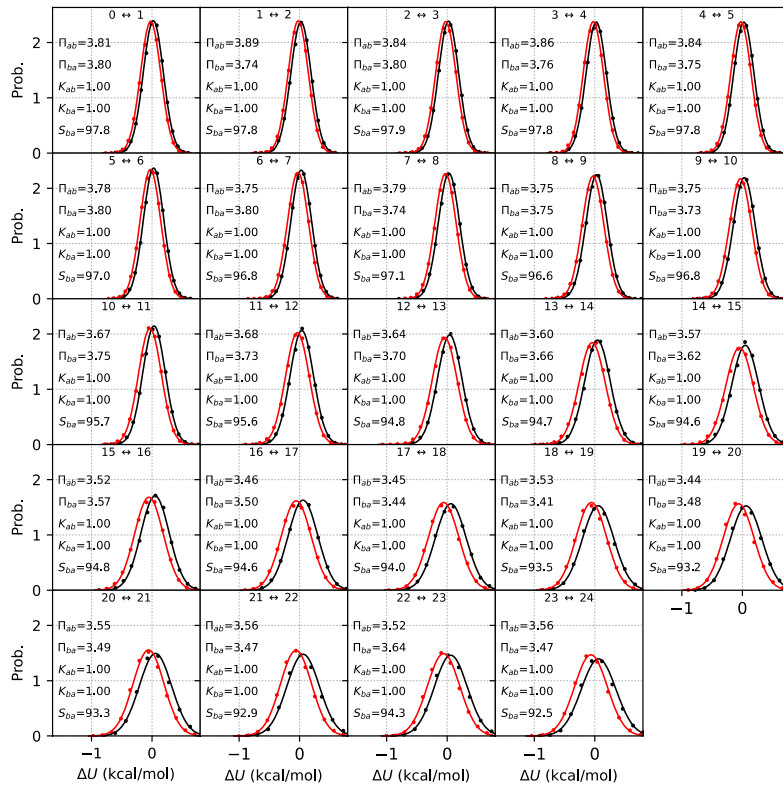
Β. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



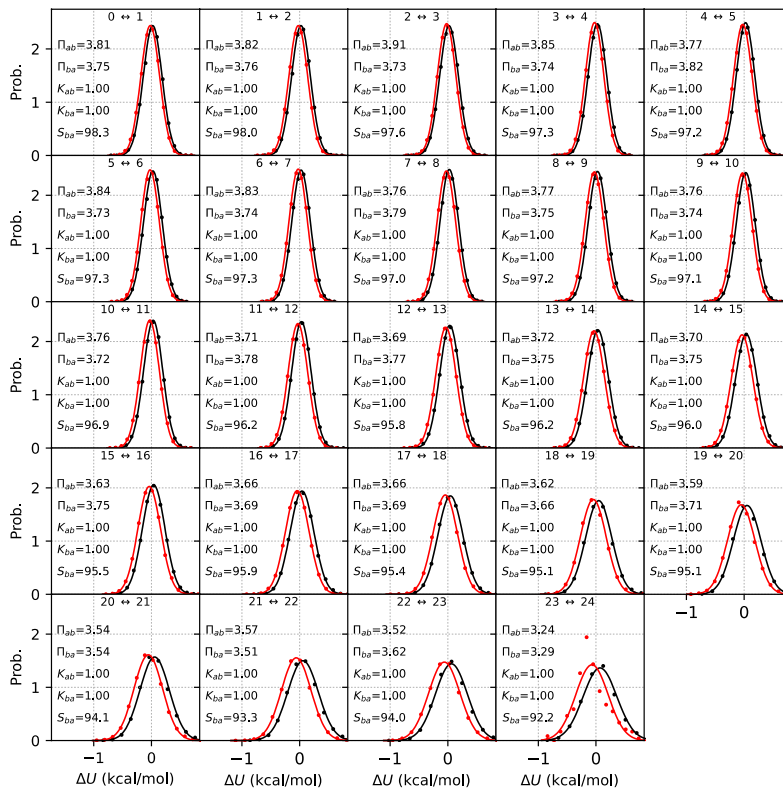
Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (Α) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (Β) για την μετατροπή του β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2 του αντιγράφου 1. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 92.5-97.8% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 92.2-98.3% στο σύστημα συμπλόκου. Οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($\Pi_{ab} > 0.5$, $\Pi_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη

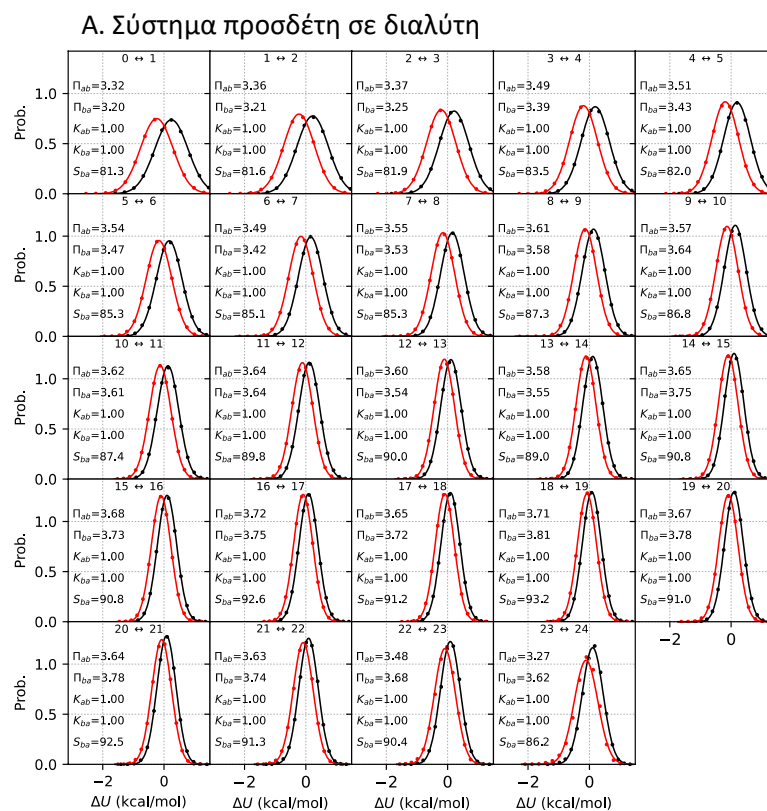


B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

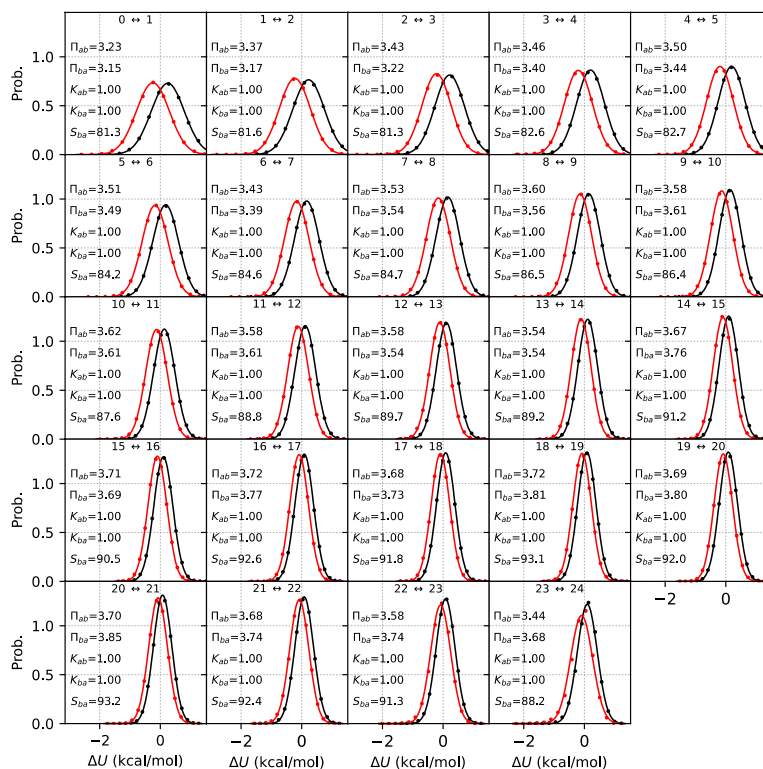


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή του ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν του αντιγράφου 1. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 81.3-93.2% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 82.6-93.2% στο σύστημα συμπλόκου. Επιπλέον, οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($\Pi_{ab} > 0.5$, $\Pi_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).



