



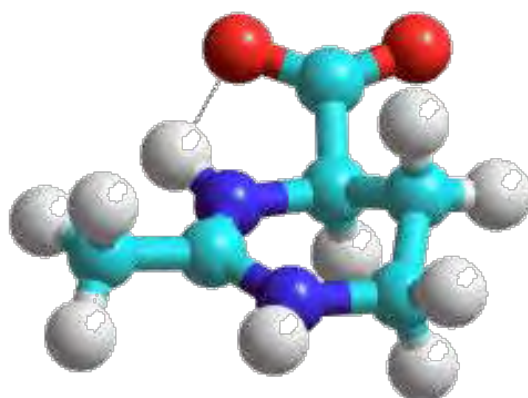
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία της Θεοδώρας Τσομπάνη με θέμα

**Υπολογισμός της διηλεκτρικής συνάρτησης διαλύματος
εκτοΐνης σε νερό και βαρύ νερό - Προσομοιώσεις μοριακής
δυναμικής**



**Calculation of the dielectric function of ectoine solutions in
water and heavy water - Molecular dynamics simulations**

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2018

Στοιχεία διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στην ομάδα Βιοφυσικής, του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2017 – Σεπτέμβριος 2018 υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Γεώργιου Παπαδόπουλου.

Μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Επιβλέπων: Παπαδόπουλος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής

Συνεπιβλέποντες: Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου σ' αυτή την προσπάθεια και με βοήθησαν να την φέρω σε πέρας.

Ο μεγαλύτερος συμπαραστάτης μου υπήρξε ο επιβλέπων καθηγητής μου, Επίκουρος Καθηγητής κ. Γεώργιος Παπαδόπουλος, μέσα από την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την ηθική του παρότρυνση. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα και για τη στήριξη που μου πρόσφερε σε ορισμένες δύσκολες στιγμές στη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Λεωνίδα και την Λέκτορα κ. Βασιλική Σκαμνάκη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από καρδιάς όλα τα μέλη της Θεατρικής Ομάδας Ιατρικής και Βιοχημείας Λάρισας «Χωρίς Υποβολέα» του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης, αλλά και τους συμφοιτητές μου Χρύσα Ντουντούμη, Δήμητρα Στεργίου, Μπούμπα Δημήτριο, Λιόλιο Βασίλειο, Ανθή-Στυλιανή Μάκιου και Φερινέ Μεχμέτογλου, οι οποίοι μου προσέφεραν πρόθυμα τη βοήθειά τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον Ιωάννη Στάμκο για την βοήθεια που μου παρείχε στον υπολογισμό των διηλεκτρικών συναρτήσεων μέσω του λογισμικού που κατασκεύασε.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο, θερμό ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου και την οικογένειά μου για την αμέριστη αγάπη και βοήθεια τους σε οικονομικό και ηθικό επίπεδο, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Σκοπός.....	5
Περίληψη.....	5
Abstract.....	5
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. Η εκτοΐνη – Δομή.....	6
2. Η εκτοΐνη – Ρόλος.....	6
3. Η εκτοΐνη – Ανακάλυψη.....	7
4. Η εκτοΐνη – Χρησιμότητα.....	7
5. Η εκτοΐνη – Βιοσύνθεση.....	8
6. Το βαρύ νερό (D ₂ O) – Δομή.....	9
7. Το βαρύ νερό (D ₂ O) – Φυσικές ιδιότητες.....	9
8. Το βαρύ νερό (D ₂ O) – Επίδραση σε βιολογικά συστήματα.....	10
9. Το βαρύ νερό (D ₂ O) – Εφαρμογές και χρήσεις.....	10
10. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία.....	11
11. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία – Η διηλεκτρική σταθερά.....	11
12. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία – Μέθοδος.....	13
13. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία – Εφαρμογές.....	14
14. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία – Προσομοιώσεις.....	14
15. Η ακτινική συνάρτηση κατανομής (RPDF) – Ορισμός.....	15
16. Η ακτινική συνάρτηση κατανομής (RPDF) – Υπολογισμός.....	15
B. ΜΕΘΟΔΟΙ – ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ.....	17
1. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.....	17
2. Chimera.....	21
3. Arguslab.....	21
4. Rasmol.....	22
5. VMD.....	22
6. NAMD.....	22
7. Psfgen.....	22
8. Packmol.....	23
Γ. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
1. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων – Αρχεία PDB και PSF.....	24
2. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων – Παράμετροι εκτοΐνης.....	25
3. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων – Παράμετροι H ₂ O.....	25
4. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων – Παράμετροι D ₂ O.....	25
5. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων – Παραμετροποίηση εκτοΐνης.....	33
6. Δημιουργία του υδατικού διαλύματος – Ενυδάτωση εκτοΐνης.....	36
7. Ελαχιστοποίηση ενέργειας του συστήματος (Energy minimization).....	36
8. Εξισορρόπηση του συστήματος (Equilibration).....	37
9. Υπολογισμός της ακτινικής συνάρτησης κατανομής (RPDF).....	38
10. Υπολογισμός των διηλεκτρικών φασμάτων.....	39
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
1. Διαγράμματα ακτινικής συνάρτησης κατανομής (RPDF).....	40
2. Διαγράμματα διηλεκτρικής φασματοσκοπίας.....	45
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – SCRIPTS.....	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

Σκοπός

Στην εργασία μελετήθηκε η συμπεριφορά του μορίου της εκτοΐνης σε υδατικά της διαλύματα, τόσο σε νερό όσο και σε βαρύ νερό (D_2O), με την χρήση προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (ΠΜΔ), καθώς και το διηλεκτρικό της φάσμα στα παραπάνω διαλύματα. Ο σκοπός είναι να συγκριθούν τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων και υπολογισμών που πραγματοποιήθηκαν με αντίστοιχα πειράματα που έχουν εκτελεστεί σε υδατικά διαλύματα εκτοΐνης και η κατανόηση των ιδιοτήτων της ως ωσμωπροστατευτικού.

Περίληψη

Η εκτοΐνη είναι ένα φυσικό βιομόριο με ωσμωπροστατευτικές και σταθεροποιητικές ιδιότητες και παράγεται μέσω βακτηριακού μεταβολισμού. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν ΠΜΔ σε υδατικά διαλύματα εκτοΐνης με H_2O και D_2O . Το μόριο της εκτοΐνης και το μόριο του D_2O παραμετροποιήθηκαν κατάλληλα για την εκτέλεση των παραπάνω προσομοιώσεων με το charmm force field. Στην συνέχεια μελετήθηκαν χαρακτηριστικές ακτινικές συναρτήσεις κατανομής και υπολογίστηκε η διηλεκτρική συνάρτηση της εκτοΐνης για τα παραπάνω διαλύματα.

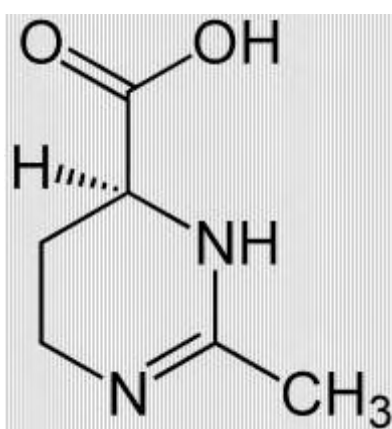
Abstract

Ectoine is a natural biomolecule with osmoprotectant and stabilizing properties and it is synthesized by bacterial metabolism. In this thesis we used molecular dynamics simulations in aqueous solutions of ectoine with H_2O and D_2O . Charmm force field parameters for Ectoine and D_2O were properly developed for the simulations. Radial pair distribution functions and dielectric functions were calculated after the simulations for the ectoine solutions.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η εκτοΐνη – Δομή

Η εκτοΐνη (1,4,5,6-τετραϋδρο-2-μεθυλ-4-πυριμιδινοκαρβοξυλικό οξύ) είναι ένα φυσικό βιομόριο και βρίσκεται σε διάφορα είδη βακτηρίων, όμως απαντάται περισσότερο σε αλατόφιλα βακτήρια.^[10] Περιγραφικά αναφέρεται και ως ετεροκυκλικό αμινοξύ ή μερικώς υδρογονωμένο παράγωγο πυριμιδίνης. Ο χημικός τύπος της εκτοΐνης είναι $C_6H_{10}N_2O_2$.^[11]



Εικόνα A.1. Ο συντακτικός τύπος της εκτοΐνης^[12]

Πίνακας A.2. Η μάζα, το μοριακό βάρος και το ηλεκτρικό φορτίο ενός μορίου εκτοΐνης^[12]

Μοριακό βάρος	142,158 g/mol
Ηλεκτρικό φορτίο	0

2. Η εκτοΐνη – Ρόλος

Ο λόγος που την συναντάμε περισσότερο σε μικροοργανισμούς όπου το περιβάλλον τους έχει μεγάλη αλατότητα είναι επειδή λειτουργεί ως οσμωπροστατευτικό και προλαμβάνει την δημιουργία υπεροσμωτικού εσωτερικού περιβάλλοντος στα κύτταρα, βοηθώντας τα να επιβιώσουν στο υπεροσμωτικό στρες. Λόγω της δομής της, χαρακτηρίζεται και ως ενυδατικός παράγοντας, αφού μπορεί να διατηρήσει σταθερό τον όγκο ενός κυττάρου σε περιβάλλον υψηλής αλατότητας, συγκρατώντας μόρια νερού στο εσωτερικό του. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ο

βοηθητικός ρόλος της και σε περιπτώσεις θερμικού σοκ, αλλά και σταθεροποίησης άλλων μορίων. ^[10]

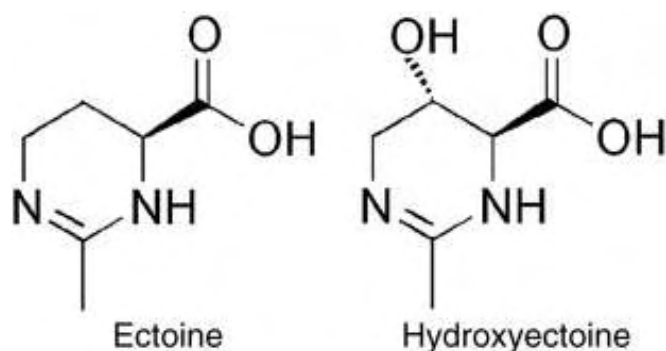
3. Η εκτοΐνη - Ανακάλυψη

Η εκτοΐνη ανακαλύφθηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε οξειδωτικά φωτότροφα βακτήρια, συγκεκριμένα στο βακτήριο *Ectothiorhodospira halochloris*, και έκτοτε έχει βρεθεί σε Gram+ και Gram- βακτήρια, με κυριότερα τα μεθανοτρόπα *Methylomicrobium alcaliphilum*, *Mm. Buryatense*, καθώς και βακτήρια μεθανόλης και μεθυλαμίνης. ^[14]

4. Η εκτοΐνη – Χρησιμότητα

Η εκτοΐνη παράγεται από βακτηριακό κυτταρικό μεταβολισμό. Σε περιπτώσεις που παράγεται μεγάλη ποσότητα εκτοΐνης, αυτή δεν είναι κυτταροτοξική, ακόμα και σε μεγάλες ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις.

Η εκτοΐνη και το υδροξυλιωμένο παράγωγό της, η υδροξυ-εκτοΐνη, έχουν αρκετό ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς μελετάται η χρήση τους σε ιατρικά και καλλυντικά σκευάσματα ως σταθεροποιητές βιομορίων και ολόκληρων κυττάρων έναντι διαφόρων βλαβερών παραγόντων όπως θέρμανση, ψύξη, ξήρανση και επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. ^[10]

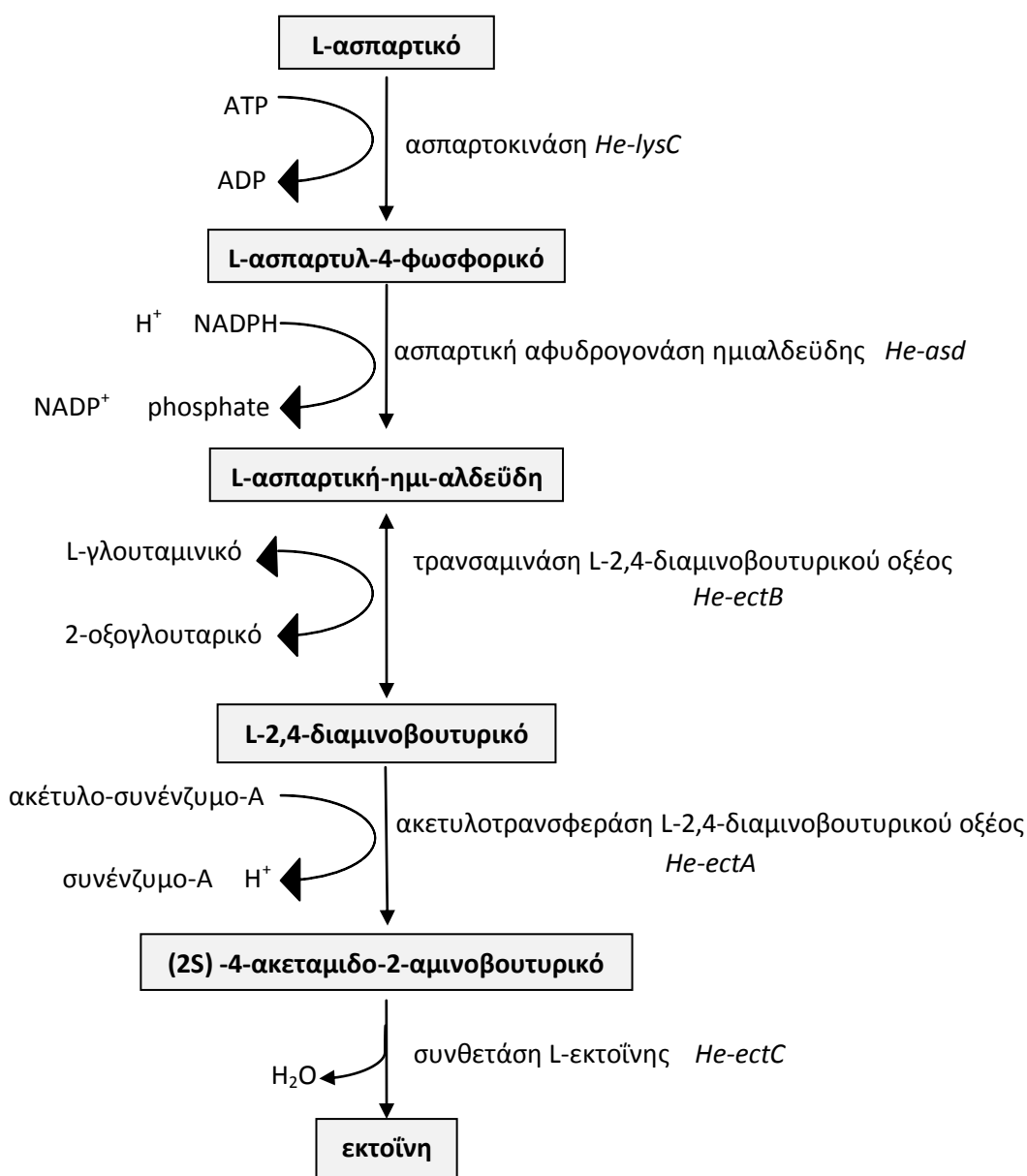


Εικόνα Α.3. Σύγκριση συντακτικών τύπων εκτοΐνης και υδροξυ-εκτοΐνης

5. Η εκτοΐνη - Βιοσύνθεση

Η βιοσύνθεση της εκτοΐνης γίνεται σε τρεις διαδοχικές ενζυμικές αντιδράσεις. Το αρχικό μόριο είναι η ασπαρτική β-ημι-αλδεΐδη. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της εκτοΐνης ονομάζονται *ectA*, *ectB* και *ectC* και κωδικοποιούν τα ένζυμα ακετυλοτρανσφεράση L-2,4-διαμινοβουτυρικού οξέος, τρανσαμινάση L-2,4-διαμινοβουτυρικού οξέος και συνθετάση L-εκτοΐνης, αντίστοιχα. ^[13]

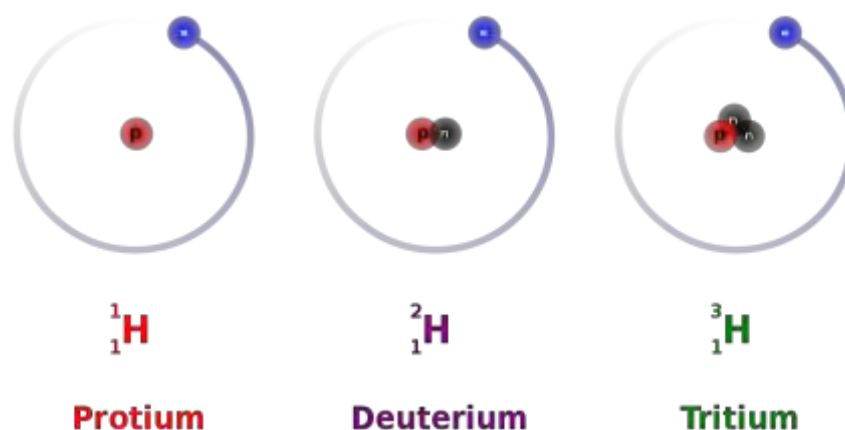
Ενδεικτικά, παρακάτω απεικονίζεται το μονοπάτι βιοσύνθεσης της εκτοΐνης:



Εικόνα Α.4. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της εκτοΐνης στα περισσότερα βακτήρια

6. Το βαρύ νερό (D₂O) – Δομή

Το βαρύ νερό, ή αλλιώς οξείδιο του δευτερίου, είναι μια μορφή νερού που αντί για δύο άτομα υδρογόνου, φέρει δύο άτομα δευτερίου, το οποίο είναι ισότοπο του υδρογόνου. Το δευτέριο έχει διπλάσια μάζα από το υδρογόνο καθώς φέρει στον πυρήνα του ατόμου ένα πρωτόνιο και ένα νετρόνιο. Η παρουσία του δευτερίου δίνει διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες στον διαλύτη D₂O σε σύγκριση με το H₂O.^[15]



Εικόνα Α.5. Τα τρία διαφορετικά ισότοπα του υδρογόνου

7. Το βαρύ νερό (D₂O) – Φυσικές ιδιότητες

Πίνακας Α.6. Σύγκριση μερικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του H₂O και του D₂O

	D ₂ O (Βαρύ νερό)	H ₂ O (Ελαφρύ νερό)
Σημείο πήξης	3,82 °C	0,0 °C
Σημείο βρασμού	101,4 °C	100,0 °C
Πυκνότητα (g/mL)	1,1056	0,9982
Θερμοκρασία στη μέγιστη πυκνότητα	11,6 °C	3,98 °C
Ιξώδες (20°C, mPa·s)	1,2467	1,0016
Επιφανειακή τάση (25°C, N/m)	0,07187	0,07198
Θερμότητα τήξης (kJ/mol)	6,132	6,00678
Θερμότητα εξαέρωσης (kJ/mol)	41,521	40,657
pH (25°C)	7,44	7,0

pKb (25°C)	7,44	7,0
Δείκτης διάθλασης (20°C, 0,5893 μm)	1,32844	1,33335

Οι φυσικές ιδιότητες του H₂O και του D₂O διαφέρουν. Το βαρύ νερό εμφανίζει κατά 10,6% μεγαλύτερη πυκνότητα από το ελαφρύ νερό σε δεδομένη θερμοκρασία. Η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων D⁺ είναι μικρότερη από την συγκέντρωση των ιόντων H⁺ στην ίδια θερμοκρασία. Ανάλογα εμφανίζονται και διαφορές στο pH τους, με το βαρύ νερό να εντοπίζεται σε ελαφρώς αλκαλικές τιμές, στο 7,44. ^[16]

8. Το βαρύ νερό (D₂O) – Επίδραση σε βιολογικά συστήματα

Τα διαφορετικά ισότοπα των χημικών στοιχείων έχουν διαφορετικές χημικές συμπεριφορές σε σύγκριση μεταξύ τους, αλλά για τα περισσότερα στοιχεία οι διαφορές είναι πολύ μικρές και ανιχνεύονται και αξιοποιούνται δύσκολα. Για τα ισότοπα του υδρογόνου, ωστόσο, ισχύει το αντίθετο, τα ισοτοπικά φαινόμενα ανιχνεύονται εύκολα, ιδιαίτερα σε βιολογικά συστήματα, διότι είναι πολύ ευαίσθητα ακόμα και σε μικρές αλλαγές των ιδιοτήτων του νερού (διαλύτης).

Για παράδειγμα, η λειτουργικότητα των ενζύμων βασίζεται κυρίως στους δεσμούς υδρογόνου που συνάπτει τόσο στο ενεργό κέντρο με το εκάστοτε υπόστρωμα, όσο και εκτός του ενεργού κέντρου, για την σταθεροποίηση των τριτοταγών δομών του ενζύμου. Ένας δεσμός υδρογόνου στον οποίο συμμετέχει το δευτέριο είναι ισχυρότερος από έναν δεσμό που συμμετέχει το υδρογόνο. Οπότε είναι λογικό σε ένα περιβάλλον που υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση D₂O να διαταράσσονται ορισμένες φυσιολογικές κυτταρικές αντιδράσεις. Πιο ισχυρά επηρεάζονται η κυτταρική μεμβράνη και η διαδικασία σχηματισμού μιτωτικών ατράκτων που είναι απαραίτητη για την κυτταρική διαίρεση στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Παρ' όλα αυτά, τα βακτήρια είναι ανθεκτικά στο D₂O, και μπορούν να επιβιώσουν ακόμα και σε περιβάλλον με 98% v/v D₂O. ^{[17][18]}

9. Το βαρύ νερό (D₂O) – Εφαρμογές και χρήσεις

Το D₂O χρησιμοποιείται συχνά στην φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ως διαλύτης. Στην οργανική χημεία, η χρήση του δευτερίου

βοηθάει στην ταυτοποίηση ισοτοπόλογων οργανικών ενώσεων. Στην φασματοσκοπία (IR) μετασχηματισμού Fourier, το D₂O χρησιμοποιείται ως διαλύτης αντί για το H₂O στις πρωτεΐνες, διότι δεν επικαλύπτει αμιδικές περιοχές. Σε μελέτες σκέδασης νετρονίων αξιοποιείται η μεγάλη διαφορά στον τρόπο σκέδασης σε σχέση με το H₂O. Σε πυρηνικούς αντιδραστήρες, το D₂O χρησιμοποιείται ως επιβραδυντής νετρονίων. Ακόμα, βρίσκει εφαρμογή σε διαδικασίες ανίχνευσης νετρίνων, στην παραγωγή τριτίου και στον έλεγχο του μεταβολικού ρυθμού στην φυσιολογία και την βιολογία.^{[19][20]}

10. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία

Η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες που μπορούν να αξιοποιηθούν στην δυναμική και δομική ανάλυση και μελέτη διαλυμάτων. Με τις τεχνικές διηλεκτρικής φασματοσκοπίας μελετώνται οι διηλεκτρικές ιδιότητες ενός υλικού, οι οποίες γενικά μπορούν να εκφραστούν με τον τύπο της μιγαδικής διηλεκτρικής σταθεράς:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

όπου ω η κυκλική συχνότητα του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται στο προς μελέτη υλικό. Το πραγματικό μέρος της διηλεκτρικής σταθεράς ε' είναι ανάλογο της ενέργειας που αποθηκεύεται στο υλικό σε μορφή πόλωσης και το φανταστικό μέρος ε'' είναι ανάλογο των απωλειών ενέργειας, άρα της ενέργειας που υφίσταται μετατροπή σε θερμότητα.^[21]

11. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία - Η διηλεκτρική σταθερά

Όλα τα υλικά έχουν μια διηλεκτρική σταθερά. Η σταθερά αυτή ισούται με τον λόγο της χωρητικότητας ενός πυκνωτή που ανάμεσα στους οπλισμούς του έχει το συγκεκριμένο υλικό προς την αντίστοιχη χωρητικότητα όταν ανάμεσα στους οπλισμούς υπάρχει το κενό.

Οι πυκνωτές είναι διατάξεις που αποθηκεύουν ηλεκτρική ενέργεια. Ένας επίπεδος πυκνωτής αποτελείται από δύο παράλληλες μεταλλικές πλάκες (οπλισμούς) μεταξύ των οποίων αναπτύσσεται το διηλεκτρικό. Η όλη διάταξη θεωρούμε πως βρίσκεται στο κενό, άρα μεταξύ των δύο πλακών ο συντελεστής ηλεκτρικής

διαπερατότητας είναι ϵ_0 . Στην περίπτωση όπου αντικατασταθεί το κενό με οποιοδήποτε άλλο διηλεκτρικό, ο συντελεστής αυτός ορίζεται ως:

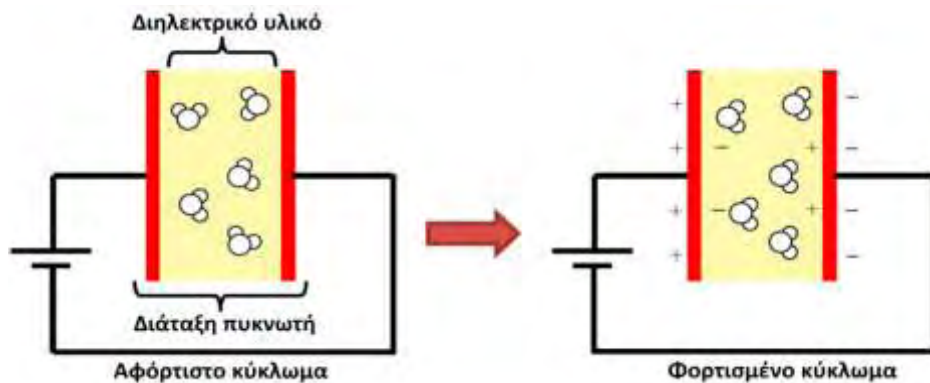
$$\epsilon = (1 + \chi)\epsilon_0 \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

Μπορούμε να θεωρήσουμε τον κάθε οπλισμό φορτισμένο με ένα φορτίο Q (στον θετικά φορτισμένο πόλο θα είναι $+Q$ και στον αρνητικά φορτισμένο πόλο θα είναι $-Q$). Η διαφορά δυναμικού που θα έχει δημιουργηθεί μεταξύ των δύο οπλισμών θα συμβολιστεί με V . Οπότε η χωρητικότητα C του πυκνωτή στο κενό θα είναι η:

$$C = \frac{Q}{V} \quad (\text{Εξίσωση 3})$$

Αν στην διάταξη αυτή τοποθετήσουμε ένα υλικό, πολικό ή μη πολικό, τότε αυτό θα πολωθεί υπό την επίδραση του σταθερού εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι το φορτίο του πυκνωτή ανά μονάδα επιφάνειας θα αυξηθεί κατά P (πόλωση του υλικού, ορίζεται ως το πηλίκο της διπολικής ροπής ανά μονάδα όγκου).

$$Q' = Q + P \quad (\text{Εξίσωση 4})$$



Εικόνα Α.7. Το διηλεκτρικό υλικό πολώνεται υπό την επίδραση σταθερού εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου

Η διαφορά δυναμικού μεταξύ των πλακών θεωρούμε πως παραμένει ίδια. Οπότε η συνολική χωρητικότητα του πυκνωτή θα αυξηθεί, και θα δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$C = \frac{Q'}{V} = \frac{Q+P}{V} \quad (\text{Εξίσωση 5})$$

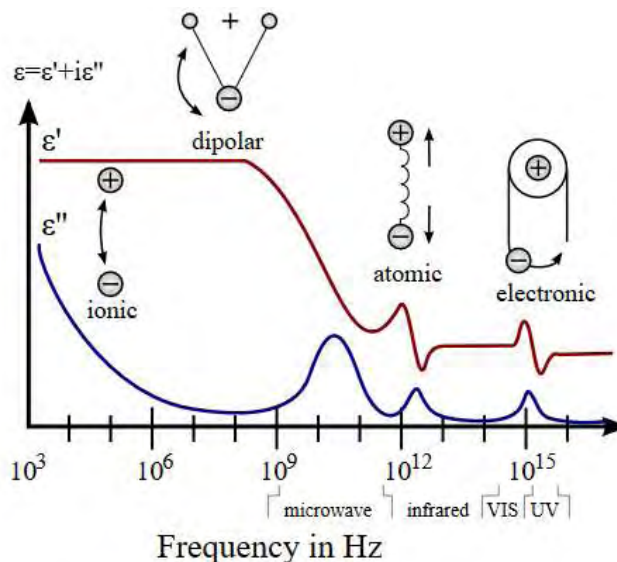
Η στατική διηλεκτρική σταθερά ορίζεται ως:

$$\epsilon = \frac{C}{C_0} = \frac{Q+P}{Q} \quad (\text{Εξίσωση 6})$$

Με άλλα λόγια η διηλεκτρική σταθερά αποτελεί ένα μέτρο που εκφράζει πόσο εύκολα μπορεί ένα υλικό να πολωθεί, όταν σε αυτό εφαρμόζουμε ηλεκτρικό πεδίο.

12. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία - Μέθοδος

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, το υπό μελέτη υλικό τοποθετείται σε μια κυψελίδα ανάμεσα στους οπλισμούς ενός πυκνωτή, ως μέρος ενός ηλεκτρικού κυκλώματος. Έπειτα στο κύκλωμα εφαρμόζεται τάση. Από την μέτρηση μεγεθών, όπως η αγωγιμότητα και η χωρητικότητα, που χαρακτηρίζουν ένα ηλεκτρικό κύκλωμα, μπορούν να υπολογιστούν και με τους τύπους που προαναφέρθηκαν οι εξαρτώμενες από την συχνότητα διηλεκτρικές σταθερές. Οι διηλεκτρικές μετρήσεις γίνονται στην περιοχή συχνοτήτων έως τα 10^{11} Hz.



Εικόνα Α.8. Διακύμανση τιμών του πραγματικού (ϵ') και του φανταστικού (ϵ'') μέρους του συντελεστή ηλεκτρικής διαπερατότητας (ϵ) σε διάφορες διεργασίες όπως ιοντική και διπολική χαλάρωση, ατομικό και ηλεκτρονιακό συντονισμό.

Όταν ένα σύστημα μορίων βρεθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, όλα τα φορτισμένα σωματίδια θα δεχθούν δυνάμεις που θα τείνουν να τα μετακινήσουν κατά μήκος του πεδίου. Τα σωματίδια αυτά μετακινούνται το καθένα σε διαφορετικό βαθμό, συνεισφέροντας έτσι στην πόλωση του υλικού. Στην διαδικασία της πόλωσης συμμετέχουν οι κάτωθι μηχανισμοί:

- Η πόλωση προσανατολισμού, όταν στο σύστημα υπάρχουν μόνιμα μοριακά δίπολα.
- Η ηλεκτρονιακή πόλωση, που οφείλεται στην μετατόπιση του ηλεκτρονιακού νέφους σε σχέση με τον πυρήνα στα άτομα.
- Η ατομική ή ιοντική πόλωση, που οφείλεται στην μετατόπιση των ιόντων στους κρυστάλλους ή στην μετατόπιση των ατόμων με διαφορετική ηλεκτραρνητικότητα μεταξύ τους.
- Η πόλωση φορτίων χώρου, που οφείλεται στην μακροσκοπική μετακίνηση φορτίων λόγω αγωγιμότητας και στην σταθεροποίησή τους σε διαχωριστικές επιφάνειες.^{[22][23]}

13. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία - Εφαρμογές

Ο χαρακτηρισμός των διηλεκτρικών ιδιοτήτων έχει μεγάλο ενδιαφέρον για πολλές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα σε μονωτικά υλικά, σε ενεργά διηλεκτρικά υλικά και στην μελέτη των μηχανισμών μοριακής κινητικότητας σε ένα υλικό. Αντλείται πληροφορία για την σύνθεση, τη δομή, την μορφολογία και τις ιδιότητες του προς μελέτη υλικού. Η πληροφορία αυτή είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και δημιουργία προϊόντων με προκαθορισμένες και επιθυμητές ιδιότητες.^[24] Στην ιατρική η γνώση των διηλεκτρικών ιδιοτήτων των διαφόρων ιστών αξιοποιείται τόσο στην ανάπτυξη διαγνωστικών όσο και θεραπευτικών τεχνικών^[41,42]. Το κύριο πλεονέκτημα της διηλεκτρικής φασματοσκοπίας σε σχέση με άλλες τεχνικές μελέτης μοριακής κινητικότητας, είναι το μεγάλο εύρος στην περιοχή που μπορεί να μεταβληθεί η συχνότητα διέγερσης του εφαρμοζόμενου πεδίου.^[25]

14. Η Διηλεκτρική φασματοσκοπία - Προσομοιώσεις

Η διηλεκτρική σταθερά και η αγωγιμότητα των βιολογικών μορίων είναι στοιχεία που ενδιαφέρουν τους επιστήμονες να τα μελετήσουν, τόσο σε θεωρητικό

όσο και σε πειραματικό επίπεδο. Μέχρι σήμερα υπάρχει πληθώρα υποθέσεων για την διηλεκτρική απόκριση των βιομορίων. Πειραματικά όμως, οι τιμές αυτές δύσκολα προσδιορίζονται, λόγω παρουσίας διαλύτη και ιόντων στο περιβάλλον, παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα. Γι' αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητη η χρήση των ΠΜΔ.^[26] Η διηλεκτρική συνάρτηση υπολογίζεται με τη βοήθεια των συναρτήσεων χρονικής συσχέτισης των διπολικών ροπών ολόκληρου ή μερών ενός συστήματος για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης. Αυτές οι συναρτήσεις έχουν συνήθως μορφή εκθετικής πτώσης με σταθερά χρόνου που λέγεται "χρόνος χαλάρωσης τ ". Κάθε σύστημα ή μέρος του συστήματος δίνει τους δικούς του χρόνους τ , οι οποίοι αντιστοιχούν στις συχνότητες f των κορυφών ενός διηλεκτρικού φάσματος αντιστοιχούν. Οι χρόνοι χαλάρωσης συνδέονται με το πόσο γρήγορα μπορούν να περιστρέφονται πολικά μόρια ή και ομάδες.

15. Η ακτινική συνάρτηση κατανομής (RPDF) - Ορισμός

Στην στατιστική μηχανική, η ακτινική συνάρτηση κατανομής (Radial Pair Distribution Function – RPDF ή RDF) σε ένα σύστημα σωματιδίων (άτομα, μόρια) περιγράφει το πώς μεταβάλλεται η πυκνότητα σε συνάρτηση με την απόσταση από ένα σωματίδιο αναφοράς. Είναι δηλαδή μια μέθοδος για να υπολογιστεί η πιθανότητα να βρεθεί ένα συγκεκριμένο σωματίδιο σε κάποια απόσταση μακριά από ένα δεδομένο σωματίδιο αναφοράς. Για τον καθορισμό της RDF υπολογίζονται οι αποστάσεις όλων των ζευγών των σωματιδίων που μας ενδιαφέρουν και παρουσιάζονται διαγραμματικά σε ένα ιστόγραμμα, όπου στον κάθετο άξονα αναπαρίσταται η πιθανότητα εύρεσης του σωματιδίου, και στον οριζόντιο η απόσταση.^{[27][28]}

16. Η ακτινική συνάρτηση κατανομής (RPDF) – Υπολογισμός

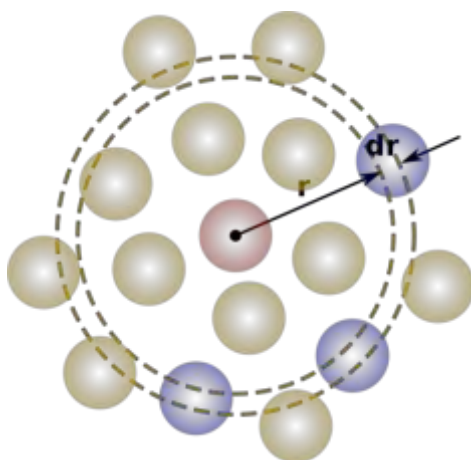
Η RDF μπορεί να υπολογιστεί είτε με μεθόδους προσομοιώσεων, όπως οι ΠΜΔ και Monte Carlo σε υπολογιστή, είτε με την εξίσωση Ornstein-Zernike κατά προσέγγιση. Μπορεί επίσης να προσδιοριστεί πειραματικά, με τεχνικές μεθόδους σκέδασης ακτινοβολίας ή με άμεση οπτικοποίηση όταν τα προς μελέτη σωματίδια έχουν αρκετά μεγάλο μέγεθος της τάξεως του μm , μέσω μικροσκοπίας. Γίνεται να καθοριστεί και έμμεσα με την χρήση δεδομένων από πειραματικές διαδικασίες

σκέδασης νετρονίων ή σκέδασης ακτινών X. Τα αποτελέσματα του υπολογισμού της RDF μπορούν να βοηθήσουν στην σύνδεση μικροσκοπικών με μακροσκοπικών ιδιοτήτων σε ένα σύστημα.