B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

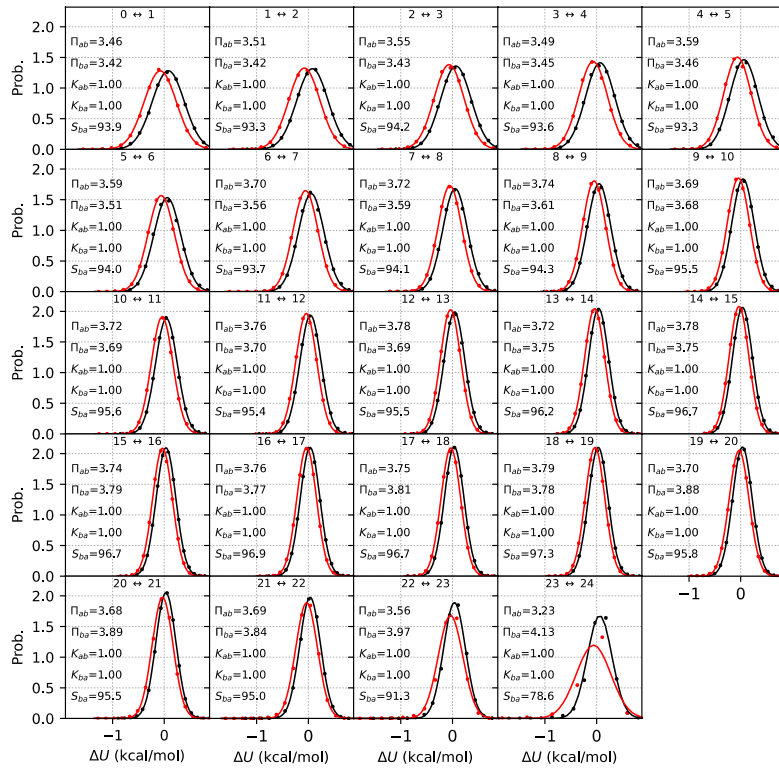


Αντίγραφο 2

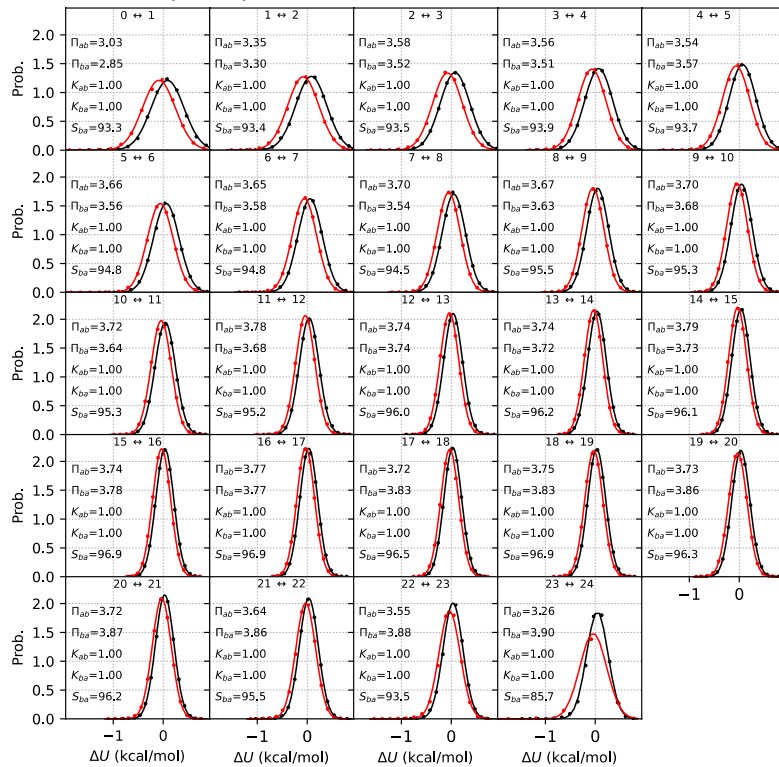
Πορεία μετατροπής γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1 του αντιγράφου 2. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι γενικά υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 78.6-97.3% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 85.7-96.9% στο σύστημα συμπλόκου. Επιπλέον, οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($P_{ab} > 0.5$, $P_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



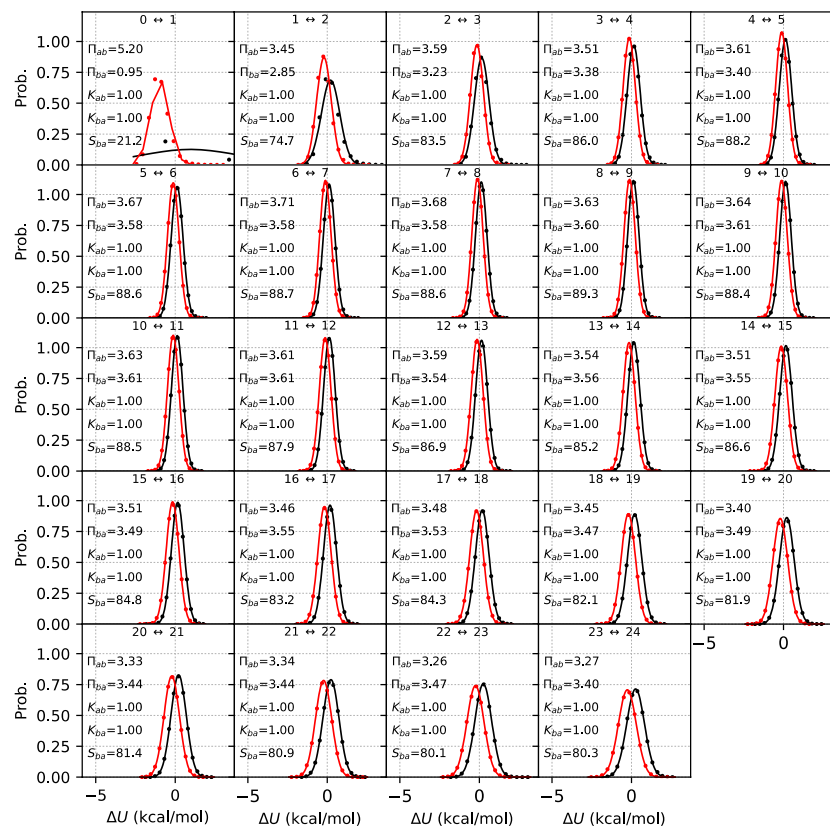
B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



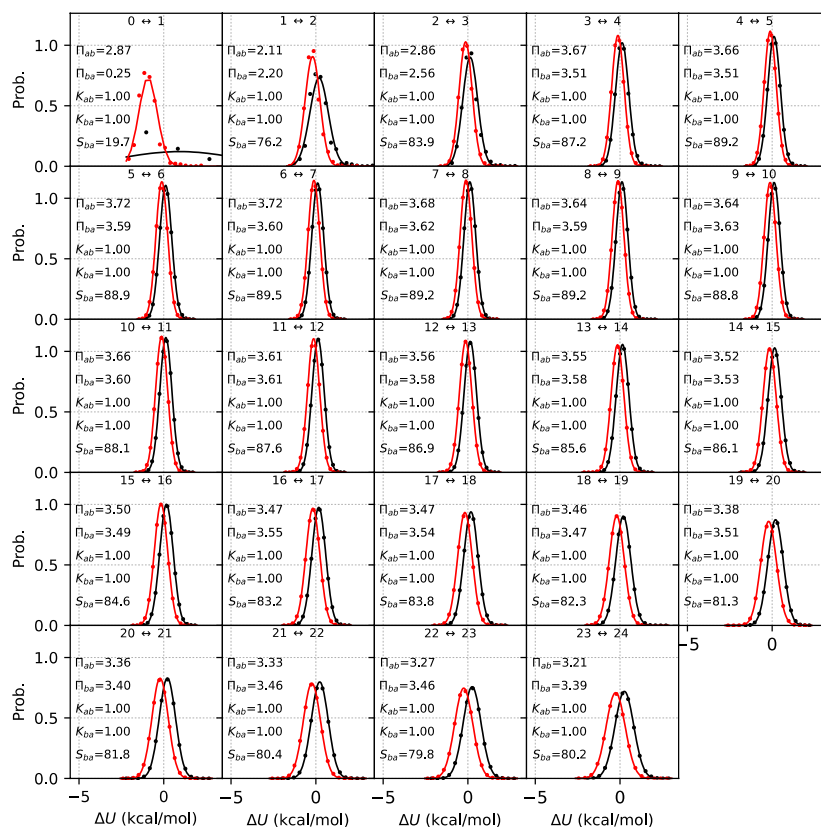
Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμικό

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμικό για το αντίγραφο 2. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 74.7-88.5% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 76.2-89.5% στο σύστημα συμπλόκου. Η μόνη εξαίρεση εμφανίζεται στην περίπτωση του πρώτου διαδοχικού ζεύγους ($0 \leftrightarrow 1$). Η αλληλεπικάλυψη αυτή είναι σημαντικά μικρότερη από τις υπόλοιπες (21.2% για το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 19.7% για το σύστημα συμπλόκου) και, άρα, στην περιοχή αυτή χρειάζεται πυκνότερη σταδιοποίηση. Μάλιστα, στην περίπτωση του συστήματος συμπλόκου είναι $\Pi_{ba}=0.25$, επομένως η προσομοίωση του ζεύγους $0 \leftrightarrow 1$ δεν είναι επαρκούς σύγκλισης.