Ο αριθμός των σωματιδίων $dn(r)$ σε κέλυφος πάχους dr σε απόσταση r από δεδομένο άτομο θα είναι:

$$dn(r) = \frac{N}{V} g(r) 4\pi r^2 dr \quad (\text{Εξίσωση 7})$$

$g(r)$ είναι η ακτινική συνάρτηση κατανομής και N το συνολικό πλήθος των σωματιδίων σε όγκο V .



Εικόνα A.9. Σε ομοιογενές υλικό, το $g(r)$ αντιπροσωπεύει την πιθανότητα να βρεθεί ένα άτομο σε ένα κέλυφος dr για απόσταση r ενός άλλου ατόμου που επιλέγεται ως σημείο αναφοράς.

B. ΜΕΘΟΔΟΙ - ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

1. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

Η κίνηση των μορίων ενός συστήματος μπορεί να αναπαραχθεί μέσω επίλυσης των εξισώσεων κίνησης των σωματιδίων του με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών. Μέσω της μεθόδου των ΠΜΔ επιλύονται οι εξισώσεις του Νεύτωνα για κάθε σωματίδιο στον χρόνο μέσω υπολογιστικών τεχνικών και παράγονται οι τροχιές για τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων, καθώς και της μέσης μοριακής δομής. Επίσης, υπολογίζονται δυναμικές ιδιότητες που εξαρτώνται από τον χρόνο, όπως οι συναρτήσεις συσχέτισης ιδιοτήτων και οι συντελεστές μεταφοράς. Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από την καταλληλότητα των διατομικών/διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, αλλά και την ακρίβεια και ταχύτητα των υπολογιστικών μεθόδων. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ΠΜΔ, οι αρχές της οποίας περιγράφονται συνοπτικά στις ακόλουθες γραμμές.

Με την ανάπτυξη των υπολογιστικών δυνατοτήτων και της μνήμης των ηλεκτρονικών υπολογιστών έγινε δυνατή η αναπαραγωγή των μακροσκοπικών ιδιοτήτων μέσω προσομοίωσης της μοριακής κίνησης αριθμητικά. Στις ΠΜΔ αποθηκεύονται στον Η/Υ οι θέσεις και οι ορμές των σωματιδίων ενός μικρού τμήματος του μακροσκοπικού συστήματος. Η εξέλιξη στον χρόνο επιτελείται με βάση τις μοριακές αλληλεπιδράσεις μέσω της αριθμητικής επίλυσης των εξισώσεων κίνησης σε μικρά βήματα χρόνου όλων των σωματιδίων του συστήματος. Προβλέπονται οι τροχιές των σωματιδίων και επομένως, οι ιδιότητες των καταστάσεων του συστήματος. Η δυνατότητα αυτή κατατάσσει τις μοριακές προσομοιώσεις ανάμεσα στο πείραμα και στην αναλυτική θεωρία. Επίσης, επιτρέπει την απευθείας συσχέτιση του μακρόκοσμου με τις μοριακές αλληλεπιδράσεις και την ανάπτυξη πειραματικών τεχνικών και θεωρητικών μεθόδων για την ερμηνεία των φυσικών φαινομένων. Κύριο ενδιαφέρον στις προσομοιώσεις έχει η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, η ταχύτητα των υπολογισμών και η απλότητα των εξισώσεων που περιγράφουν τη μοριακή κίνηση.

Διακρίνονται δύο μέθοδοι μοριακών προσομοιώσεων, αυτή της μοριακής δυναμικής και αυτή των τυχαίων καταστάσεων-Monte Carlo. Θεωρητικά η αλληλουχία των θέσεων των σωματιδίων του συστήματος που παράγονται από την

προσομοίωση είναι σαν διαδοχικές εικόνες ενός βίντεο που παρουσιάζει την κίνηση στον χρόνο.

Η κίνηση των μορίων ενός φυσικού συστήματος εξαρτάται από τη δομή τους, τις αλληλεπιδράσεις τους και πιθανές εξωτερικές δυνάμεις που επιδρούν στο μοριακό σύστημα. Η μοριακή δομή καθορίζει τους βαθμούς ελευθερίας του συστήματος. Δεδομένης της δομής των μορίων, απαιτείται ο καθορισμός των αλληλεπιδράσεων. Οι ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις εκφράζονται μέσω κατάλληλης συνάρτησης δυναμικής ενέργειας (force field) που έχει όρους εξαρτώμενους από τις θέσεις των σωματιδίων και από την οποία υπολογίζονται οι συνισταμένες δυνάμεις και ροπές που ασκούνται σε κάθε σωματίδιο.

Βασικό στοιχείο των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής είναι η ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης στον χρόνο, κατά μικρά χρονικά διαστήματα, με κατάλληλη αριθμητική ανάπτυξη των διαφορικών των εξισώσεων. Στην απλούστερη περίπτωση, η εξίσωση του Νεύτωνα για το κέντρο βάρους ενός μορίου συνδέει την επιτάχυνση γ με τη δύναμη F που δέχεται το μόριο από τα άλλα μόρια:

$$m\gamma = \mathbf{F} \quad (\text{Εξίσωση 8})$$

και για μία διεύθυνση x ισχύει:

$$m \frac{d^2 x(t)}{dt^2} = F_x(t) \quad (\text{Εξίσωση 9})$$

Ανάλογη σχέση ισχύει και στις άλλες διευθύνσεις.

Εάν είναι γνωστή η θέση και η ταχύτητα για μία χρονική στιγμή t , η παραπάνω εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της θέσης και της ορμής σε μία επόμενη χρονική στιγμή " $t+\Delta t$ ".

Η διαδικασία αριθμητικής ολοκλήρωσης είναι βασική για μία μέθοδο προσομοίωσης μοριακής δυναμικής γιατί καθορίζει την ακρίβεια και την ταχύτητα της μεθόδου. Το απλούστερο μοριακό σύστημα που παρουσιάζει μεταφορικούς, περιστροφικούς και δονητικούς βαθμούς ελευθερίας είναι το διατομικό μόριο.

Όταν η κατάσταση ισορροπίας καθορίζεται με μεταβλητές την ενέργεια, τον όγκο και τον αριθμό των σωματιδίων, η μοριακή κίνηση του συστήματος περιγράφεται άμεσα μέσω της κλασικής μηχανικής, αφού οι μεταβλητές αυτές

ορίζονται στη μηχανική. Μπορεί άρα να θεωρηθεί η κίνηση σε ένα κλειστό σύστημα, αφού ορισθούν οι αρχικές τιμές των θέσεων και των χρονικών παραγώγων των θέσεων, έτσι ώστε οι E , V και N να λάβουν συγκεκριμένες τιμές. Επειδή δεν είναι δυνατή η προσομοίωση της κίνησης όλων των μορίων μιας μακροσκοπικής ποσότητας ύλης, θεωρούμε έναν μικρότερο όγκο V του φυσικού συστήματος, που μπορεί να περιέχει μια μικρή ποσότητα μορίων και θέτουμε περιοδικές οριακές συνθήκες (Periodic Boundary Conditions, PBC) για τις μεταβλητές θέσης. Οπότε, ενώ παρακολουθούνται οι μεταβλητές σε έναν όγκο, ο συνολικός χώρος διαχωρίζεται θεωρητικά σε τριδιάστατους κύβους-κυψελίδες. Οι περιοδικές συνθήκες διευκολύνουν τους υπολογισμούς, αφού δεν απαιτείται η χρήση περιοριστικών δυναμικών ή άλλων τεχνικών που να αναπαράγουν τη φύση των τοιχωμάτων.

Η ενέργεια του συστήματος, που αποτελείται από την κινητική και τη δυναμική ενέργεια, K και U αντίστοιχα, δεν είναι εύκολο να προκαθορισθεί εξ αρχής, λόγω του ότι οι αρχικές θέσεις των σωματιδίων καθορίζονται σε κάποιο βαθμό τυχαία, με συνέπεια η δυναμική ενέργεια να είναι ακαθόριστη. Όμως με τη χρήση τεχνικών διόρθωσης της κινητικής ενέργειας, είναι εφικτό να ρυθμιστεί η συνολική ενέργεια, αφού η σχέση U και K είναι συγκεκριμένη. Τέλος, η κινητική ενέργεια ρυθμίζεται μέσω των ταχυτήτων, αφού:

$$K = \sum_i \frac{1}{2} m u_i^2 \quad (\text{Εξίσωση 10})$$

Η γνώση των θέσεων και των ταχυτήτων όλων των σωματιδίων στον χρόνο, που υπολογίζονται μέσω της ΠΜΔ, μας δίνει τη δυνατότητα να υπολογίσουμε τις μέσες μοριακές ιδιότητες και τη δυναμική τους, καθώς και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των καταστάσεων ενός μακροσκοπικού συστήματος.

Στις προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικού Charmm 27 (force field). Ένα force field περιλαμβάνει όρους που περιγράφουν την εξάρτηση της δυναμικής ενέργειας από την θέση τόσο μεταξύ ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό (bonded), όσο και μεταξύ ατόμων που δεν συνδέονται ομοιοπολικά (non bonded). Οι εξισώσεις αυτές παρουσιάζονται κάτωθι.

$$v^{LJ}(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (\text{Εξίσωση 11})$$

Η εξίσωση 11 αφορά στην δυναμική ενέργεια λόγω αλληλεπιδράσεων Van der Waals και το δυναμικό αυτό ονομάζεται Lennard-Jones. Όπου σ είναι η απόσταση στην οποία η δυναμική ενέργεια μεταξύ δύο ατόμων ισούται με το μηδέν. Το ε εκφράζει την ενέργεια και το r είναι η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων.

Μια άλλη μορφή της εξίσωσης για τον υπολογισμό του δυναμικού Lennard-Jones περιγράφεται στην εξίσωση 12:

$$V_{(\text{Lennard-Jones})} = E \cdot [(r_{\min}/r)^{12} - 2 \cdot (r_{\min}/r)^6] \quad (\text{Εξίσωση 12})$$

Η εξίσωση 12 είναι αυτή που χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα NAMD που περιγράφεται και κάτωθι. Συγκεκριμένα στο πρόγραμμα NAMD, όπου E μετριέται σε Kcal/mol και r και r_{\min} σε Angstrom. Όταν $r = r_{\min}$, η δύναμη είναι μηδενική και η ενέργεια ισούται με $-E$.

$$v^{Coulomb}(r) = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\varepsilon_0 r} \quad (\text{Εξίσωση 13})$$

Η εξίσωση 13 αφορά στην δυναμική ενέργεια λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που διέπονται από τον νόμο Coulomb. Όπου Q_1 και Q_2 είναι τα ηλεκτρικά φορτία των δύο ατόμων, το r είναι η απόσταση μεταξύ τους και το ε_0 είναι η διηλεκτρική σταθερά στο κενό.

$$v_{bonded} = \frac{1}{2} \sum_{bonds} k_{ij}^r (r_{ij} - r_{eq})^2 + \frac{1}{2} \sum_{angles} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 + \sum_{impropers} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{angles} \sum_m k_{ijkl}^{\varphi,m} (1 + \cos(m\varphi_{ijkl} - \gamma_m)) \quad (\text{Εξίσωση 14})$$

Η εξίσωση 14 αφορά στην δυναμική ενέργεια λόγω αλληλεπίδρασης ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό, και αποτελείται από τέσσερις όρους. Ο

πρώτος περιγράφει την δυναμική ενέργεια λόγω απομάκρυνσης των ατόμων από την θέση ισορροπίας στον ομοιοπολικό δεσμό, ο δεύτερος την δυναμική ενέργεια λόγω κάμψεων, ο τρίτος την δυναμική ενέργεια λόγω παραμόρφωσης καταχρηστικών γωνιών και τέταρτος την δυναμική ενέργεια λόγω στρέψεων με άξονα τον δεσμό.

Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής κατά το πρώτο στάδιο, εισάγονται οι μεταβλητές που ορίζουν την κατάσταση ισορροπίας του συστήματος, π.χ. E, V, N, τις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, καθώς και λειτουργικές παράμετροι, όπως ο αριθμός των χρονικών βημάτων, το χρονικό διάστημα ενός βήματος κλπ.

Ακολουθεί ένα δεύτερο στάδιο μεγάλης διάρκειας, όπου κατ' αρχάς παράγονται αρχικές τιμές για τις ταχύτητες των ατόμων με τη χρήση τυχαίων αριθμών, ακολούθως ολοκληρώνονται οι εξισώσεις κίνησης για ένα μεγάλο αριθμό βημάτων και υπολογίζονται οι τροχιές όλων των σωματιδίων. Οι συντεταγμένες των ατόμων του συστήματος (και οι ταχύτητες εάν χρειασθεί) αποθηκεύονται σε τακτά χρονικά διαστήματα (π.χ. κάθε 500 βήματα) σε αρχεία που ονομάζονται τροχιές της προσομοίωσης (trajectories).^[30-34]

2. Chimera

Το πρόγραμμα Chimera χρησιμοποιήθηκε για οπτική απεικόνιση των αρχείων pdb της εκτοΐνης και των διαλυμάτων που κατασκευάστηκαν. Προσφέρει εικόνες υψηλής ποιότητας και κινούμενων γραφικών, διαδραστική απεικόνιση της δομής των μορίων και αναλυτικές πληροφορίες όπως ηλεκτρονιακή πυκνότητα, διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, αποτελέσματα docking, αλληλουχίες.^[3]

3. Arguslab

Πρόκειται για ένα πρόγραμμα που χρησιμοποιείται επίσης για την απεικόνιση αλλά και τον σχεδιασμό μοριακών μοντέλων με εύχρηστο γραφικό περιβάλλον. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την κατασκευή μοντέλων φαρμακευτικών ουσιών. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί αλγόριθμους για μοντελοποίηση που συνδυάζουν την κβαντική με την κλασσική μηχανική.^[4]

4. Rasmol

Το πρόγραμμα Rasmol είναι ένα εύχρηστο πρόγραμμα απεικόνισης και οπτικοποίησης βιολογικών μορίων, χρησιμοποιώντας αρχεία μοριακών συντεταγμένων όπως pdb, mol2. Προσφέρει πληθώρα επιλογών σε χρώματα και σχήματα.^[5]

5. VMD

Το VMD είναι ένα πρόγραμμα γραφικής απεικόνισης μορίων. Το χρησιμοποιήσαμε για την οπτικοποίηση των αρχείων που χρησιμοποιήσαμε, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής που εκτελέσαμε, καθώς και για τους υπολογισμούς RDF, το μέγεθος του κελιού για τις προσομοιώσεις. Δίνει επίσης την δυνατότητα εκτέλεσης εντολών μέσω scripts σε γλώσσες όπως Tcl και Python, με τα οποία μπορούμε να επεξεργαστούμε τα δεδομένα που εξάγαμε από τις προσομοιώσεις που εκτελέσαμε. Το πρόγραμμα μπορεί να φορτώσει τροχιές από προγράμματα μοριακών προσομοιώσεων.^[6]

6. NAMD

Το πρόγραμμα NAMD εκτελεί προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Υπολογίζει τις ατομικές τροχιές επιλύοντας εξισώσεις μηχανικής – κινηματικής με την βοήθεια πεδίων όπως το Charmm Force Field. Μας δίνει την δυνατότητα να εκτελούμε προσομοιώσεις με μεγάλο αριθμό ατόμων στο σύστημα που δημιουργούμε, απαιτεί όμως μεγάλη επεξεργαστική ισχύ. Το NAMD ενσωματώνει τον αλγόριθμο Particle Mesh Ewald (PME), ο οποίος λαμβάνει υπόψη όλες τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και μειώνει την υπολογιστική πολυπλοκότητα. Λειτουργεί και σε συνεργασία με το VMD.^[7]

7. Psfgen

Με το πρόγραμμα Psfgen μπορούμε να δημιουργήσουμε αρχεία συνδεσμολογίας psf έχοντας ως πρώτη ύλη αρχεία pdb και τοπολογία του force field που χρησιμοποιούμε. Τα αρχεία psf που δημιουργούμε μέσω του psfgen, τα

χρησιμοποιούμε μετέπειτα για την εκτέλεση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής.^[8]

8. Packmol

Το Packmol με τις κατάλληλες εντολές δημιουργεί αρχεία pdb και psf στα οποία περιλαμβάνεται, εκτός από την διαλυμένη ουσία, και ο επιθυμητός αριθμός μορίων του διαλύτη καθώς και ιόντων. Τα αρχεία που δημιουργήσαμε από το packmol, τα χρησιμοποιήσαμε μετέπειτα για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής που εκτελέσαμε.^[1]

Γ. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

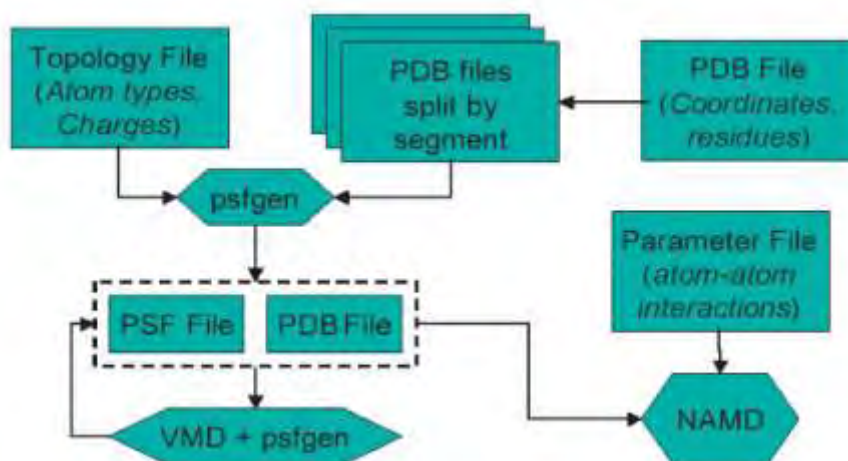
1. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων – Αρχεία PDB και PSF

Για να εκτελεστούν οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, είναι απαραίτητο να υπάρχουν αρχικά τα επιθυμητά μοντέλα των μορίων σε αρχεία pdb και psf. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκε το αρχείο pdb της εκτοΐνης, του H₂O και του D₂O από την βάση δεδομένων PDB.

Ένα αρχείο pdb περιέχει μόνο τις συντεταγμένες των ατόμων ενώ ένα αρχείο psf περιέχει πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων (συνδεσμολογία). Για να πραγματοποιηθεί μια προσομοίωση είναι απαραίτητο να υπάρχουν και οι δύο αυτοί τύποι αρχείων.

Το αρχείο psf δημιουργήθηκε με την χρήση του προγράμματος psfgen, βασισμένο στο αρχικό pdb και σε ένα αρχείο τοπολογίας. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, επειδή χρησιμοποιήθηκε το Charmm 27 force field, επιλέχθηκε το top_all27_prot_na.inp.

Με την χρήση ενός tcl script, του αρχείου pdb που υπάρχει και του προγράμματος psfgen, δημιουργήθηκε το επιθυμητό αρχείο psf καθώς και ένα νέο αρχείο pdb, το οποίο περιέχει και τις συντεταγμένες των ατόμων υδρογόνου που απουσίαζαν. Το tcl script βρίσκεται στο παράρτημα.



Εικόνα Γ.1. Ο ρόλος των αρχείων όπως χρησιμοποιούνται από τα προγράμματα VMD, NAMD και psfgen

2. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων - Παράμετροι εκτοΐνης

Για την εκτέλεση των ΠΜΔ απαιτούνται παράμετροι για όλα τα μόρια που θα συμμετέχουν σε αυτές. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρειάστηκαν παράμετροι για την εκτοΐνη, το H₂O και το D₂O.

Για την εύρεση παραμέτρων της εκτοΐνης χρησιμοποιήθηκε αρχικά το swissparam^[39]. Στο swissparam ανέβηκε το αρχείο της εκτοΐνης αλλά αντί για την μορφή pdb, είχε μετατραπεί πρώτα σε mol2. Η μετατροπή αυτή έγινε μέσω του προγράμματος Chimera. Ιδιαίτερη προσοχή θέλει αυτό το βήμα, διότι στο αρχείο mol2 θα πρέπει να εμπεριέχονται τα υδρογόνα. Αφού ολοκληρωθεί η δημιουργία των παραμέτρων, μπορούμε να τις κατεβάσουμε και είναι έτοιμες προς χρήση.

Το όνομα του μορίου της εκτοΐνης στα παραπάνω αρχεία ορίζεται ως 4CS.

3. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων - Παράμετροι H₂O

Σε όλες τις προσομοιώσεις παρουσία H₂O χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο νερού TIP3P. Για το TIP3P, καθώς χρησιμοποιείται ευρέως σε ΠΜΔ, υπάρχουν ήδη έτοιμες παράμετροι, οι οποίες βρίσκονται στο αρχείο par_all27_prot_na.inp.

4. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων - Παράμετροι D₂O

Για το D₂O δεν υπάρχουν παράμετροι σε έτοιμη μορφή, οπότε έπρεπε να κατασκευαστούν. Η διαδικασία της παραμετροποίησης που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

Στο αρχείο παραμέτρων του CHARMM force field εμπεριέχονται όλες οι απαραίτητες αριθμητικές σταθερές που χρειάζονται για τους υπολογισμούς των δυνάμεων και των ενεργειών από ένα αρχείο psf και τις συντεταγμένες των ατόμων.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, χρησιμοποιήθηκε η έκδοση CHARMM force field 27.

Από το αρχείο παραμέτρων του CHARMM27 force field, που εμπεριέχει πληροφορίες για πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα, νερό όπως και ιόντα, χρησιμοποιήθηκε το par_all27_prot_na.inp και τροποποιήθηκαν (προστέθηκαν) μόνο οι πληροφορίες που αφορούν στο D₂O.

Αναζητήσαμε πληροφορίες για τις φυσικοχημικές ιδιότητες του H₂O και του D₂O ώστε να μπορέσει να γίνει η σύγκριση.^[16]

Πίνακας Γ.2. Σύγκριση βασικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του H₂O και του D₂O που αξιοποιήθηκαν στην παραμετροποίηση

Μέγεθος	H ₂ O	D ₂ O
Μοριακό Βάρος	18.015 g/mol	20.027 g/mol
Αποδέκτες ηλεκτρονίων σε δεσμούς υδρογόνου	1	1
Μονοϊσοτοπική Μάζα	18.011 g/mol	20.023 g/mol
Ακριβής Μάζα	18.011 g/mol	20.023 g/mol
Αριθμός ισότοπων ατόμων	0	2
Ομοιοπολικοί δεσμοί	1	1
Πυκνότητα	1	1.1044 at 25 deg C.
Γωνία δεσμού	H-O-H bond angle 105.5°	D-O-D bond angle 106°
Μάζα ατόμου του υδρογόνου και του δευτερίου	1.00794 u	2.01410178 u
Μήκος δεσμού	O-H bond length (liquid), 0.991 Å	O-D bond length (liquid), 0.970 Å 0.985 Å
Διπολική ροπή	liquid: 2.95±0.2 D* (27 °C) gas: 1.85498 D*	gas: 1.87 D*

* D είναι η μονάδα διπολικής ροπής Debye = 0.20819434 eÅ = 3.33564×10⁻³⁰ C·m

Στο αρχείο παραμέτρων υπάρχουν δεδομένα που αφορούν στους δεσμούς (BONDS) ανάμεσα σε ένα ζεύγος ατόμων, μια σταθερά ελατηρίου (για την ‘ταλάντωση’) και ένα μήκος ισορροπίας. Η συνάρτηση των δεσμών (BOND) περιγράφεται ως:

$$V_{(\text{bond})} = K_b \cdot (b - b_0)^2 \quad (\text{Εξίσωση 15})$$

όπου b ορίζεται το μήκος του δεσμού σε Angstroms και K_b η σταθερά του ελατηρίου σε kcal/mol/Å². Το δυναμικό των δεσμών αποδίδεται ακριβώς μόνο για τιμές κοντά στο μήκος ισορροπίας.

Η μονάδα ενέργειας που χρησιμοποιείται στο CHARMM force field είναι το kcal/mol και για το μήκος χρησιμοποιείται το Angstrom. Άρα πρέπει να γίνει

κατάλληλη μετατροπή μονάδων πριν τροποποιηθεί το αρχείο παραμέτρων, ώστε τα νέα δεδομένα που θα εισαχθούν να είναι στις σωστές μονάδες μέτρησης.

Αμέσως μετά βρίσκουμε δεδομένα που αφορούν στις κάμψεις των γωνιών (ANGLES) που σχηματίζονται από τρία διαδοχικά άτομα που συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς. Γνωρίζοντας ότι οι γωνίες σχηματίζονται από συνδυασμό μεταξύ δεσμών, υπάρχουν πολλοί περισσότεροι τύποι γωνιών απ' ότι τύποι δεσμών. Στην δική μας περίπτωση, ενδιαφέρουν μόνο οι γωνίες που σχηματίζονται μεταξύ H-O-H και D-O-D. Η συνάρτηση δυναμικού για τις γωνίες περιγράφεται ως:

$$V_{(\text{angle})} = K_{\theta} \cdot (\theta - \theta_0)^2 \quad (\text{Εξίσωση 16})$$

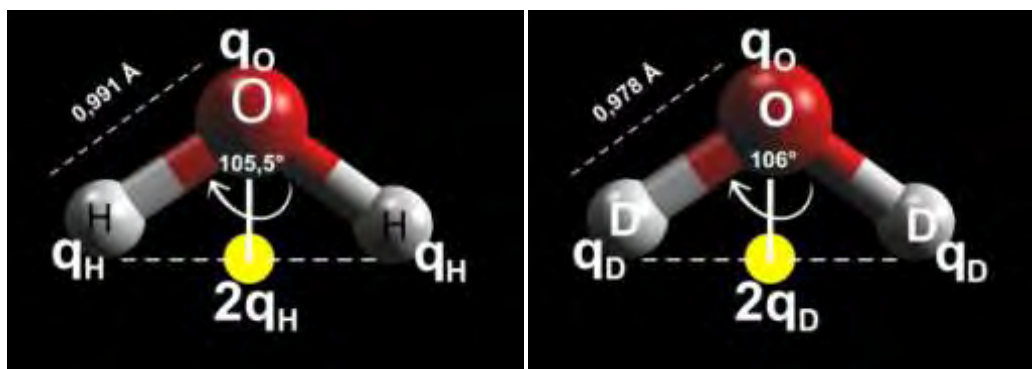
όπου θ ορίζεται το μέτρο της γωνίας σε μοίρες και K_{θ} η σταθερά του ελατηρίου σε Kcal/mol/rad^2 . Και εδώ η ενεργειακή λειτουργία της γωνίας είναι ακριβής μόνο για τιμές κοντά στην γωνία ισορροπίας.

Έπειτα βρίσκονται οι παράμετροι αλληλεπίδρασης που αφορούν στα μη συνδεδεμένα με δεσμό άτομα (μη δεσμευμένα άτομα). Στο αρχείο αναφέρονται ως NONBONDED. Η λίστα περιέχει και παραμέτρους που χρησιμοποιούνται από το CHARMM αλλά αγνοούνται από το NAMD. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν τις δυνάμεις Coulomb μεταξύ των μερικών ηλεκτρικών φορτίων των ατόμων και τις Van Der Waals, οι οποίες εκφράζονται μέσω του δυναμικού Lennard-Jones, όπως περιγράφεται στην εξίσωση 12. Το μερικό ηλεκτρικό φορτίο του κάθε ατόμου καθορίζεται από το αρχείο τοπολογίας (topology file) και υπάρχει στα αρχεία psf.

Προσδιορισμός των μερικών ηλεκτρικών φορτίων των ατόμων του TP3D

Προκειμένου να υπολογίσουμε τα μερικά ηλεκτρικά φορτία για το D και το O στο μόριο D_2O , και απουσία πειραματικής τιμής για την ηλεκτρική διπολική ροπή του D_2O , βασιστήκαμε στην πειραματική τιμή της διπολικής ροπής του D_2O στην αέρια φάση $DM_{\text{D}_2\text{O}}^{\text{gas}}$ ($= 1.87 \text{ D}$). Είναι γνωστό, ότι το μοντέλο TIP3P προσπαθεί να μιμηθεί την συμπεριφορά του νερού στην υγρή φάση, όπου η $DM_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{liq}} = 2,95 \pm 0,2 \text{ D}$. Οι τιμές των φορτίων στο μοντέλο νερού TIP3P σε συνδυασμό με τα μήκη των δεσμών O-H ($0,991 \text{ \AA}$) και την γωνία H-O-H ($105,5^\circ$) καθορίζουν την διπολική του ροπή ($DM_{\text{TIP3}} = 0,5003166 \text{ e} \cdot \text{\AA} = 2,403123 \text{ D}$). Η τιμή αυτή προκύπτει

πολλαπλασιάζοντας την $DM_{H_2O}^{gas}$ με $\lambda = 0.771904$. Υποθέτοντας ότι ισχύει ο ίδιος λόγος λ και στην περίπτωση του D_2O , μπορούμε να προσδιορίσουμε την DM_{TIP3} από την $DM_{D_2O}^{gas}$. Τέλος από την DM_{TIP3} με βάση το γνωστό μήκος δεσμού O-D (0,978 Å) και την γνωστή γωνία D-O-D (106°) υπολογίζουμε τα μερικά ηλεκτρικά φορτία του D και O αντίστοιχα.



Εικόνα Γ.4. Απεικόνιση των γωνιών, των αποστάσεων, των μερικών ηλεκτρικών φορτίων και του ψευδοατόμου που χρησιμοποιήθηκαν στους υπολογισμούς για το μόριο του H_2O και του D_2O

Για την διευκόλυνση των υπολογισμών θεωρήσαμε την ισοδύναμη αναπαράσταση του διπόλου του νερού ως αποτελούμενου από δύο ηλεκτρικά φορτία, αυτό του οξυγόνου q_O και αυτό ενός ψευδοατόμου $2q_H$ στην μέση της απόστασης H -

$$DM_{H_2O}^{gas} = 1,85498 \text{ D} \quad DM_{D_2O}^{gas} = 1,87 \text{ D}$$

Για να υπολογιστεί η διπολική ροπή του μοντέλου D_2O (TP3D) από αυτήν στην αέρια φάση, υπολογίζουμε τον παράγοντα μετατροπής λ :

$$\lambda = \frac{DM_{H_2O}^{gas}}{DM_{TIP3}} = \frac{1,85498}{2,403123} = 0,771904$$

άρα η DM_{TP3D} θα υπολογιστεί ως εξής:

$$DM_{TP3D} = \frac{DM_{D_2O}^{gas}}{\lambda} = \frac{1,87}{0,771904} = 2,422468 \text{ D}$$

Επειδή $1 \text{ Debye} = 0,20819435 \text{ e} \cdot \text{Å}$, η διπολική ροπή DM_{TP3D} του μοντέλου TP3D σε μονάδες $\text{e} \cdot \text{Å}$ θα είναι $0,20819434 \cdot 2,422468 = 0.5043441 \text{ e} \cdot \text{Å}$.

Επίσης εφαρμόζοντας τριγωνομετρία στο μοντέλο του D₂O (Εικόνα Γ.4) υπολογίζουμε το μήκος του διπόλου:

$$d_{D_2O} = 0,978 \times \cos \frac{106^\circ}{2} = 0,5886 \text{ \AA}$$

Άρα στο μόριο του D₂O η απόσταση ανάμεσα στο άτομο του οξυγόνου και το ψευδοάτομο είναι 0,5886 Å. Ομοίως, εφαρμόζοντας τριγωνομετρία και στο μοντέλο του H₂O:

$$d_{H_2O} = 0,991 \times \cos \frac{105,5^\circ}{2} = 0,5999 \text{ \AA}$$

Άρα στο μόριο του H₂O η απόσταση d ανάμεσα στο άτομο του οξυγόνου και το ψευδοάτομο είναι 0,5999 Å.

Για τον υπολογισμό των μερικών φορτίων του οξυγόνου και των δευτερίων στο μόριο του D₂O, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος για την διπολική ροπή.

$$\begin{aligned} DM_{TP3D} &= 2q_D \cdot d_{D_2O} \rightarrow q_D = \frac{DM_{TP3D}}{2d_{D_2O}} \frac{D}{\text{\AA}} \rightarrow \\ q_D &\frac{0.5043441 \text{ e}\cdot\text{\AA}}{2 \cdot 0,5886 \text{ \AA}} \rightarrow \\ q_D &= 0,428427 \text{ e} \approx 0,428 \text{ e} \end{aligned}$$

Οπότε αντίστοιχα το μερικό φορτίο του οξυγόνου θα είναι:



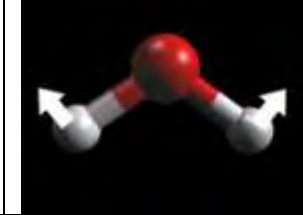
$$q_O = -0,856 \text{ e}$$

Στην συνέχεια υπολογίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις που αφορούν τους δεσμούς (BONDS) και τις γωνίες (ANGLES).

Προσδιορισμός των παραμέτρων K_b , K_θ του μοντέλου TP3D

Οι τιμές των παραμέτρων K_b , K_θ θα προσδιορισθούν με βάση τιμές από την βιβλιογραφία και κατ' αναλογία με τις αντίστοιχες του force field charmm για το TIP3P.

Πίνακας Γ.5. Αλληλεπιδράσεις και κινήσεις των υδρογόνων/δευτερίων στα μόρια του H_2O και του D_2O αντίστοιχα από πειραματικές τιμές.^[43]

Τρόποι δόνησης			
	Συμμετρική έκταση (για K_b)	Ασύμμετρη έκταση	Κάμψη (για K_θ)
			
$H_2O_{(gas)}$	3657 cm^{-1}	3756 cm^{-1}	1595 cm^{-1}
$H_2O_{(liq)}$	3490 cm^{-1}	3450 cm^{-1}	1645 cm^{-1}
$H_2O_{(sol)}$	3277 cm^{-1}		
$D_2O_{(gas)}$	2727 cm^{-1}		
$D_2O_{(liq)}$	2671 cm^{-1}	2788 cm^{-1}	1178 cm^{-1}

Οι τιμές του πίνακα Γ.5 είναι εκφρασμένες ως κυματαριθμοί (k). Χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις της κυματικής:

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \rightarrow \lambda = \frac{2\pi}{k} \quad (1)$$

$$c = \lambda f \rightarrow f = \frac{c}{\lambda} \quad (2)$$

$$f = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{K_b}{\mu}} \quad (3) \quad \text{όπου } \mu = \text{ανηγμένη μάζα}$$

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (4) \quad \text{για ένα σύστημα δύο σωμάτων}$$

- Για τον υπολογισμό του K_b λαμβάνεται υπόψη μόνο η συμμετρική έκταση, και στην ανηγμένη μάζα αντικαθιστούνται οι μάζες του οξυγόνου και του υδρογόνου/δευτερίου.
- Για τον υπολογισμό του K_θ λαμβάνεται υπόψη μόνο η κάμψη, και στην ανηγμένη μάζα αντικαθιστούμε με τις μάζες από τα υδρογόνα/δευτερία.