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



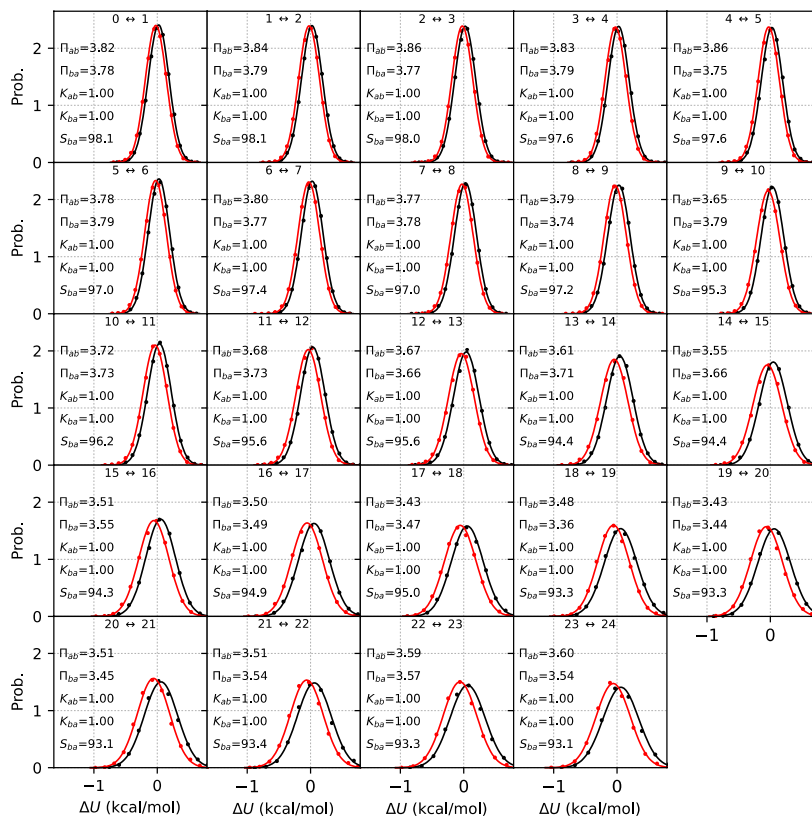
B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



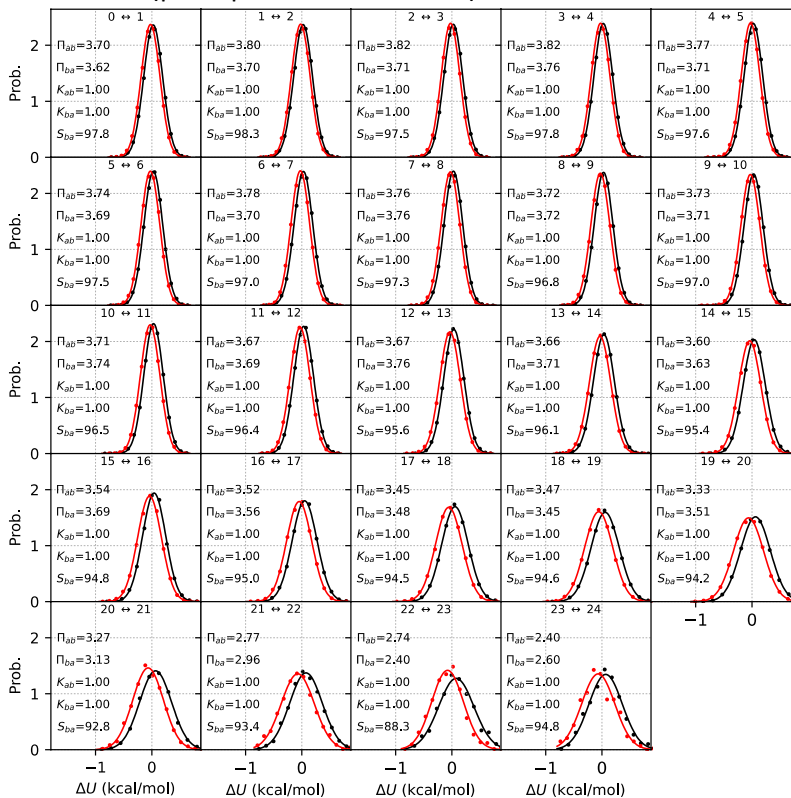
Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή του β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2 του αντιγράφου 2. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 93.1-98.1% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 88.3-98.3% στο σύστημα συμπλόκου. Οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($P_{ab} > 0.5$, $P_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη

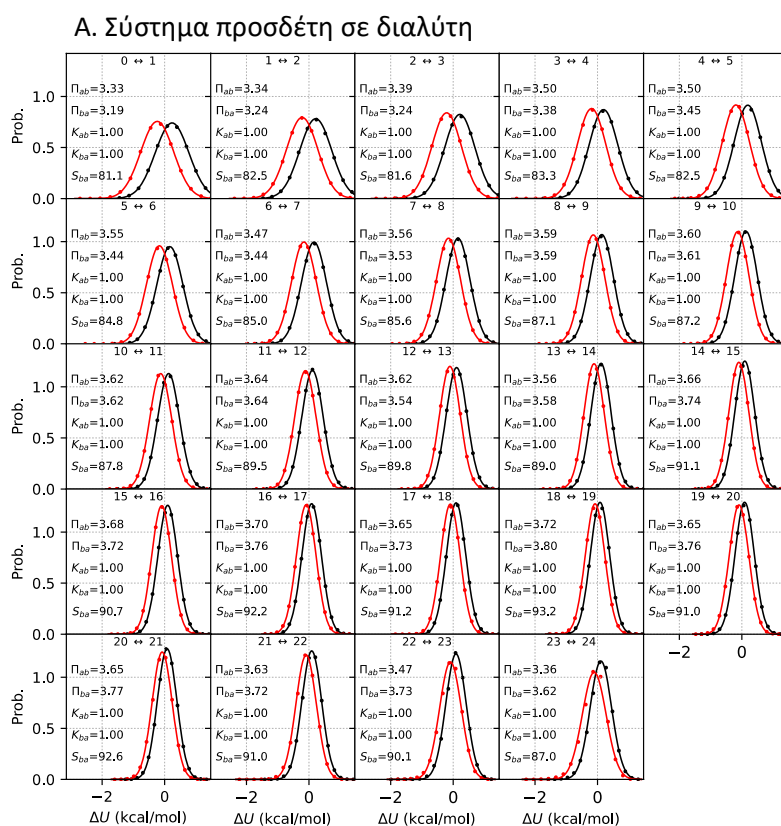


B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

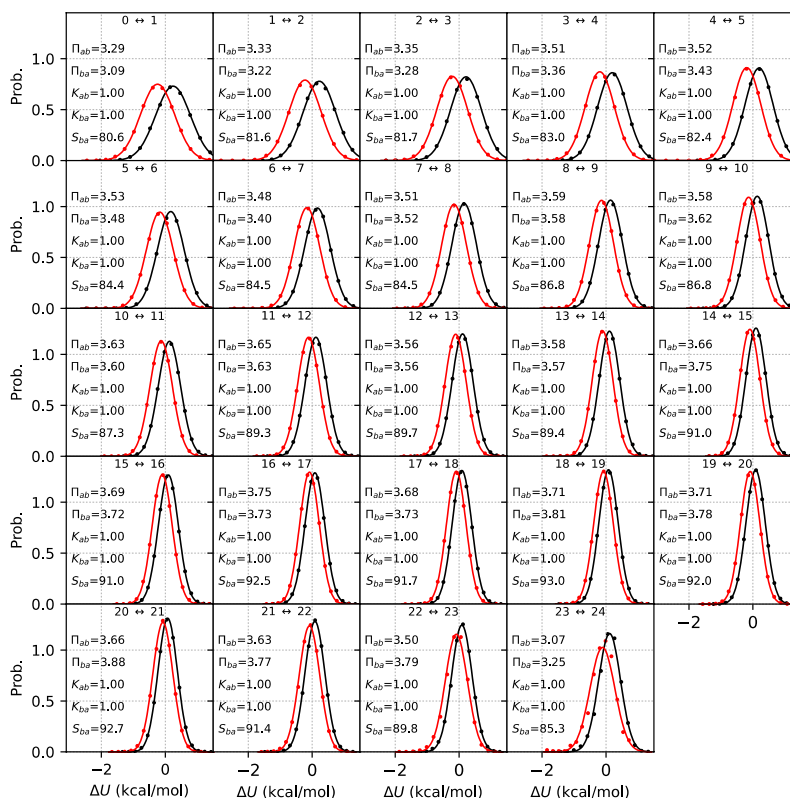


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή του ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν του αντιγράφου 2. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 81.1-93.2% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 80.6-93.0% στο σύστημα συμπλόκου. Επιπλέον, οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($\Pi_{ab} > 0.5$, $\Pi_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).



Β. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

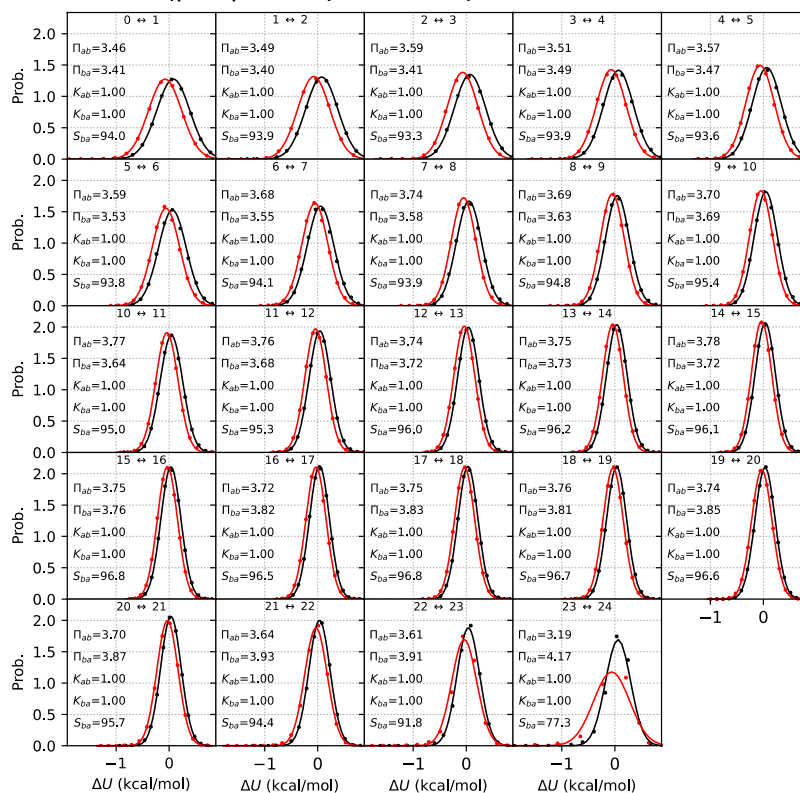


Αντίγραφο 3

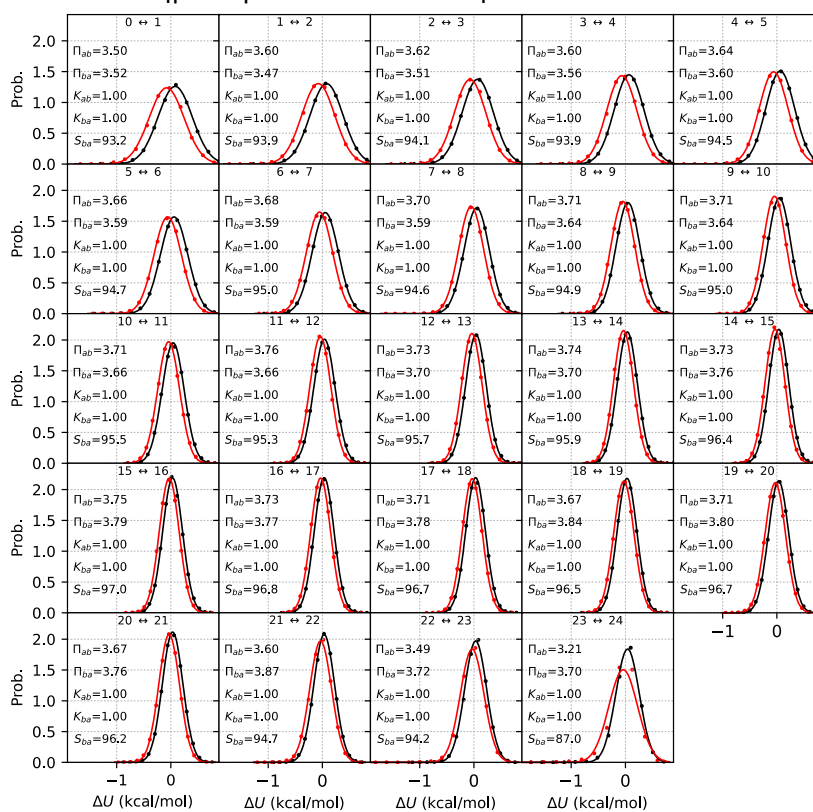
Πορεία μετατροπής γλουταμινικού σε ενδιάμεσο-1

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1 του αντιγράφου 3. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι γενικά υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 77.3-96.8% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 87.0-97.0% στο σύστημα συμπλόκου. Επιπλέον, οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($\Pi_{ab} > 0.5$, $\Pi_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη

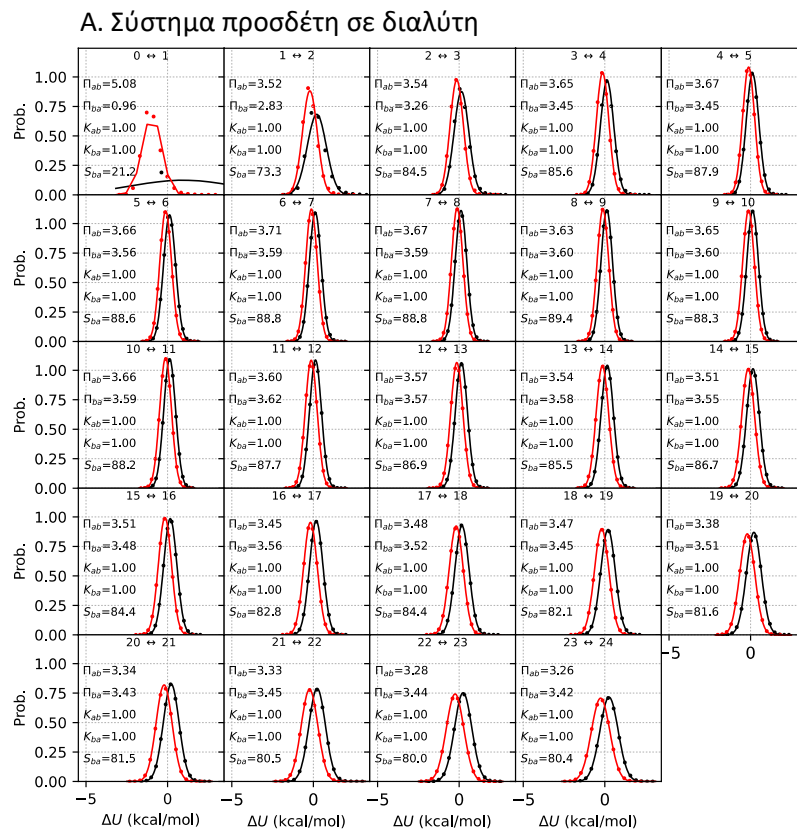


B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη

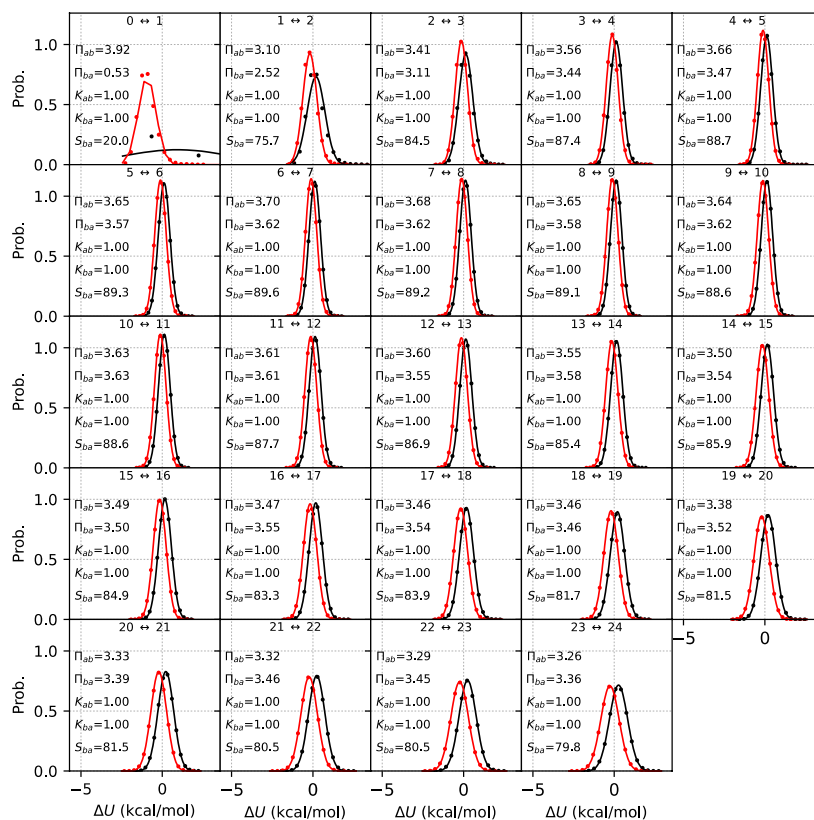


Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμικό

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμικό του αντιγράφου 3. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 73.3-89.4% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 75.7-89.6% στο σύστημα συμπλόκου. Η μόνη εξαίρεση εμφανίζεται στην περίπτωση του πρώτου διαδοχικού ζεύγους ($0 \leftrightarrow 1$). Η αλληλεπικάλυψη αυτή είναι σημαντικά μικρότερη από τις υπόλοιπες (21.2% για το σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 20.0% για το σύστημα συμπλόκου) και, άρα, στην περιοχή αυτή χρειάζεται πυκνότερη σταδιοποίηση. Μάλιστα, στην περίπτωση του συστήματος συμπλόκου είναι $\Pi_{ba}=0.53$, επομένως η προσομοίωση του ζεύγους $0 \leftrightarrow 1$ είναι οριακά επαρκούς σύγκλισης.