Με συνδυασμό των εξισώσεων (2) και (3):

$$\frac{c}{\lambda} = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{K_b}{\mu}} \quad \text{[χρήση της σχέσης (1)]} \rightarrow \frac{c \cdot k}{2\pi} = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{K_b}{\mu}} \rightarrow c \cdot k = \sqrt{\frac{K_b}{\mu}} \rightarrow$$

$$k = \frac{1}{c} \cdot \sqrt{\frac{K_b}{\mu}} \quad (5)$$

Διαιρέθηκαν κατά μέλη οι σχέσεις (5) για το H₂O και το D₂O.

$$\frac{\frac{k_{H_2O}}{k_{D_2O}}}{\frac{1}{c} \cdot \sqrt{\frac{K_{b,D_2O}}{\mu_{D_2O}}}} = \frac{\frac{1}{c} \cdot \sqrt{\frac{K_{b,H_2O}}{\mu_{H_2O}}}}{\sqrt{\frac{K_{b,H_2O} \cdot \mu_{D_2O}}{K_{b,D_2O} \cdot \mu_{H_2O}}}} \rightarrow K_{b,D_2O} = \frac{k_{D_2O}^2 \cdot \mu_{D_2O}}{k_{H_2O}^2 \cdot \mu_{H_2O}} K_{b,H_2O}$$

Αντίστοιχα και για το K_θ με την ίδια μεθοδολογία θα προκύψει η σχέση:

$$K_{\theta,D_2O} = \frac{k_{D_2O}^2 \cdot \mu_{D_2O}}{k_{H_2O}^2 \cdot \mu_{H_2O}} K_{\theta,H_2O}$$

Ως γνωστόν:

$$c = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$$

$$1 \text{ unit} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$$

$$1 \text{ m} = 10^{10} \text{ \AA}$$

Ο υπολογισμός του K_{b,D₂O} έγινε με την χρήση της τιμής K_{b,H₂O} και έναν διορθωτικό παράγοντα που θα υπολογιστεί από τους κυματάριθμους και το αρχείο παραμέτρων.

Symmetric stretch – Bonds

$$K_{b,D_2O} = \frac{k_{D_2O}^2 \cdot \mu_{D_2O}}{k_{H_2O}^2 \cdot \mu_{H_2O}} K_{b,H_2O} = \frac{k_{D_2O}^2 \cdot \frac{m_O \cdot m_D}{m_O + m_D}}{k_{H_2O}^2 \cdot \frac{m_O \cdot m_H}{m_O + m_H}} K_{b,H_2O} =$$

$$2 \left(\frac{k_{D_2O}}{k_{H_2O}} \right)^2 \frac{m_O + m_H}{m_O + m_D} K_{b,H_2O} = 2 \left(\frac{2671}{3490} \right)^2 \frac{15,9994 + 1,00794}{15,9994 + 2,0141} 450 = 497,710$$

$$K_{b,D_2O} = 497,710 \frac{kcal}{mol \cdot \text{\AA}^2}$$

Ο υπολογισμός του K_{θ,D_2O} έγινε με την χρήση της τιμής K_{θ,H_2O} και έναν διορθωτικό παράγοντα που υπολογίζεται από τους κυματάριθμους.

Bend – Angles

$$K_{\theta,D_2O} = \frac{V_{D_2O}^2 \cdot K_{\theta,H_2O} \cdot \mu_{D_2O}}{V_{H_2O}^2 \cdot \mu_{H_2O}} = \left(\frac{k_{D_2O}}{k_{H_2O}} \right)^2 \frac{\frac{m_D \cdot m_D}{m_D + m_D}}{\frac{m_H \cdot m_H}{m_H + m_H}} K_{\theta,H_2O} =$$

$$= \left(\frac{k_{D_2O}}{k_{H_2O}} \right)^2 \frac{m_D}{m_H} K_{\theta,H_2O} = 2 \left(\frac{1178}{1645} \right)^2 55 = 56,409$$

$$K_{\theta,D_2O} = 56,409 \frac{kcal}{mol \cdot rad^2}$$

Ο υπολογισμός του b_{0,D_2O}^{π} έγινε με την χρήση της πειραματικής τιμής b_{0,D_2O}^e και ενός διορθωτικού παράγοντα που υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον λόγο πειραματικού b_{0,H_2O}^e και τιμής b_{0,H_2O}^{π} που υπάρχει στο αρχείο των παραμέτρων par_all27_prot_na.inp.

Διόρθωση μήκους δεσμών

$$\frac{b_{0,H_2O}^e}{b_{0,D_2O}^e} = \frac{b_{0,H_2O}^{\pi}}{b_{0,D_2O}^{\pi}} \rightarrow$$

$$b_{0,D_2O}^{\pi} = \frac{b_{0,H_2O}^{\pi}}{b_{0,H_2O}^e} b_{0,D_2O}^e = \frac{0,9572}{0,991} 0,9775 = 0,94416$$

$$b_{0,D_2O}^{\pi} = 0,94416 \text{ \AA}$$

Αντίστοιχα ο υπολογισμός του θ_{0,D_2O}^{π} έγινε με την χρήση της πειραματικής τιμής θ_{0,D_2O}^e και ενός διορθωτικού παράγοντα που υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον λόγο πειραματικού θ_{0,H_2O}^e και τιμής θ_{0,H_2O}^{π} που υπάρχει στο αρχείο των παραμέτρων par_all27_prot_na.inp.

Διόρθωση γωνίας

$$\frac{\theta_{0,D_2O}^{\pi}}{\theta_{0,D_2O}^e} = \frac{\theta_{0,H_2O}^{\pi}}{\theta_{0,H_2O}^e} \rightarrow$$

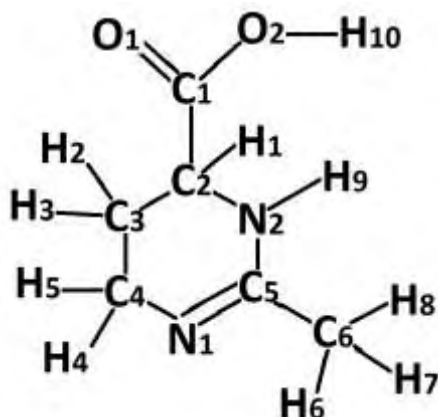
$$\theta_{0,D_2O}^{\pi} = \frac{\theta_{0,D_2O}^e}{\theta_{0,H_2O}^e} \theta_{0,H_2O}^{\pi} = \frac{106}{105,5} 104,52 = 105,015$$

$$\theta_{0,D_2O}^{\pi} = 105,015^{\circ}$$

Για το δυναμικό Lennard-Jones κρατήθηκαν οι ίδιες παράμετροι με το TIP3P.

5. Προετοιμασία αρχείων προσομοιώσεων – Παραμετροποίηση εκτοΐνης

Αντίστοιχα όπως και για το D₂O, πραγματοποιήθηκε παραμετροποίηση για το μόριο της εκτοΐνης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται κάτωθι.



Εικόνα Γ.8. Ονομασία του κάθε ατόμου στο μόριο της εκτοΐνης στα αρχεία pdb και psf

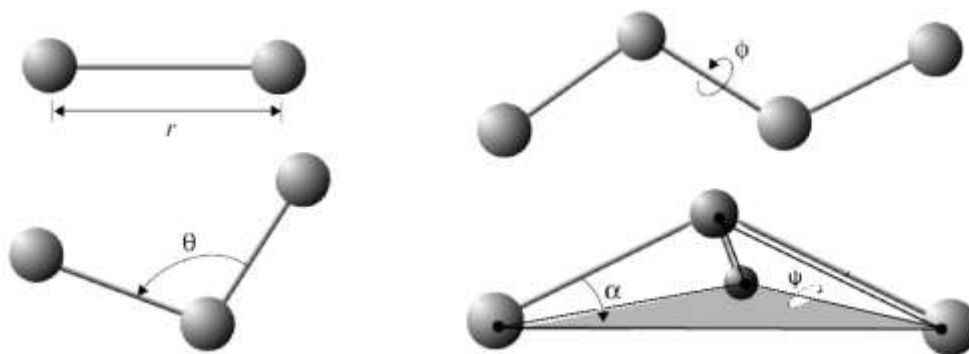
Αρχικά, για την δημιουργία του αρχείου τοπολογίας, έγινε ομαδοποίηση των ατόμων της εκτοΐνης σε 3 υποομάδες (groups) και προσδιορίστηκαν τα μερικά φορτία τους ώστε στο σύνολο της κάθε υποομάδας, το ολικό φορτίο να προκύπτει ίσο με το μηδέν, εφόσον η εκτοΐνη έχει μηδενικό φορτίο. Ο προσδιορισμός των μερικών φορτίων πραγματοποιήθηκε με σύγκριση του εκάστοτε εξεταζόμενου ατόμου της εκτοΐνης αλλά και των γειτονικών του με ήδη υπάρχουσες δομές άλλων βιομορίων στο αρχείο τοπολογίας του Charmm 27 top_all27_prot_na.inp. Σε κάθε περίπτωση επιλέχθηκε η καταλληλότερη αντικατάσταση, έτσι ώστε να ταιριάζει τόσο το άτομο

που εξετάζαμε, όσο και τα γειτονικά του αλλά και η συνδεσμολογία με τα γειτονικά του. Οι αντικαταστάσεις που έγιναν βρίσκονται στους πίνακες Γ.10-Γ.13.

Στην δεύτερη στήλη του πίνακα που ακολουθεί δίνεται η ονομασία του ατόμου, στην τρίτη στήλη ο τύπος του (σ' αυτόν αναφέρονται οι παράμετροι στο αρχείο παραμέτρων) και στην τέταρτη το μερικό ηλεκτρικό φορτίο του σε e .

GROUP		
ATOM O1	OB	-0.55
ATOM C1	CD	0.73
ATOM O2	OH1	-0.62
ATOM H10	H	0.44
GROUP		
ATOM C2	CP1	0.16
ATOM C3	CP2	-0.18
ATOM C4	CP2	-0.18
ATOM N1	NN3	-0.66
ATOM C5	CN2	0.25
ATOM N2	NP	-0.07
ATOM H1	HB	0.09
ATOM H2	HA	0.09
ATOM H3	HA	0.09
ATOM H4	HA	0.09
ATOM H5	HA	0.09
ATOM H9	HC	0.23
GROUP		
ATOM C6	CT3	-0.27
ATOM H6	HA	0.09
ATOM H7	HA	0.09
ATOM H8	HA	0.09

Αντικαταστάσεις με την ίδια διαδικασία έγιναν και στο αρχείο παραμέτρων `par_all27_prot_na.inp` για τους δεσμούς, τις γωνίες, τις δίεδρες γωνίες και τις γωνίες *impropers*. Οι αντικαταστάσεις που έγιναν παρατίθενται παρακάτω.



Εικόνα Γ.9. Αλληλεπιδράσεις συνδεδεμένων ατόμων. Όπου r το μήκος του δεσμού, θ η γωνία του δεσμού, ϕ η δίεδρη γωνία και α η καταχρηστική (*improper*) γωνία

Πίνακας Γ.10. Αντικαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν στους δεσμούς

Δεσμός	Τύποι ατόμων στον δεσμό	Αντικαταστάθηκαν με
C5-N2	CN2-NP	CN5-NN3
C5-C6	CN2-CT3	CN7-CN8

Πίνακας Γ.11. Αντικαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν στις γωνίες

Γωνία	Τύποι ατόμων στην γωνία	Αντικαταστάθηκαν με
O1-C1-C2	OB-CD-CP1	OB-CD-CT2
O2-C1-C2	OH1-CD-CP1	CT2-CD-OH1
H5-C4-N1	HA-CP2-NN3	HA-CT2-NH3
C3-C4-N1	CP2-CP2-NN3	CN3-CN3B-NN2
C5-N2-C2	CN2-NP-CP1	CN2-NN2G-CN1
C5-N1-C4	CN2-NN3-CP2	CN2-NN3G-CN5
N2-C5-N1	NN3-CN2-NP	NN2G-CN2-NN3G
H9-N2-C5	HC-NP-CN2	HN2-NN2U-CN1T
C6-C5-N1	CT3-CN2-NN3	NN1-CN2-NN3
C6-C5-N2	CT3-CN2-NP	CN2-CN5-NN1
C5-C6-H6	CN2-CT3-HA	CN3T-CN9-HN9

Πίνακας Γ.12. Αντικαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν στις διέδρες γωνίες

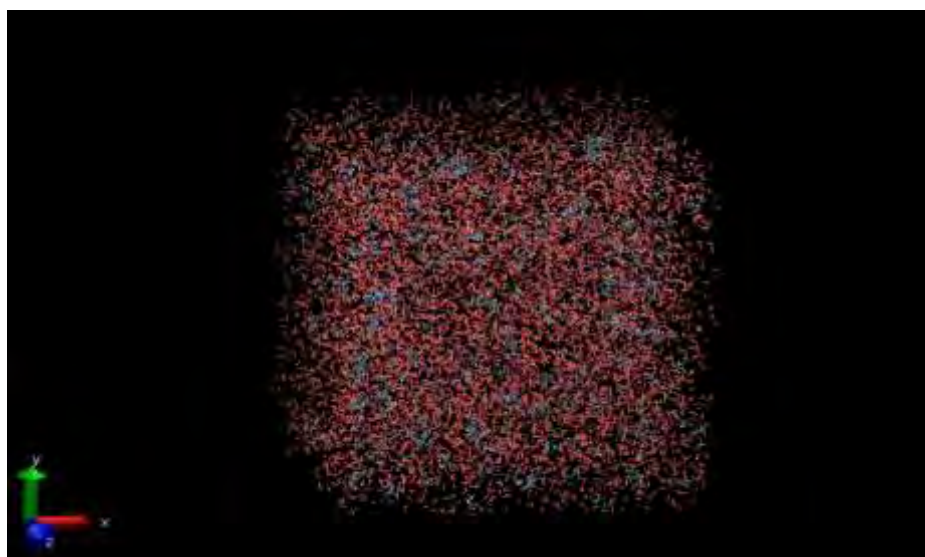
Διέδρη γωνία	Τύποι ατόμων στη διέδρη γωνία	Αντικαταστάθηκαν με
C1-C2-N2-C5	CD-CP1-NP-CN2	C-CP1-N-CP3
C2-N2-C5-C6	CP1-NP-CN2-CT3	CPH2-NR1-CPH1-CT2
C2-N2-C5-N1	CP1-NP-CN2-NN3	CPH1-NR1-CPH2-NR2
C3-C4-N1-C5	CP2-CP2-NN3-CN2	NG2R50-CG2R52-CG3C52-CG2R51
C3-C2-N2-C5	CP2-CP1-NP-CN2	CN1T-NN2U-CN1-CN3
N1-C5-C6-H8	NN3-CN2-CT3-HA	NN2-CN3B-CN3-HN3B
N1-C5-N2-H9	NN3-CN2-NP-HC	NR2-CPH2-NR1-H
C5-N2-C2-H1	CN2-NP-CP1-HB	CP1-N-CP3-HA
C5-N1-C4-H5	CN2-NN3-CP2-HA	CN2-NN3A-CN4-HN3
N2-C5-C6-H8	NP-CN2-CT3-HA	NR1-CPH1-CT2-HA
H9-N2-C5-C6	HC-NP-CN2-CT3	H-NR1-CPH1-CT2

Πίνακας Γ.13. Αντικαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν στις καταχρηστικές γωνίες

Improper γωνία	Τύποι ατόμων στην improper γωνία	Αντικαταστάθηκαν με
C1-C2-O1-O2	CD-CP1-OB-OH1	CT1-CD-OB-OS (X)
C2-N2-C1-C3	CP1-NP-CD-CP2	NPH-CPM-CPB-CPA
C2-N2-C1-H1	CP1-NP-CD-HB	HR3-CPH1-NR2-CPH1
C3-C4-C2-H3	CP2-CP2-CP1-HA	HA-CPA-CPA-CPM
C3-H3-C2-H2	CP2-HA-CP1-HA	HA-HA-C-C
C4-N1-C3-H4	CP2-NN3-CP2-HA	HR3-CPH1-NR2-CPH1
C5-N1-N2-C6	CN2-NN3-NP-CT3	CN2-NN3G-NN2G-NN1
N2-C5-C2-H9	NP-CN2-CP1-HC	HN2-CN3-CN3B-NN2
C6-H8-C5-H6	CT3-HA-CN2-HA	CT3-CPB-HA-HA (X)

6. Δημιουργία του υδατικού διαλύματος – Ενυδάτωση εκτοΐνης

Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για τα υδατικά διαλύματα της εκτοΐνης είναι 1,5 M. Αυτό αντιστοιχεί σε 10.000 μόρια H_2O ή D_2O αντίστοιχα για κάθε 320 μόρια εκτοΐνης. Για την πραγματοποίηση της ενυδάτωσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα packmol [40]. Το configuration file που χρησιμοποιήθηκε βρίσκεται προσαρτημένο στο παράρτημα των scripts.