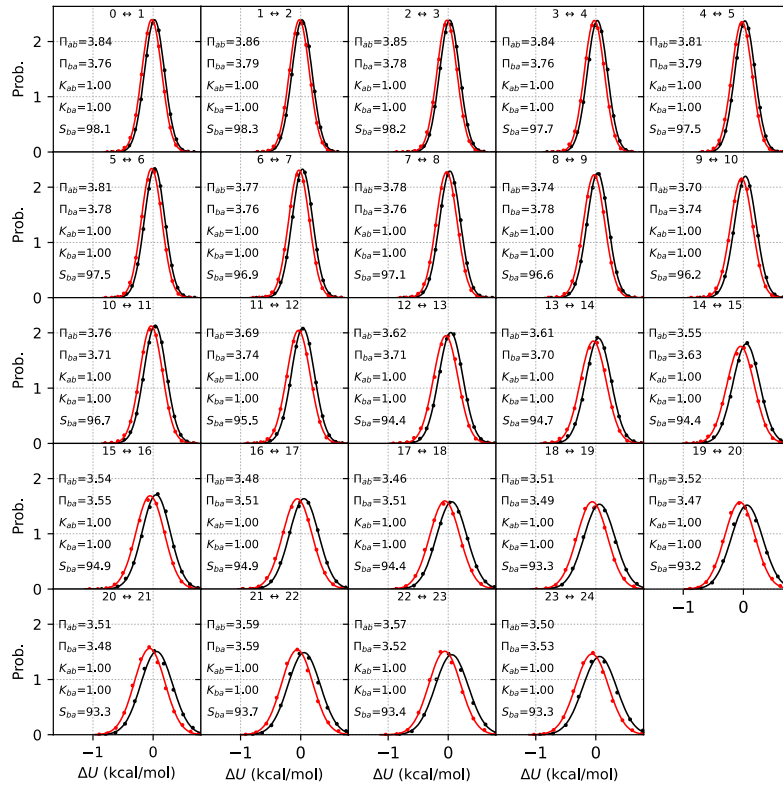
B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



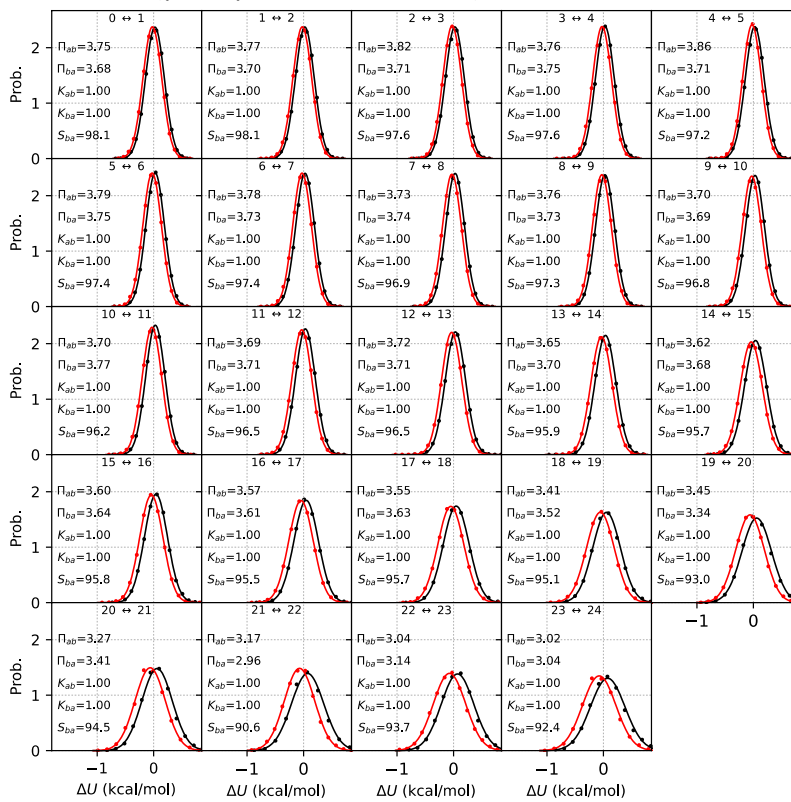
Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή του β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2 του αντιγράφου 3. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 93.3-98.3% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 90.6-98.1% στο σύστημα συμπλόκου. Οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($P_{ab} > 0.5$, $P_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



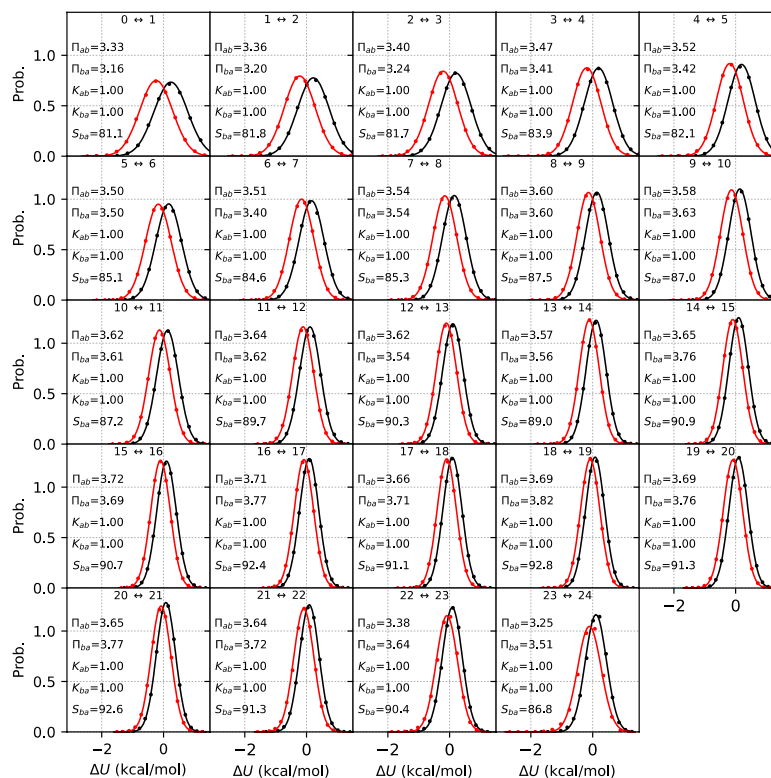
B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



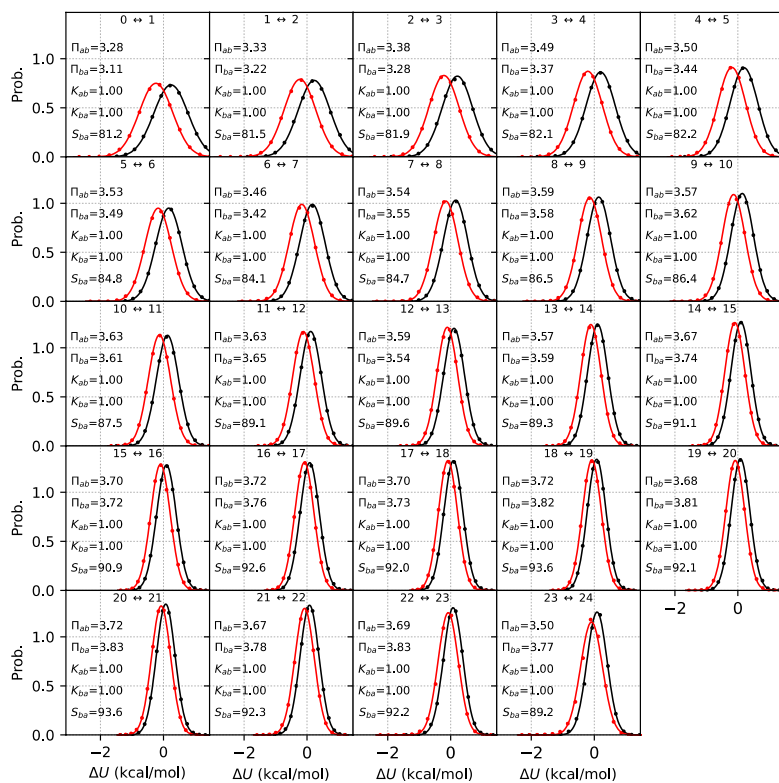
Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό

Παρατίθενται τα ιστογράμματα κατανομής πιθανότητας διαφοράς της ενέργειας μεταξύ διαδοχικών παραθύρων λ στις περιπτώσεις συστήματος προσδέτη σε διαλύτη (A) και συστήματος συμπλόκου σε διαλύτη (B) για την μετατροπή του ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν του αντιγράφου 3. Από την παρατήρηση των ιστογραμμάτων προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη αλληλεπικάλυψη του χώρου των φάσεων για κάθε διαδοχικό ζευγάρι τιμών λ σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε 81.1-92.8% αλληλεπικάλυψη στο σύστημα προσδέτη σε διαλύτη και 81.2-93.6% στο σύστημα συμπλόκου. Επιπλέον, οι τιμές των παραμέτρων αξιολόγησης της σύγκλισης των προσομοιώσεων είναι σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικές ($\Pi_{ab} > 0.5$, $\Pi_{ba} > 0.5$, $K_{ab} = K_{ba} = 1$).