Εικόνα Γ.14. Ενυδάτωση εκτοΐνης, όπου κόκκινα τα μόρια νερού και μπλε τα μόρια εκτοΐνης

7. Ελαχιστοποίηση ενέργειας του συστήματος (Energy Minimization)

Το πρώτο βήμα πριν την καθαυτό ΠΜΔ του συστήματος είναι να ελαχιστοποιηθεί η δυναμική του ενέργεια. Για την πραγματοποίηση της ελαχιστοποίησης ενέργειας χρησιμοποιήθηκε το script που βρίσκεται προσαρτημένο στο παράρτημα. Σ' αυτό καθορίστηκαν οι συνθήκες υπό τις οποίες θα γίνει η διαδικασία, τα ονόματα των αρχείων που χρειάζεται το namd, και το όνομα του αρχείου που περιέχει τις παραμέτρους. Για να γίνει το minimization θα πρέπει όλα τα αρχεία που αναφέρονται στο script να βρίσκονται μέσα στον φάκελο εργασίας που υπάρχει και το script, όπως και το πρόγραμμα namd. Το αρχείο pdb προστίθεται στο πεδίο coordinates, ενώ το αρχείο psf στο πεδίο structure. Μπορούμε να ορίσουμε το όνομα που θέλουμε να έχουν τα αρχεία που θα δημιουργηθούν στο πεδίο output name. Η ελαχιστοποίηση έτρεξε για 6000 steps με την εντολή `namd2.exe +p4 min_4CS-`

H2O.txt > log_min_4CS-H2O.txt στο cmd. Όσο πραγματοποιείται η ελαχιστοποίηση ενέργειας, το namd ενημερώνει σε τακτά χρονικά διαστήματα το αρχείο κειμένου logfile, το οποίο περιλαμβάνει τις τρέχουσες ενέργειες κάθε 100 βήματα και το gradient tolerance. Η ελαχιστοποίηση ενέργειας του συστήματος είναι επαρκής όταν έχουμε μονοψήφιο gradient tolerance και με όσο το δυνατόν μικρότερη τιμή. Όσο περισσότερα είναι τα βήματα της ελαχιστοποίησης ενέργειας, τόσο μικρότερος είναι ο δείκτης που προκύπτει. Με το πέρας της διαδικασίας δημιουργούνται στον αρχικό φάκελο τρία καινούργια αρχεία με τις καταλήξεις -.coor, -.vel, -.xsc με πρώτο συνθετικό του ονόματος αυτό που ορίσαμε στο πεδίο output name. Από αυτά τα αρχεία, θα χρειαστούμε το -.coor για την διεκπεραίωση της εξισορρόπησης του συστήματος.^[37]

8. Εξισορρόπηση του συστήματος (Equilibration)

Μόλις ολοκληρωθεί η ελαχιστοποίηση της ενέργειας, το επόμενο βήμα είναι να εξισορροπηθεί το σύστημα. Αυτό πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Το πρώτο ήταν σε συνθήκες NPT, στο οποίο παραμένουν σταθερά ο αριθμός των σωματιδίων, η πίεση και η θερμοκρασία. Το δεύτερο ήταν σε συνθήκες NVT, στο οποίο παραμένουν σταθερά ο αριθμός των σωματιδίων, ο όγκος και η θερμοκρασία. Τα configuration scripts που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται προσαρτημένα στο παράρτημα. Στο πεδίο structure χρησιμοποιήθηκε το όνομα του αρχείου psf και στο πεδίο coordinates χρησιμοποιήθηκε το όνομα του αρχείου με τις συντεταγμένες που προέκυψε από την ελαχιστοποίηση της ενέργειας, με την κατάληξη -.coor.

Η θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε στις περισσότερες προσομοιώσεις είναι 300K. Σε μερικές προσομοιώσεις που ήταν αναγκαίο, έγινε μελέτη και στους 273K, όπως και στους 353K, έπειτα από σταδιακές αυξήσεις της θερμοκρασίας από τους 100K, στους 200K, έπειτα στους 300K και τέλος στους 353K. Στο πεδίο set outputname ορίστηκε το όνομα που θα έχει το αρχείο που θα προκύψει.

Στις περιπτώσεις που χρειάζεται να συνεχιστεί ένας κύκλος NPT ή NVT, πρέπει να ενεργοποιηθεί το #continuing a job from the restart files, στο configuration script, και η θερμοκρασία καθορίζεται πλέον από τις ταχύτητες των μορίων. Χρειάζεται ωστόσο να οριστούν ξανά οι παράμετροι και οι συντεταγμένες-διαστάσεις του κελιού προσομοίωσης. Αυτό είναι εφικτό με την εκτέλεση του tcl

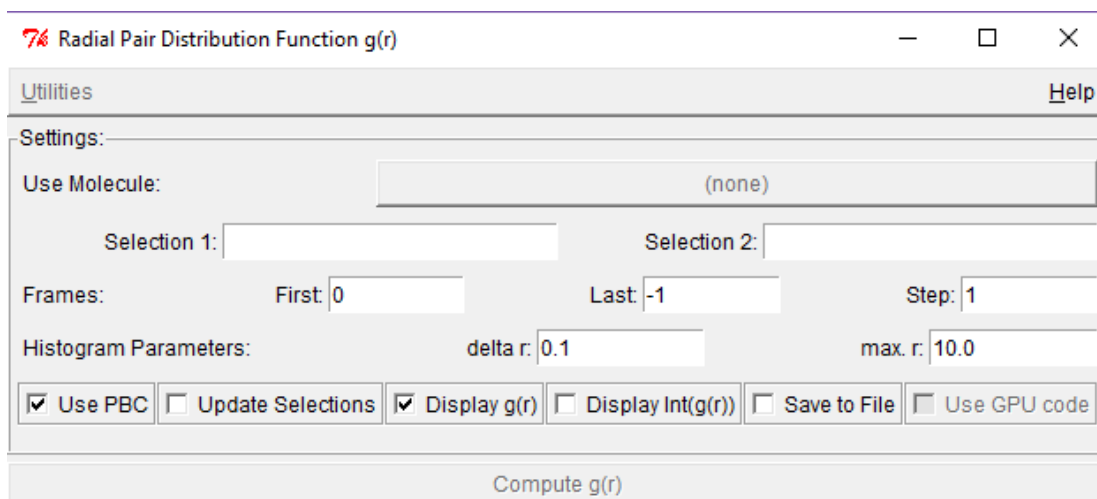
script Conf_PBC.tcl από το terminal του προγράμματος VMD. Το script Conf_PBC.tcl βρίσκεται προσαρτημένο στο παράρτημα.

Η εκτέλεση της διαδικασίας της εξισορρόπησης γίνεται με αντίστοιχο τρόπο από το cmd όπως και η εξισορρόπηση ενέργειας που περιγράφεται παραπάνω. Αφότου ολοκληρωθεί η διαδικασία, δημιουργούνται στον φάκελο νέα αρχεία με τις καταλήξεις -.dcd, -.coord, -.vel, -.xsc, -.restart.xsc.old, -.restart.xsc, -.restart.vel.old, -.restart.vel, -.restart.coord.old, -.restart.coord, και ως όνομα αυτό που έχει οριστεί στο πεδίο output name.^[37]

Τα NPTs που πραγματοποιήθηκαν ήταν διάρκειας 10.000 steps ώστε να ρυθμιστούν αρχικά οι διαστάσεις του κελιού. Ακολούθησαν δύο διαδοχικά NVTs διάρκειας 10.000.000 steps (20 ns) το καθένα.

9. Υπολογισμός της ακτινικής συνάρτησης κατανομής (RPDF)

Για τον υπολογισμό της ακτινικής συνάρτησης κατανομής (RPDF) είναι απαραίτητα τα αρχεία -.dcd από τα τελευταία NVT που πραγματοποιήθηκαν και τα αρχεία συνδεσμολογίας psf. Αφού τα φορτώσουμε στο VMD, ακολουθούμε το Extensions > Analysis > Radial Pair Distribution Function g(r). Στο πεδίο Use Molecule επιλέγουμε το αρχείο -.dcd που έχει φορτωθεί. Στα πεδία Selection 1 & Selection 2 πρέπει να συμπληρωθεί το επιθυμητό ζευγάρι ατόμων για το οποίο θα υπολογιστεί η ακτινική συνάρτηση κατανομής. Αυτό γίνεται με την εντολή name X, όπου X τοποθετείται κάθε φορά το ακριβές όνομα του ατόμου όπως αυτό ορίζεται στα αρχεία τοπολογίας και παραμέτρων, και ακολούθως υπάρχει με αυτή την ονομασία και στο αρχείο -.dcd (π.χ. name OH2 για την επιλογή του ατόμου του οξυγόνου στο μοντέλο του νερού TIP3P). Στο πεδίο Step μπορεί να οριστεί το ανά πόσα frames θα λαμβάνει υπόψη του για τον υπολογισμό του RPDF. Στα πεδία delta r: και max. r.: ορίζονται το βήμα της απόστασης και η μέγιστη απόσταση αντίστοιχα σε μονάδες Angstrom. Το πεδίο Use PBC πρέπει να παραμείνει ενεργοποιημένο ώστε κατά την διάρκεια του υπολογισμού να ληφθούν υπόψη οι περιοδικές οριακές συνθήκες. Τέλος, ενεργοποιούμε και το πεδίο Save to File, ώστε να αποθηκευτούν οι τιμές που θα προκύψουν. Εκτελούμε την εντολή Compute g(r).



Εικόνα Γ.15. Plugin console του προγράμματος VMD για τον υπολογισμό της ακτινικής συνάρτησης κατανομής RPDF

Αφού εκτελεστούν οι υπολογισμοί, δημιουργείται το αρχείο `-.dat`, το οποίο εισάγουμε σε ένα υπολογιστικό φύλλο Excel για να δημιουργήσουμε το ιστόγραμμα RPDF. Για το ιστόγραμμα του $g(r)$ χρησιμοποιούνται μόνο οι 2 πρώτες στήλες.

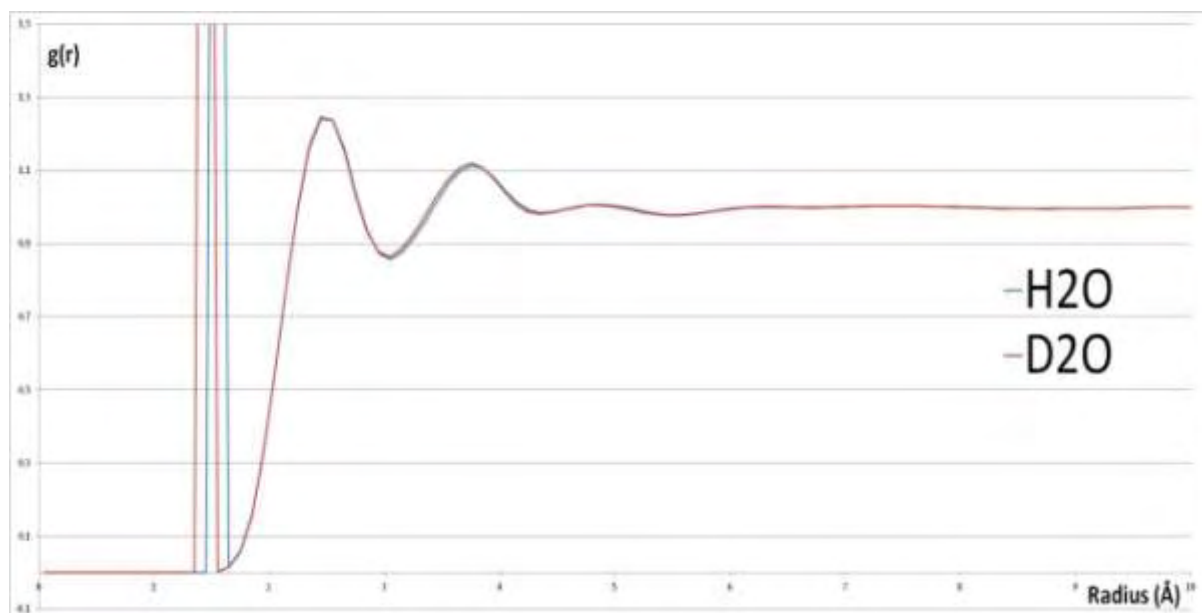
10. Υπολογισμός των διηλεκτρικών φασμάτων

Για τον υπολογισμό των διηλεκτρικών φασμάτων χρησιμοποιήθηκε λογισμικό που εκτελείται μέσω του terminal. Αφού εισήχθησαν οι παράμετροι, για τον υπολογισμό της διηλεκτρικής συνάρτησης χρησιμοποιήθηκαν δύο ροές αποτελούμενες από διαδοχικά βήματα. Όλα τα βήματα εκτελούνται αυτόνομα αφού οριστούν οι αρχικές παράμετροι και γίνονται οι υπολογισμοί. Τα αρχεία `input` και `output` είναι αρχεία κειμένου. Για την αναπαράσταση των γραφικών παραστάσεων χρησιμοποιήθηκε το `gnuplot`, ενώ για να φορτωθούν τα μεγάλα σε μέγεθος αρχεία `dcd` που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής χρησιμοποιήθηκε το `catdcd`, που τα έκοψε σε μικρότερα τμήματα ώστε να είναι ευκολότερη η επεξεργασία τους.

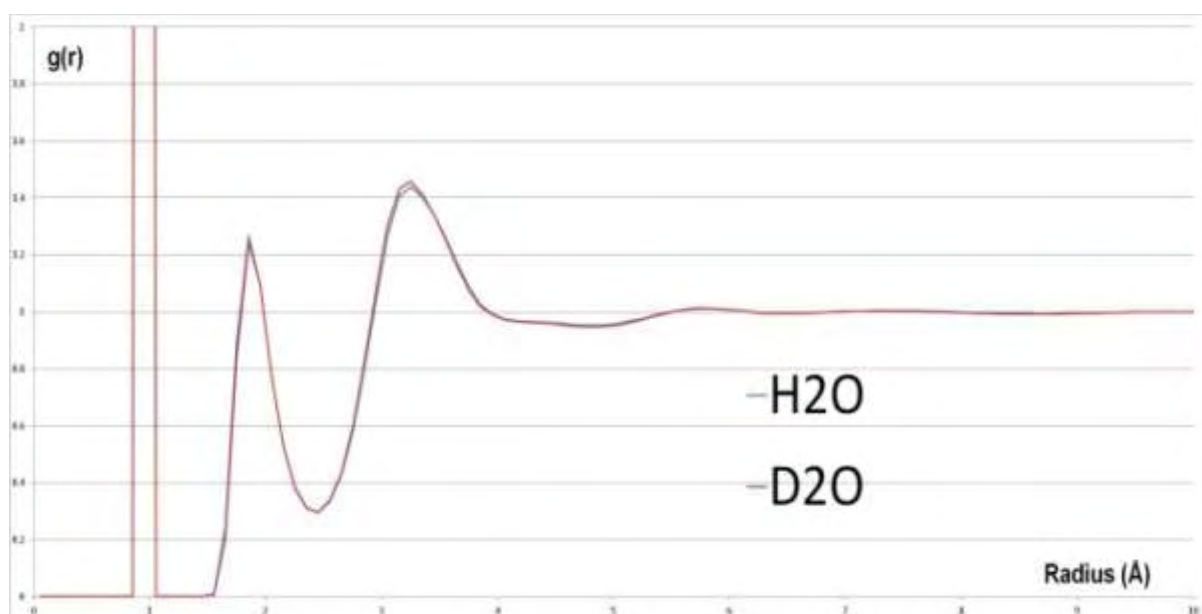
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Διαγράμματα ακτινικής συνάρτησης κατανομής (RPDF)

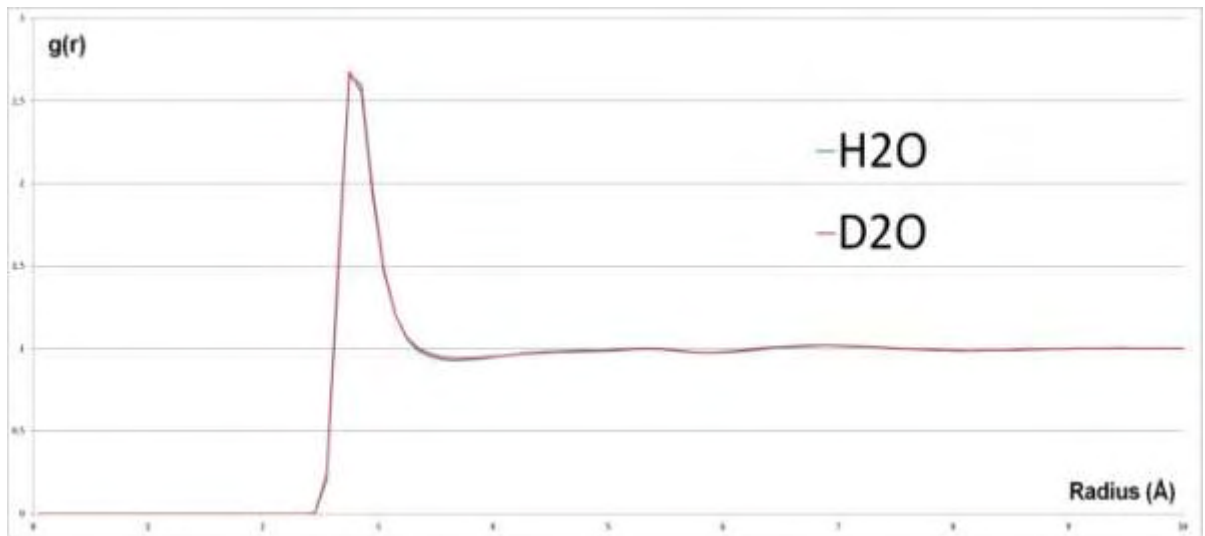
Σε όλα τα διαγράμματα ακτινικής συνάρτησης κατανομής έγινε κανονικοποίηση, έτσι ώστε σε μεγάλη απόσταση η $g(r)$ να δίνει την προβλεπόμενη μέση πυκνότητα.



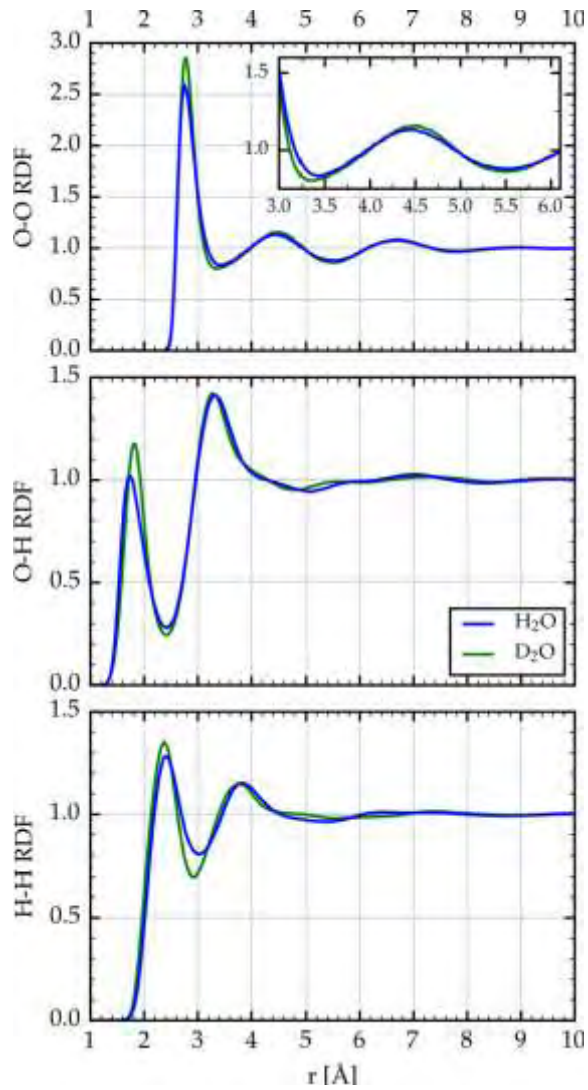
Εικόνα Δ.1. Διάγραμμα RPDF για το ζεύγος H-H στους καθαρούς διαλύτες H_2O (γαλάζιο) και D_2O (κόκκινο)



Εικόνα Δ.2. Διάγραμμα RPDF για το ζεύγος O-H στους καθαρούς διαλύτες H_2O (γαλάζιο) και D_2O (κόκκινο)

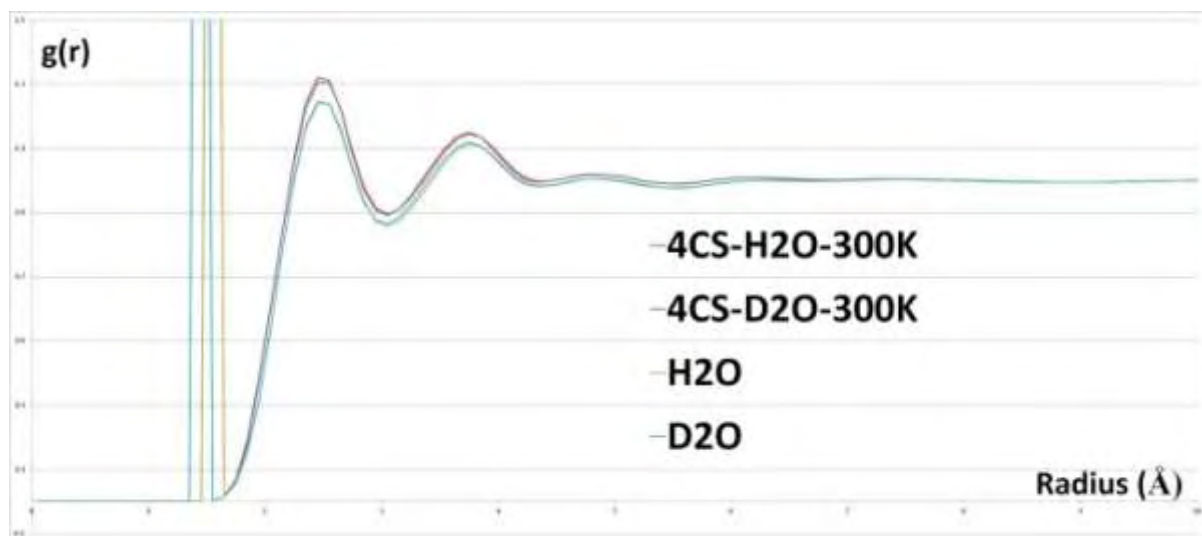


Εικόνα Δ.3. Διάγραμμα RPDF για το ζεύγος O-O στους καθαρούς διαλύτες H_2O (γαλάζιο) και D_2O (κόκκινο)

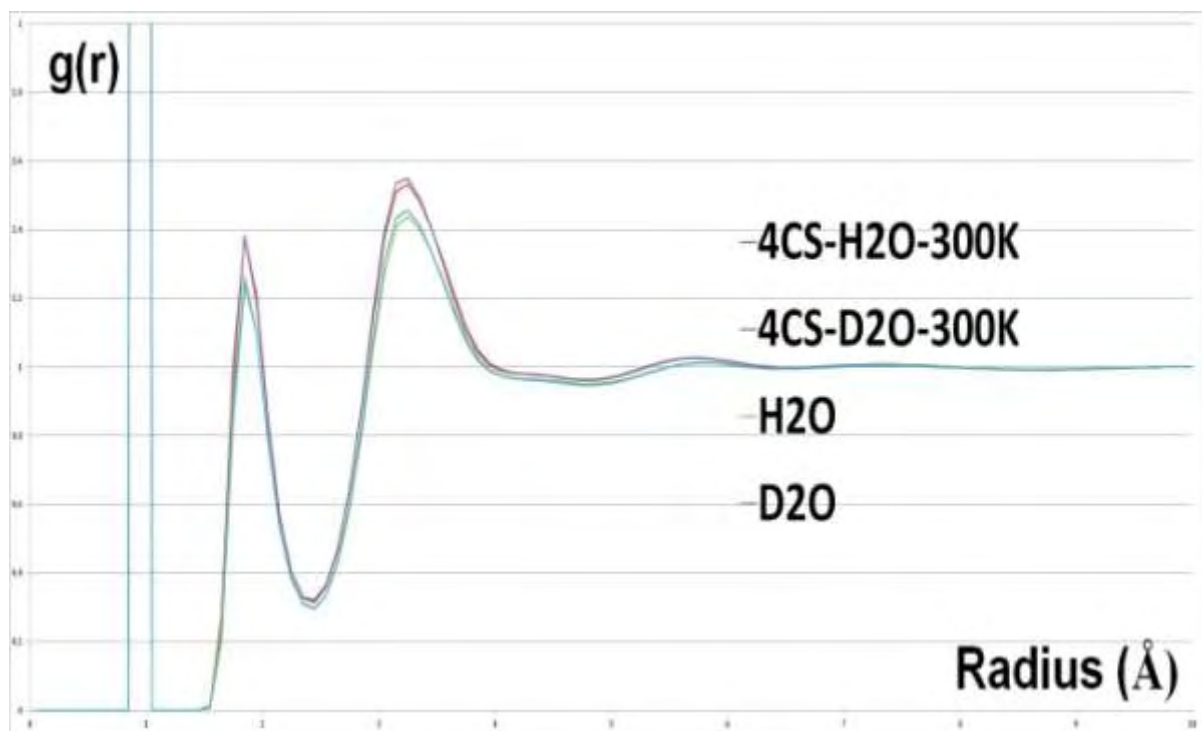


Εικόνα Δ.4. Διαγράμματα RPDF για τα ζεύγη O-O, H-H και O-H στους καθαρούς διαλύτες H_2O (μπλε) και D_2O (πράσινο) από την βιβλιογραφία ^[38]

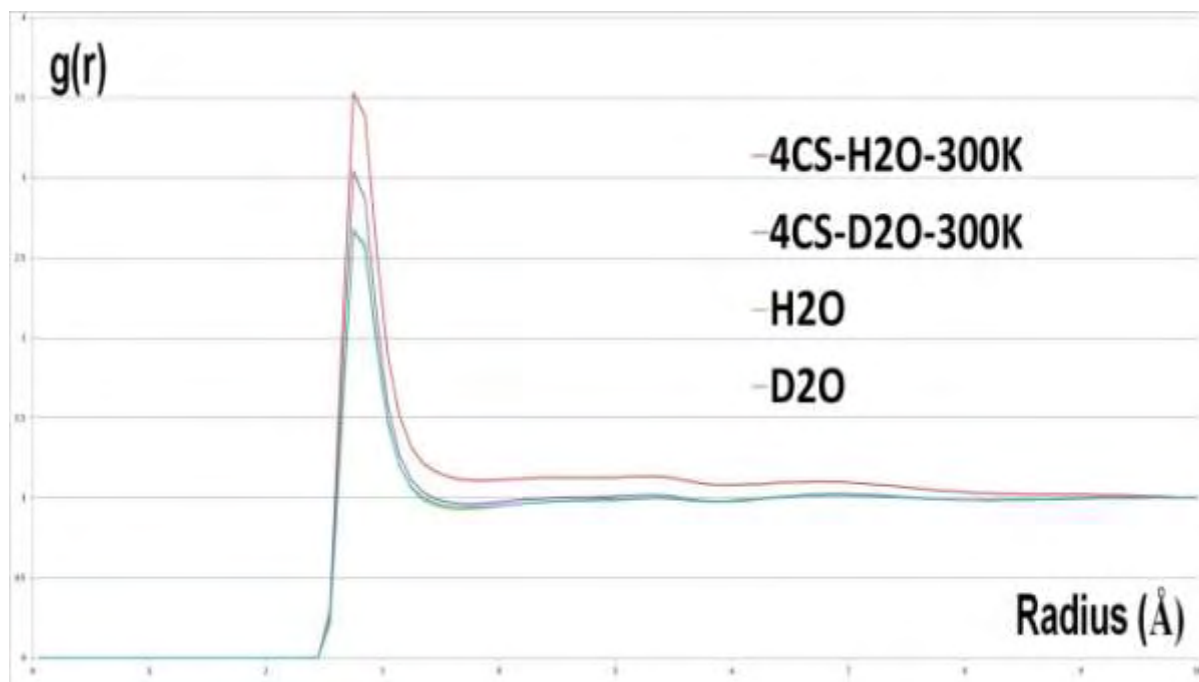
Παρατηρείται πως τα διαγράμματα των RPDFs που προέκυψαν από τα αρχεία των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής για τους διαλύτες H₂O και D₂O ομοιάζουν με τα αντίστοιχα διαγράμματα από την βιβλιογραφία για τις πιθανότητες εύρεσης ενός ζεύγους σε συγκεκριμένες αποστάσεις.



Εικόνα 4.5. Διάγραμμα RPDF για το ζεύγος H-H του νερού σε διαλύματα εκτοΐνης με H₂O και D₂O και χρήση παραμέτρων από την παραμετροποίηση

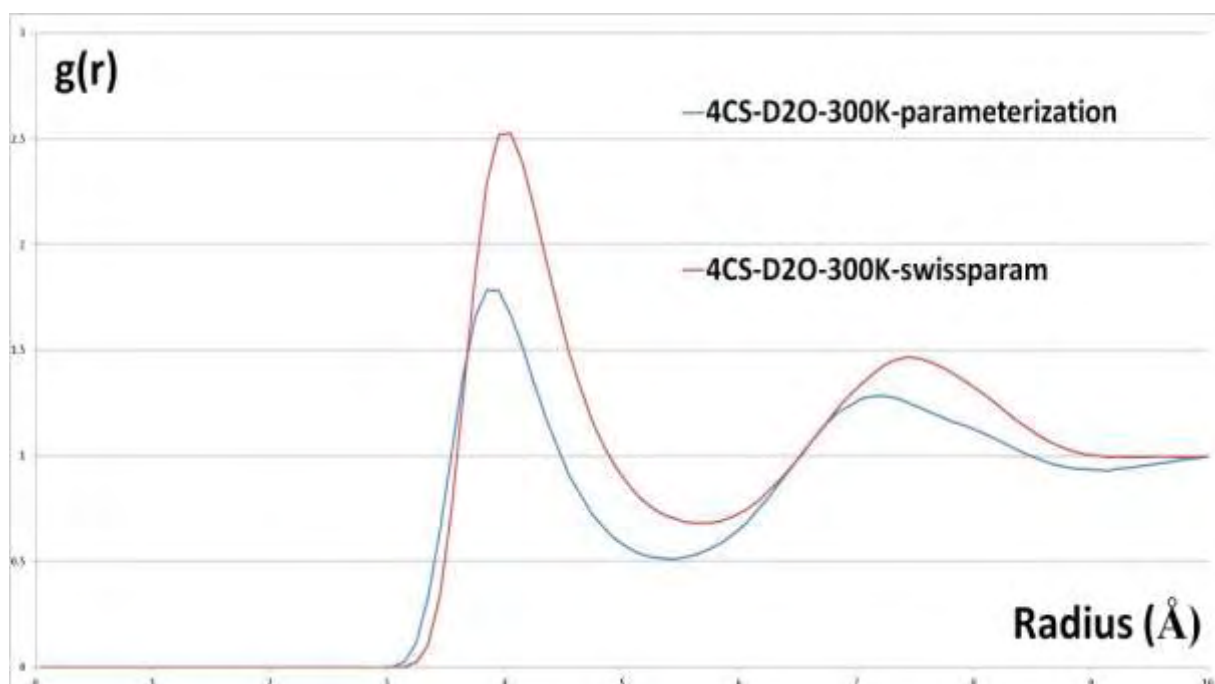


Εικόνα 4.6. Διάγραμμα RPDF για το ζεύγος H-O του νερού σε διαλύματα εκτοΐνης με H₂O και D₂O και χρήση παραμέτρων από την παραμετροποίηση

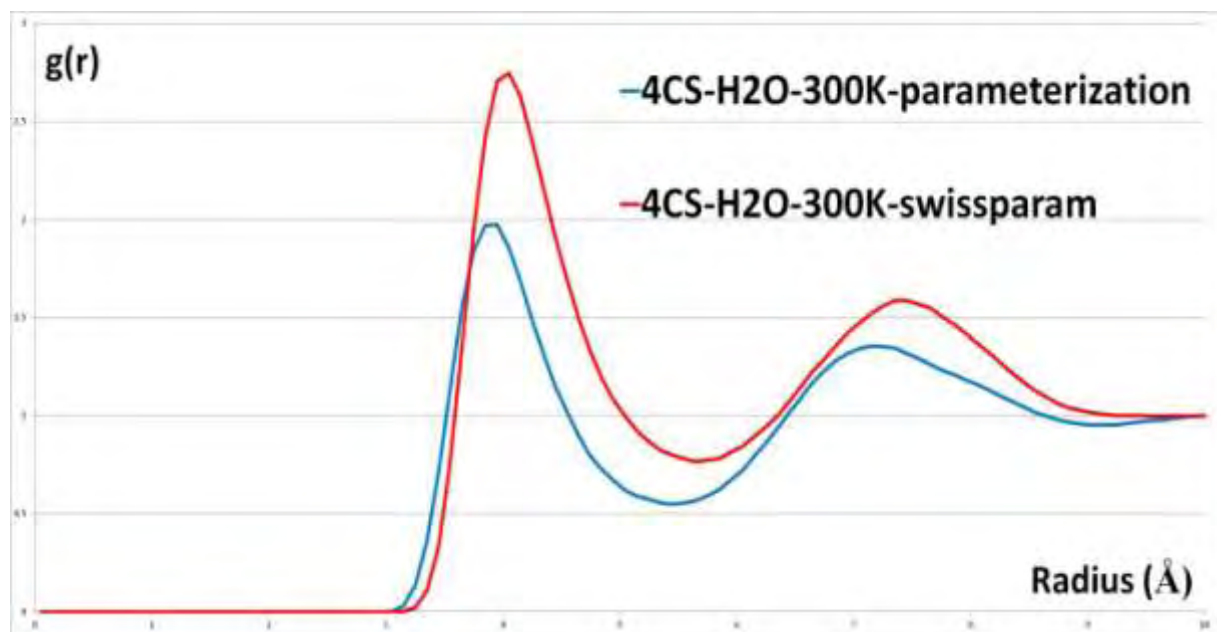


Εικόνα Δ.7. Διάγραμμα RPDF για το ζεύγος O-O του νερού σε διαλύματα εκτοΐνης με H_2O και D_2O και χρήση παραμέτρων από την παραμετροποίηση

Από τα διαγράμματα Δ.5. , Δ.6. και ιδιαίτερα από το Δ.7. παρατηρείται ότι η παρουσία της εκτοΐνης αυξάνει την πιθανότητα να βρεθούν κοντά τα επιμέρους μόρια του διαλύτη.



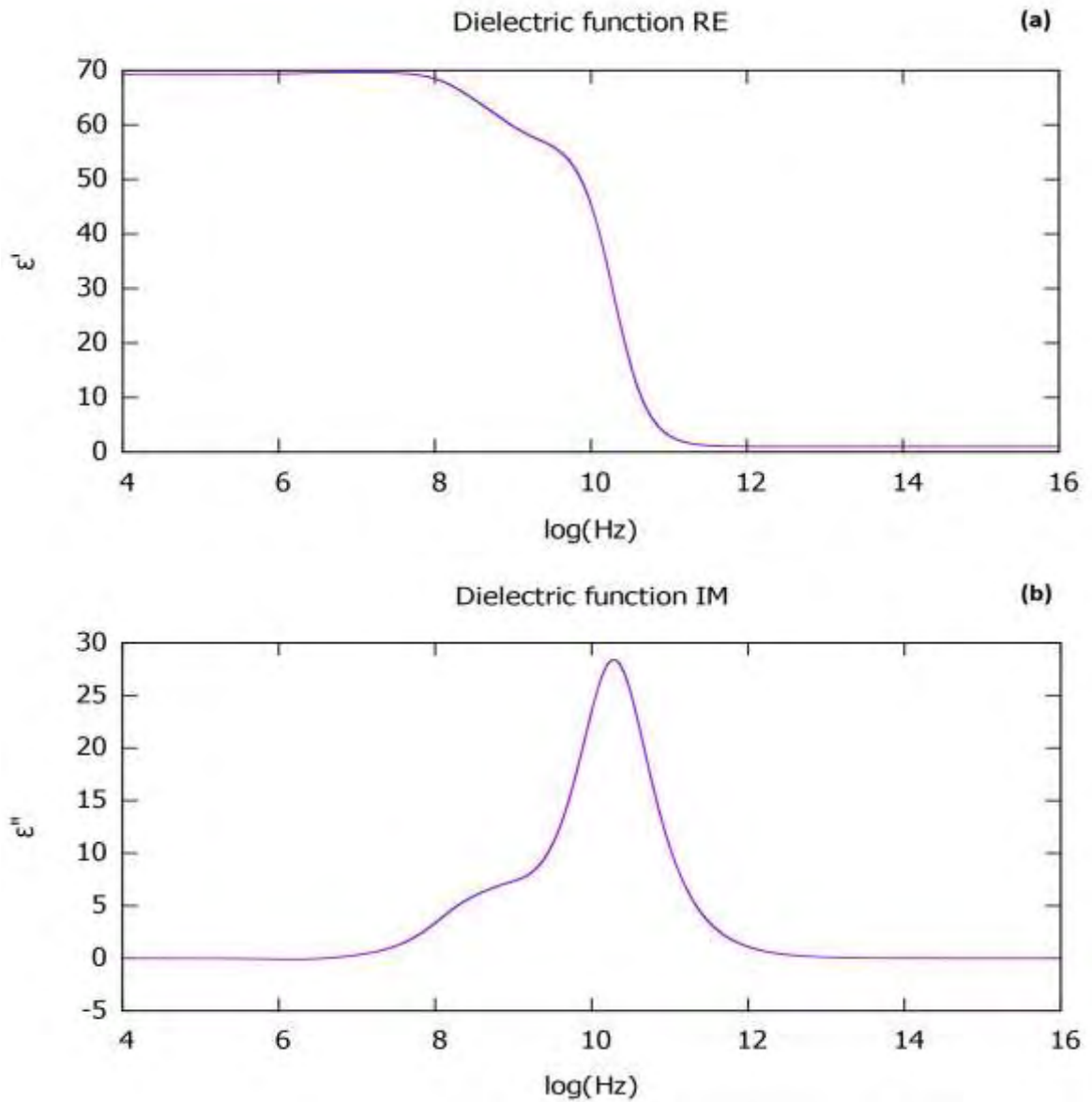
Εικόνα Δ.8. Διάγραμμα RPDF για το ζεύγος C6-C6 της εκτοΐνης σε διαλύματα εκτοΐνης με D_2O και χρήση παραμέτρων από το swissparam (κόκκινο) και την παραμετροποίηση (γαλάζιο)