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



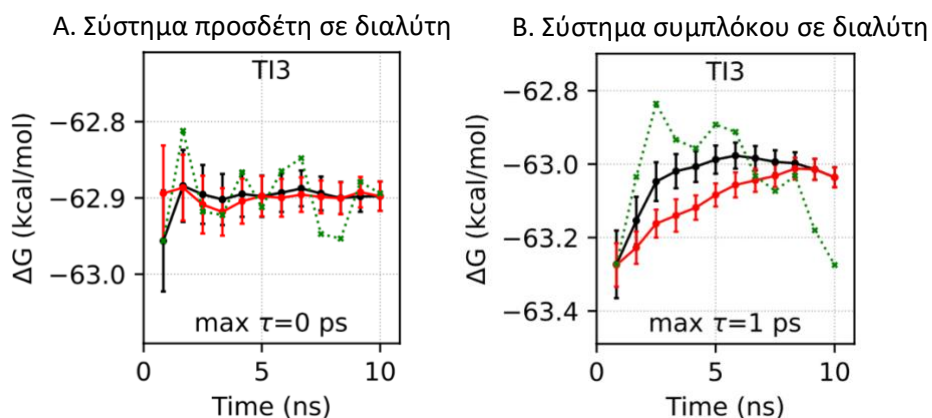
Παράρτημα 3

Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για κάθε μετασχηματισμό (γλουταμινικό σε ενδιάμεσο 1, ενδιάμεσο 1 σε β-καρβαμιδικό, β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο 2 και ενδιάμεσο 2 σε γλουταμινικό) για τα αντίγραφα 1, 2 και 3. Στα διαγράμματα η μαύρη καμπύλη αφορά τον εμπρός μετασχηματισμό και η κόκκινη καμπύλη τον μετασχηματισμό αντίθετης κατεύθυνσης. Η πράσινη καμπύλη απεικονίζει την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης για τον εμπρος μετασχηματισμό για κάθε τμηματική χρονοσειρά της προσομοίωσης ξεκινώντας από το χρονικό σημείο $t=0$ με διάστημα κατάτμησης ίσο με $1 \cdot 10$ ns. Το $\max \tau$ αποτελεί το χρόνο αυτοσυσχέτισης της τροχιάς με βάση την Χαμιλτονιανή του συστήματος. Αποτελεί μέτρο χρονικής σύγκλισης των μοριακών δυναμικών, όπου μικρότερο $\max \tau$ δηλώνει ταχύτερη σύγκλιση της προσομοίωσης. Παρατηρούμε ότι σε κάθε περίπτωση μετασχηματισμού υπάρχει σύγκλιση της ελεύθερης ενέργειας των μετασχηματισμών και των δύο κατευθύνσεων. Όπως είναι λογικό, το σύστημα διαλύτη συγκλίνει ταχύτερα από το σύστημα του συμπλόκου αφού αποτελείται από μικρότερο αριθμό ατόμων και, άρα, έχει μικρότερο αριθμό βαθμών ελευθερίας.

Αντίγραφο 1

Πορεία μετατροπής γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1

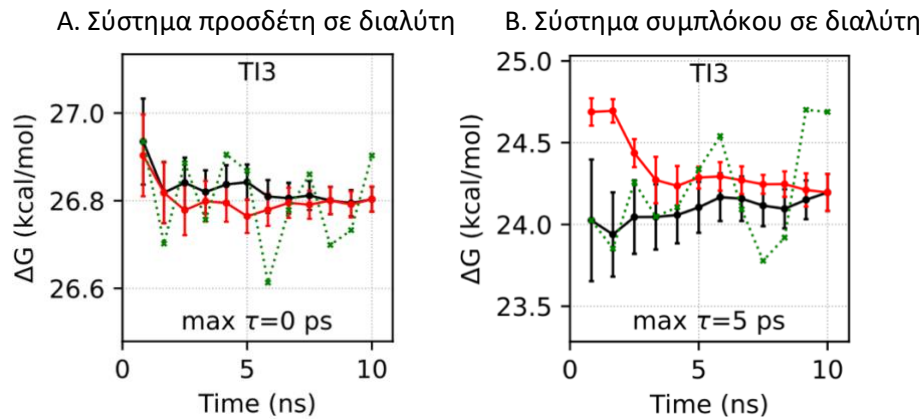
Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1 για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 1. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (γλουταμινικό ιόν σε ενδιάμεσο-1) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (ενδιάμεσο-1 σε γλουταμινικό ιόν) παρουσιάζονται με κόκκινο.



Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμιδικό

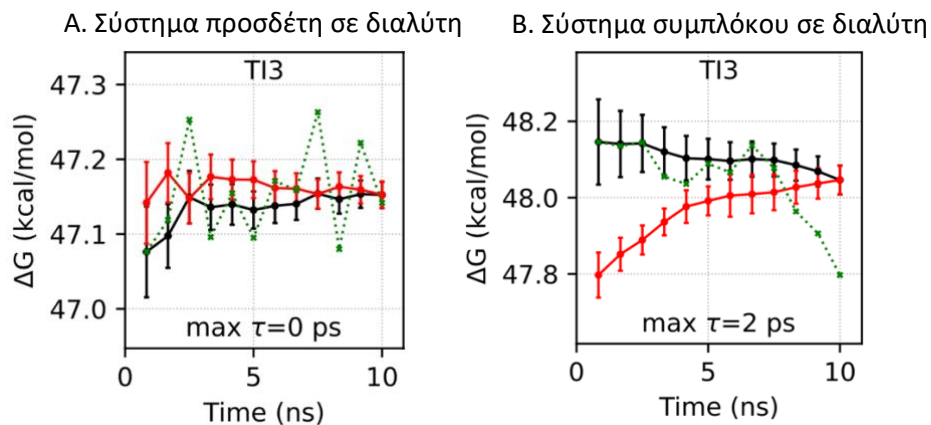
Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσου-1 σε β-καρβαμιδικό για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 1. Τα αποτελέσματα του

εμπρός μετασχηματισμού (ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμικό) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (β-καρβαμικό σε ενδιάμεσο-1) παρουσιάζονται με κόκκινο.



Πορεία μετατροπής β-καρβαμικού σε ενδιάμεσο-2

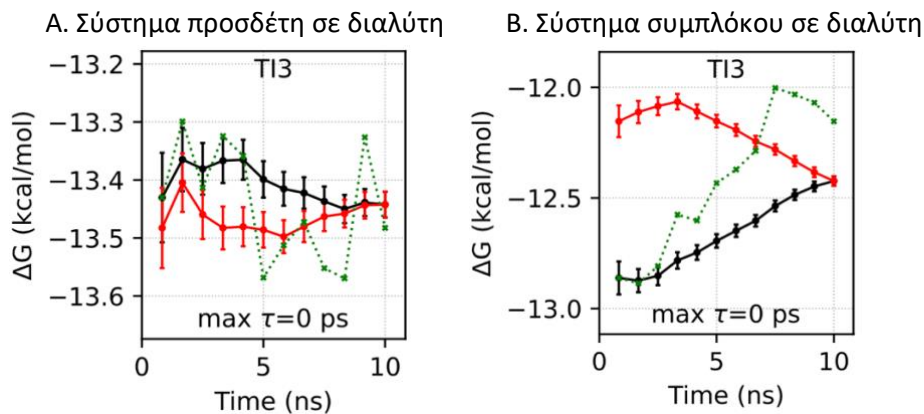
Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό β-καρβαμικού σε ενδιάμεσο-2 για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 1. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (β-καρβαμικό σε ενδιάμεσο-2) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (ενδιάμεσο-2 σε β-καρβαμικό) παρουσιάζονται με κόκκινο.



Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν

Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 1. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (ενδιάμεσο-2 σε γλουταμινικό ιόν) παρουσιάζονται με

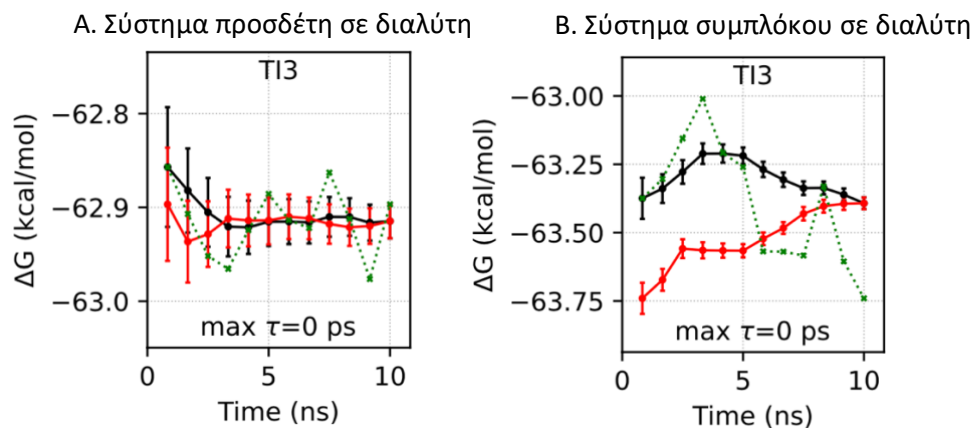
μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (γλουταμινικό ιόν σε ενδιάμεσο-2) παρουσιάζονται με κόκκινο.



Αντίγραφο 2

Πορεία μετατροπής γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1

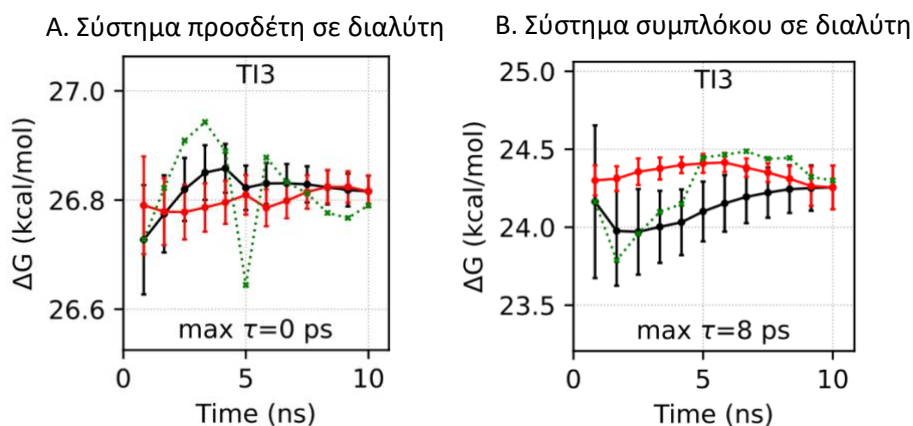
Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1 για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 2. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (γλουταμινικό ιόν σε ενδιάμεσο-1) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (ενδιάμεσο-1 σε γλουταμινικό ιόν) παρουσιάζονται με κόκκινο.



Πορεία μετατροπής ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμιδικό

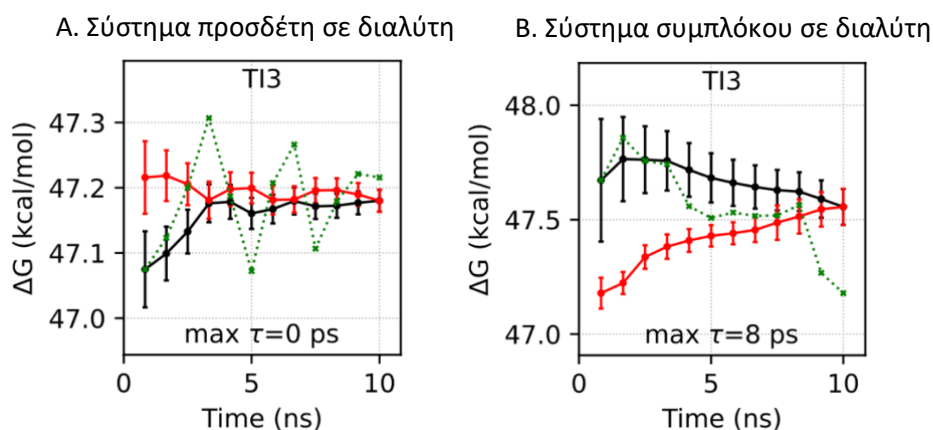
Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμιδικό για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 2. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμιδικό) παρουσιάζονται με

μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (β -καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο-1) παρουσιάζονται με κόκκινο.



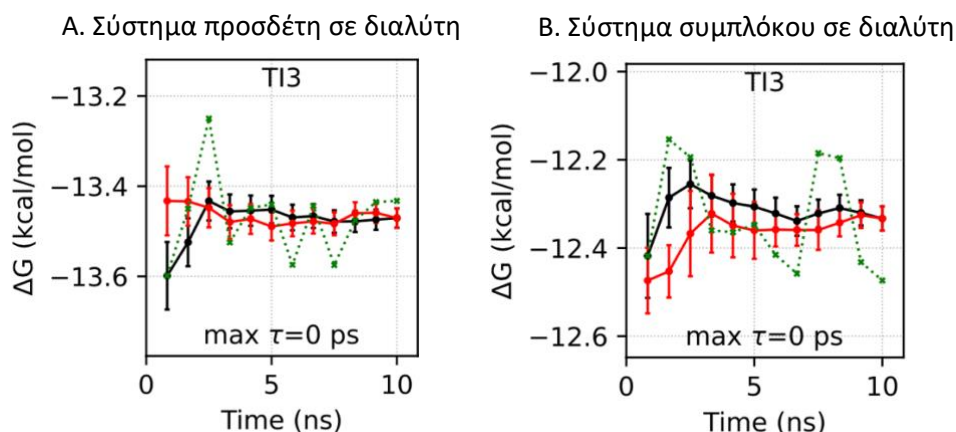
Πορεία μετατροπής β -καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό β -καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2 για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 2. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (β -καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο-2) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (ενδιάμεσο-2 σε β -καρβαμιδικό) παρουσιάζονται με κόκκινο.



Πορεία μετατροπής ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν

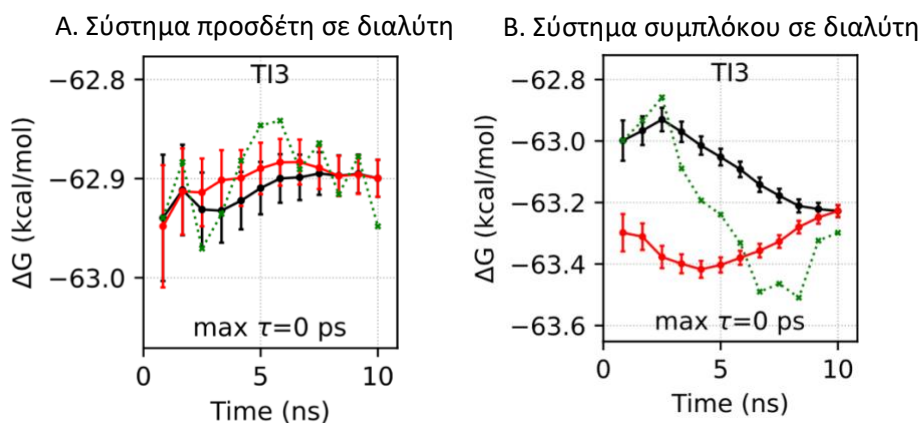
Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσου-2 σε γλουταμινικό ιόν για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 2. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (ενδιάμεσο-2 σε γλουταμινικό ιόν) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (γλουταμινικό ιόν σε ενδιάμεσο-2) παρουσιάζονται με κόκκινο.



Αντίγραφο 3

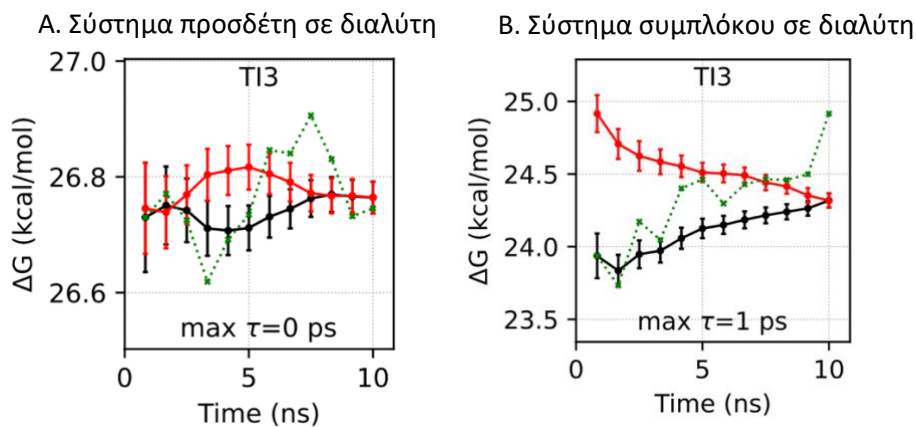
Πορεία μετατροπής γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1

Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό γλουταμινικού ιόντος σε ενδιάμεσο-1 για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 3. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (γλουταμινικό ιόν σε ενδιάμεσο-1) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (ενδιάμεσο-1 σε γλουταμινικό ιόν) παρουσιάζονται με κόκκινο.



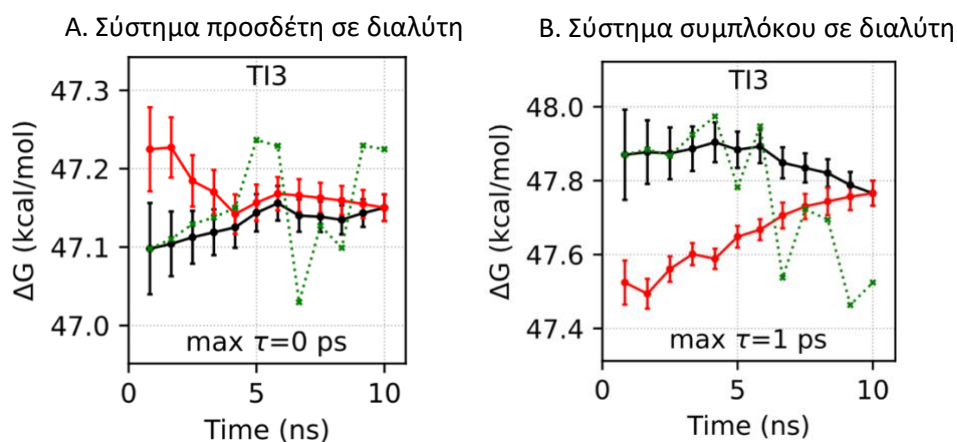
Πορεία μετατροπής ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμικό

Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμικό για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 3. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (ενδιάμεσο-1 σε β-καρβαμικό) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (β-καρβαμικό σε ενδιάμεσο-1) παρουσιάζονται με κόκκινο.



Πορεία μετατροπής β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2

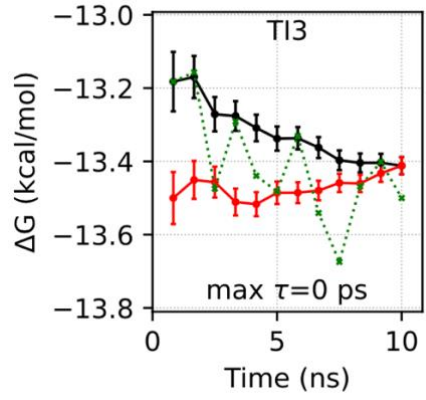
Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό β-καρβαμιδικού σε ενδιάμεσο-2 για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 3. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (β-καρβαμιδικό σε ενδιάμεσο-2) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (ενδιάμεσο-2 σε β-καρβαμιδικό) παρουσιάζονται με κόκκινο.



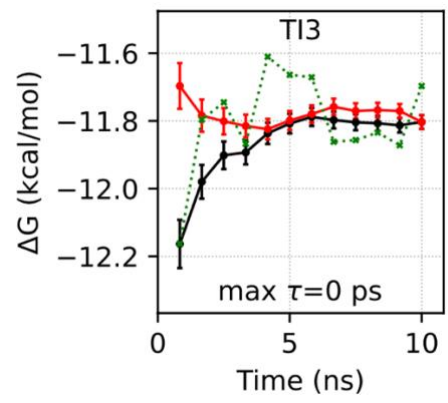
Πορεία μετατροπής ενδιαμέσου-2 σε γλουταμινικό ιόν

Διαγράμματα χρονικής εξέλιξης της ελεύθερης ενέργειας για τον μετασχηματισμό ενδιαμέσου-2 σε γλουταμινικό ιόν για (A) το σύστημα του προσδέτη σε διαλύτη και (B) το σύστημα του συμπλόκου σε διαλύτη του αντιγράφου 3. Τα αποτελέσματα του εμπρός μετασχηματισμού (ενδιάμεσο-2 σε γλουταμινικό ιόν) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα, ενώ του αντίθετου (γλουταμινικό ιόν σε ενδιάμεσο-2) παρουσιάζονται με κόκκινο.

A. Σύστημα προσδέτη σε διαλύτη



B. Σύστημα συμπλόκου σε διαλύτη



Βιβλιογραφία

1. Diaz-Parga, P., Goto, J. J., & Krishnan, V. V. (2018). Chemistry and Chemical Equilibrium Dynamics of BMAA and Its Carbamate Adducts. *Neurotox Res*, 33(1), 76–86. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9801-2>
2. Murch, S. J., Cox, P. A., & Banack, S. A. (2004). A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *PNAS USA*, 101(33), 12228–12231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404926101>
3. Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spácil, Z., Ilag, L. L., Ronnevi, L. O., Rasmussen, U., & Bergman, B. (2010). Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *PNAS USA*, 107(20), 9252–9257. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914417107>
4. Brand, E. B. (2009). Human exposure to cyanobacteria and BMAA. *Amyotroph Lateral Sc*, 10(2), 85-95. <https://doi.org/10.3109/17482960903273585>
5. Diakogiannaki, I. (2021). *Statistical Mechanical Study of β -N-methylamino-L-alanine and its carbamate adducts as potential inhibitors of the AMPA glutamate receptor using Molecular Dynamics Simulations* [Master Thesis, National and Kapodistrian University of Athens]. Pergamos Digital Library Platform of the National and Kapodistrian University of Athens. <https://pergamos.lib.uoa.gr/uoa/dl/object/2948600>
6. Zhu, S., & Gouaux, E. (2017). Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 112(Pt A), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.034>
7. Reiner, A., & Levitz, J. (2018). Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*, 98(6), 1080–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.018>
8. Chiu, A. S., Gehringer, M. M., Welch, J. H., & Neilan, B. A. (2011). Does α -amino- β -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration?. *Int J Env Res Pub He*, 8(9), 3728–3746. <https://doi.org/10.3390/ijerph8093728>
9. Armstrong, N., & Gouaux, E. (2000). Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*, 28(1), 165–181. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00094-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00094-5)
10. Heinzemann, G., Chen, P. C., Kuyucak, S. (2014). Computation of Standard Binding Free Energies of Polar and Charged Ligands to the Glutamate Receptor GluA2. *J Chem Phys*, 118(7), 1813-1824. <https://doi.org/10.1021/jp412195m>
11. Yonkunas, M., Buddhadev, M., Flores Canales, J. C., Kurnikova, M., G. (2017). Configurational Preference of the Glutamate Receptor Ligand Binding Domain Dimers. *Biophys J*, 112, 2291-2300. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.04.042>
12. Yu, A., & Lau, A. Y. (2017). Energetics of Glutamate Binding to an Ionotropic Glutamate Receptor. *The journal of physical chemistry. B*, 121(46), 10436–10442. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b06862>
13. Braun, E., Gilmer, J., Mayes, H. B., Mobley, D. L., Monroe, J. I., Prasad, S., & Zuckerman, D. M. (2019). Best Practices for Foundations in Molecular

- Simulations [Article v1.0]. *LiveCoMS*, 1(1), 5957.
<https://doi.org/10.33011/livecoms.1.1.5957>
14. Protein Data Bank
 15. Aldeghi, M., Bluck, J. P., & Biggin, P. C. (2018). Absolute Alchemical Free Energy Calculations for Ligand Binding: A Beginner's Guide. In: Gore, M., Jagtap, U. (eds), *Computational Drug Discovery and Design. Method Mol Biol*, vol 1762. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7756-7_11
 16. Cournia, Z., Allen, B., Sherman, W. (2017). Relative Binding Free Energy Calculations in Drug Discovery: Recent Advances and Practical Considerations. *J Chem Inf Model*, 57(12), 2911-2937. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00564>
 17. Zwanzig, R. W. (1954). High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J Chem Phys*, 22(8), 1420-1426. <https://doi.org/10.1063/1.1740409>
 18. Wu, D., & Kofke, D. A. (2005). Phase-space overlap measures. I. Fail-safe bias detection in free energies calculated by molecular simulation. *J Chem Phys*, 123(5), 054103. <https://doi.org/10.1063/1.1992483>
 19. Mey, A. S. J. S., Allen, B. K., Bruce McDonald, H. E. ., Chodera, J. D., Hahn, D. F., Kuhn, M., Michel, J., Mobley, D. L. ., Naden, L. N., Prasad, S., Rizzi, A., Scheen, J., Shirts, M. R., Tresadern, G., & Xu, H. (2020). Best Practices for Alchemical Free Energy Calculations [Article v1.0]. *LiveCoMS*, 2(1), 18378. <https://doi.org/10.33011/livecoms.2.1.18378>
 20. Shirts, M. R., & Chodera, J. D. (2008). Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. *J Chem Phys*, 129, 124105. <https://doi.org/10.1063/1.2978177>
 21. Papadourakis, M. (2021). *Molecular dynamics based methods for the computation of standard binding free energies and binding selectivity of inhibitors of proteins of pharmaceutical interest*. [Doctoral dissertation, University of Edinburgh]. Edinburgh Research Archive. <https://hdl.handle.net/1842/37926>
 22. Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
 23. Robertson, M. J., Tirado-Rives, J., & Jorgensen, W. L. (2015). Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field. *J Chem Theory Comput*, 11(7), 3499-3509. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00356>
 24. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
 25. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, 26(16), 1781-1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
 26. Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design*, 27(3), 221-234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>

27. Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
28. Dodda, L. S., Cabeza de Vaca, I., Tirado-Rives, J., & Jorgensen, W. L. (2017). LigParGen web server: an automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands. *Nucleic Acids Res*, *45*(W1), W331–W336. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx312>
29. Mark, P. & Nilsson, L. (2001). Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J Phys Chem*, *105*(43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>
30. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A., Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys*, *81*, 3684. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
31. Van Gunsteren, W. F. & Berendsen H. J. C. (1988). A Leap-frog Algorithm for Stochastic Dynamics, *Mol Simul*, *1*(3), 173–185. <https://doi.org/10.1080/08927028808080941>
32. Parrinello, M., Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys*, *52*, 7182. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
33. Klimovich, P.V., Shirts, M.R. & Mobley, D.L. Guidelines for the analysis of free energy calculations. *J Comput Aided Mol Des*, *29*, 397–411 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10822-015-9840-9>
34. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem*, *25*(9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>
35. D.A. Case, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, V. Man, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York and P.A. Kollman (2020), AMBER 2020, University of California, San Francisco.
36. Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model*, *25*(2), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2005.12.005>
37. Lee, T., Tsai, H., Ganguly, A., Giese, T., & York, D. (2021). Robust, Efficient and Automated Methods for Accurate Prediction of Protein-Ligand Binding Affinities in AMBER Drug Discovery Boost. *ChemRxiv*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14727573.v1>
38. Aqvist, J., Wennerström, P., Nervall, M., Bjelic, S., Brandsdal, B. O. (2004). Molecular dynamics simulations of water and biomolecules with a Monte Carlo constant pressure algorithm. *Chem Phys Lett*, *384*(4-6), 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.12.039>
39. Lee, T. S., Allen, B. K., Giese, T. J., Guo, Z., Li, P., Lin, C., McGee, T. D., Pearlman, D. A., Radak, B. K., Tao, Y., Tsai, H. C., Xu, H., Sherman, W., & York, D. M. (2020).

Alchemical Binding Free Energy Calculations in AMBER20: Advances and Best Practices for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*, 60(11), 5595–5623.
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00613>

40. Giese, T. J., & York, D. M. (2021). Variational Method for Networkwide Analysis of Relative Ligand Binding Free Energies with Loop Closure and Experimental Constraints. *J Chem Theory Comput*, 17(3), 1326–1336.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c01219>
41. Chodera J. D., Swope W. C., Pitner J. W., Seok C., Dill A. K. (2007). Use of Weighted Histogram Analysis Method for the Analysis of Simulated and Parallel Tempering Simulations. *J Chem Theory Comput*, 3(1), 26-41.
<https://doi.org/10.1021/ct0502864>