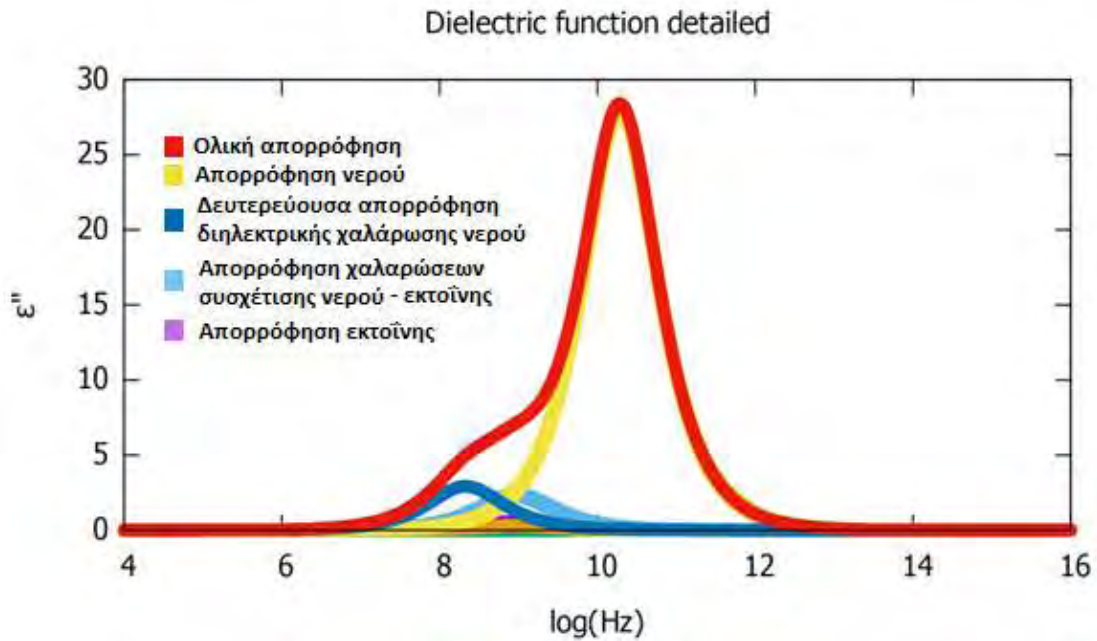
Εικόνα Δ.9. Διάγραμμα RPDF για το ζεύγος C6-C6 της εκτοΐνης σε διαλύματα εκτοΐνης με H₂O και χρήση παραμέτρων από το swissparam (κόκκινο) και την παραμετροποίηση (γαλάζιο)

Ενδεικτικά στα διαγράμματα των εικόνων Δ.8. και Δ.9. απεικονίζονται τα ζεύγη C6-C6 στο μόριο της εκτοΐνης και φαίνεται καθαρά πως η παραμετροποίηση που εκτελέστηκε ήταν επιτυχής ώστε να διαλυτοποιηθούν αποτελεσματικότερα τα μόρια της εκτοΐνης στα διαλύματα των προσομοιώσεων και να μην υπάρχουν συσσωματώματα. Αντίστοιχα ήταν και τα διαγράμματα RDFs για τα ζεύγη N1-N1, N1-N2, O1-O1, O1-O2, N1-O1 και N1-O2 που ελέγχθησαν.

2. Διαγράμματα διηλεκτρικής φασματοσκοπίας

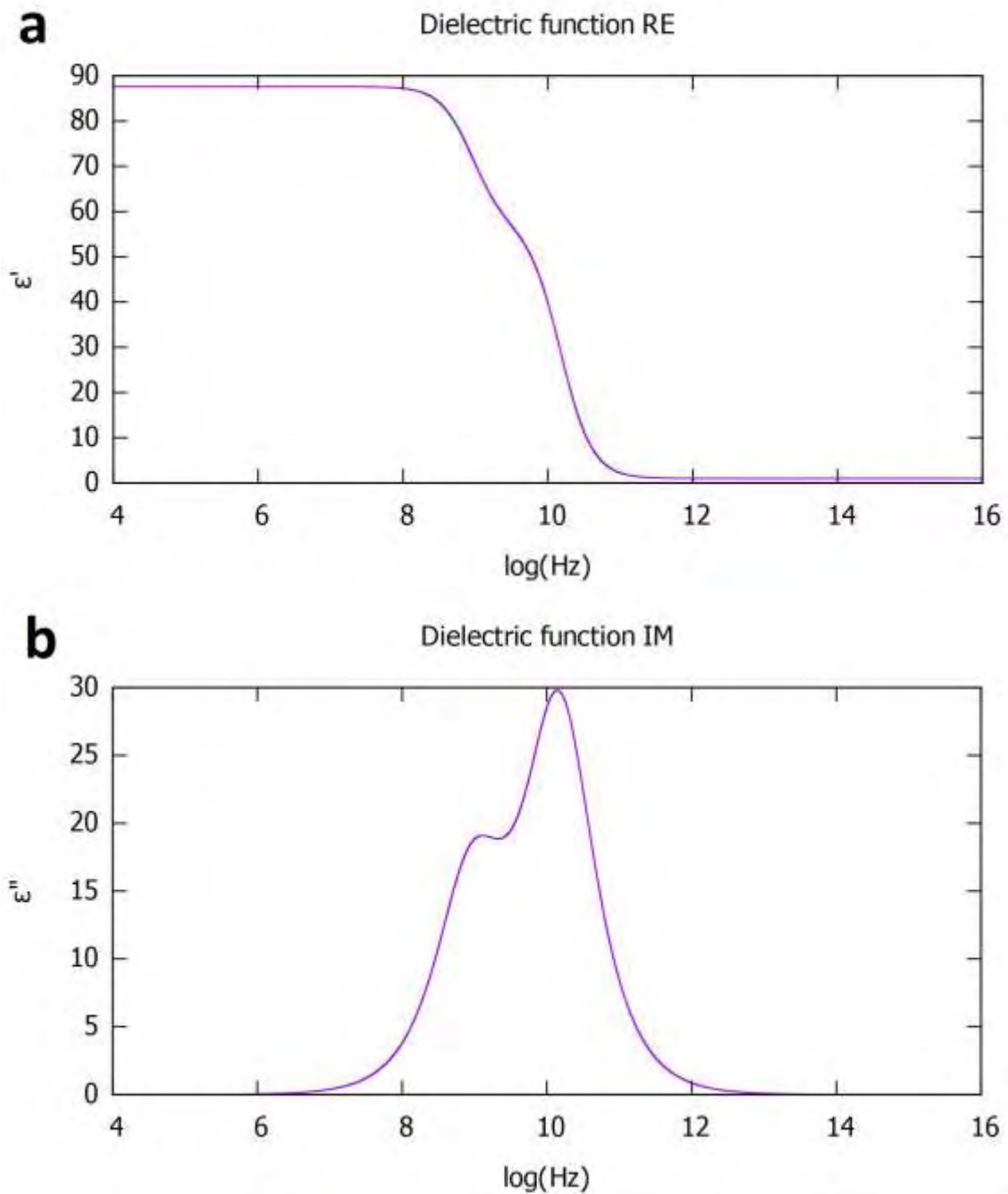


Εικόνα Δ.10. Πραγματικό (a) και φανταστικό (b) μέρος της διηλεκτρικής συνάρτησης του διαλύματος εκτοΐνης σε H_2O ως συνάρτηση της συχνότητας. Χρήση παραμέτρων που προήλθαν από την παραμετροποίηση

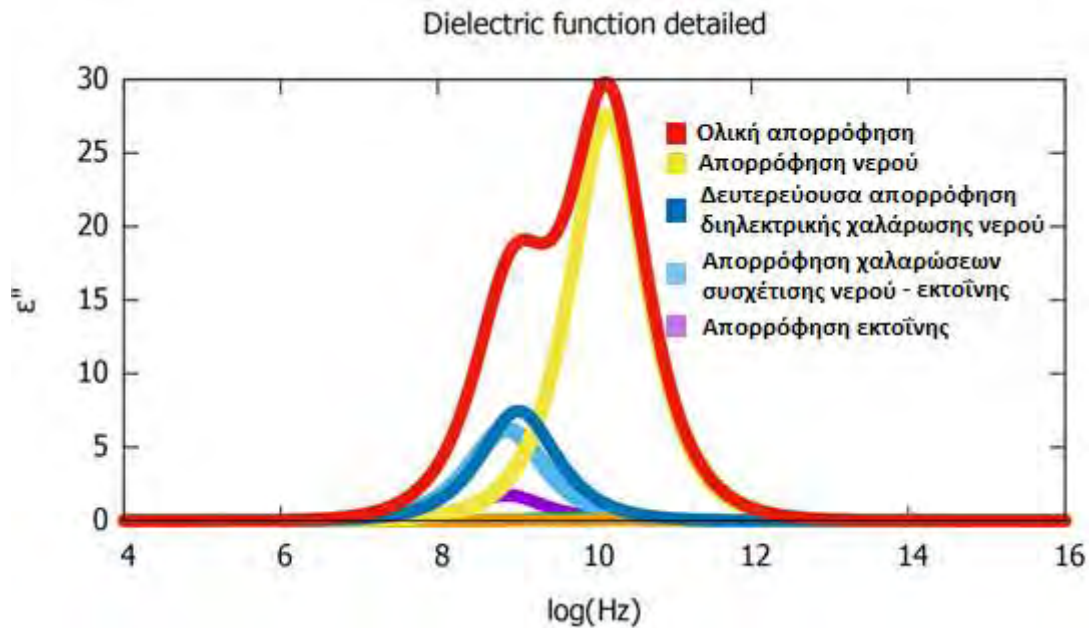


Εικόνα Δ.11. Επιμέρους συνιστώσες του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής συνάρτησης του διαλύματος εκτοΐνης σε H_2O ως συνάρτηση της συχνότητας. Χρήση παραμέτρων που προήλθαν από την παραμετροποίηση.

Όπως παρατηρείται στα διαγράμματα των εικόνων Δ.10. και Δ.11., το μέγιστο που εμφανίζεται στην καμπύλη του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής συνάρτησης 2×10^{10} Hz οφείλεται στην απορρόφηση του νερού (κίτρινο). Το δευτερεύον μέγιστο (καμπούρα) $\sim 3 \times 10^8$ Hz προέρχεται από την σύνθεση τριών κυρίως κοντινών μεταξύ τους καμπυλών που οφείλονται στην δευτερεύουσα συνιστώσα διηλεκτρικής χαλάρωσης του H_2O στα $\sim 2 \times 10^8$ Hz (μπλε), σε χαλαρώσεις συσχέτισης με τα μόρια του διαλύτη (γαλάζιο, $\sim 9 \times 10^8$ Hz) και στην χαλάρωση της εκτοΐνης (μωβ, $\sim 8 \times 10^8$ Hz) με πολύ χαμηλή ϵ'' .



Εικόνα 4.12. Πραγματικό (a) και φανταστικό (b) μέρος της διηλεκτρικής συνάρτησης του διαλύματος εκτοΐνης σε D₂O ως συνάρτηση της συχνότητας. Χρήση παραμέτρων που προήλθαν από την παραμετροποίηση



Εικόνα 4.13. Επιμέρους συνιστώσες του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής συνάρτησης του διαλύματος εκτοΐνης σε D_2O ως συνάρτηση της συχνότητας. Χρήση παραμέτρων που προήλθαν από την παραμετροποίηση.

Ομοίως και εδώ, το μέγιστο που εμφανίζεται στην καμπύλη του φανταστικού μέρους της διηλεκτρικής συνάρτησης προέρχεται κυρίως από την απορρόφηση του D_2O (κίτρινο), όπως αναμένεται σε λίγο χαμηλότερη συχνότητα ($\sim 10^{10}$ Hz) απ' ό,τι του H_2O . Η δευτερεύουσα συνιστώσα του D_2O εμφανίζεται περιέργως σε υψηλότερη συχνότητα ($\sim 10^9$ Hz) και ενισχυμένη. Οι χαλαρώσεις συσχέτισης της διπολικής ροπής της εκτοΐνης με τα μόρια του διαλύτη εμφανίζονται όπως είναι εύλογο σε σαφώς χαμηλότερη συχνότητα (γαλάζιο, $\sim 5 \times 10^8$ Hz) και ενισχυμένες. Η απορρόφηση της εκτοΐνης εμφανίζεται σε χαμηλότερη συχνότητα (μωβ, $\sim 5 \times 10^8$ Hz) ό,τι σε H_2O . Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι ο περιστροφικός συντελεστής αντίστασης $f_i = 8\pi\eta R^3$ αναμένεται να είναι υψηλότερος στο D_2O , δεδομένου ότι ο συντελεστής ιξώδους η είναι 1,2 φορές υψηλότερος. Το πλησίασμα αυτών των συνιστωσών καθώς και η μεγαλύτερη ένταση απορρόφησης προκαλούν την εμφάνιση ξεχωριστής κορυφής στο συνολικό φάσμα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ - SCRIPTS

Στο μέρος αυτό αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένα script που χρησιμοποιήθηκαν για να αυτοματοποιήσουμε τις εργασίες.

1. PSF generator script

```
#package require psfgen
topology top_all27_prot_na.inp
topology ectoin_with_H_2.rtf

#topology mag243.rtf

#alias residue A ADE
#alias residue G GUA
#alias residue C CYT
#alias residue U URA
alias residue HIS HSE
alias residue MG MG
alias residue CL CLA
alias residue HOH TIP3

#set reslist "CYT GUA ADE THY URA"
#foreach resid $reslist {
# alias atom $resid O5* O5'
# alias atom $resid C5* C5'
# alias atom $resid C4* C4'
# alias atom $resid O4* O4'
# alias atom $resid C3* C3'
# alias atom $resid O3* O3'
# alias atom $resid C2* C2'
# alias atom $resid C1* C1'
#}
#alias atom ILE CD1 CD
#alias atom ALA 1HB HB1
#alias atom ALA 2HB HB2
#alias atom ALA 3HB HB3
#alias atom ALA 1H HT1
#alias atom ALA 2H HT2
#alias atom ALA 3H HT3
#alias atom ALA O OT1
#alias atom ALA OXT OT2
#alias atom ALA H HN
#alias atom CL CL CLA
alias atom TIP3 O OH2

segment A {
pdb 4CS.pdb
#first none
#last none
}
#patch DISU A:107 A:163
coordpdb 4CS.pdb A
```

```

#guesscoord

segment B {
pdb H2O.pdb
#first none
#last none
}
#patch DISU A:107 A:163
coordpdb H2O.pdb B
guesscoord

writepdb 4CS-H2O.pdb
writepsf 4CS-H2O.psf

resetpsf

exit

```

2. Script ελαχιστοποίησης ενέργειας (minimization)

```

# protocol params

# initial config
coordinates 4CS-H2O.pdb
temperature 300K
seed 12345
outputEnergies 1

# output params
outputname min_4CS-H2O
binaryoutput no

# integrator params
timestep 1.0

# force field params
structure 4CS-H2O.psf
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na.inp
parameters ectoin_with_H_2.par
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
switching on
switchdist 8.0
cutoff 12.0
pairlistdist 13.5
margin 0.0
stepspercycle 20

# Constraints and restraints
#fixedAtoms on
#fixedAtomsForces off

```

```
#fixedAtomsFile AD_cry.ref
#fixedAtomsCol B

minimize 6000
```

3. NPT configuration file

```
#####
## JOB DESCRIPTION ##
#####

#####
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##
#####

structure 4CS-H2O.psf
coordinates min_4CS-H2O.coor
set temperature 300
set outputname eq_4CS-H2O_NPT-0

# Continuing a job from the restart files
if {0} {
setinputname eq_4CS-H2O_NPT-4
binCoordinates $inputname.restart.coor
binVelocities $inputname.restart.vel ;# remove the
"temperature" entry if you use this!
extendedSystem $inputname.restart.xsc
}

firsttimestep 0

#####
## SIMULATION PARAMETERS ##
#####

# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na.inp
parameters ectoin_with_H_2.par
temperature $temperature

# Force-Field Parameters
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
cutoff 12.0
switching on
switchdist 10.0
pairlistdist 14.0

# Integrator Parameters
timestep 2.0 ;# 2fs/step
rigidBonds all ;# needed for 2fs steps
nonbondedFreq 1
fullElectFrequency 2
```

```

stepspercycle      10

# Constant Temperature Control

langevin            on      ;# do langevin dynamics
langevinDamping    5       ;# damping coefficient (gamma) of
5/ps
langevinTemp       300
langevinHydrogen   off     ;# don't couple langevin bath to
hydrogens

# Periodic Boundary Conditions
if {1} {
  cellBasisVector1 101.84399795532227 0. 0.
  cellBasisVector2 0. 102.29700088500977 0.
  cellBasisVector3 0. 0 101.5359992980957
  cellOrigin       -0.10209877043962479 0.3340632915496826
-0.08042468875646591
}
wrapAll            on

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME                yes
# let NAMD determine grid
#PMEGridSpacing    1.0

PMEGridSizeX      108
PMEGridSizeY      108
PMEGridSizeZ      108

# Constant Pressure Control (variable volume)
useGroupPressure   yes ;# needed for rigidBonds
useFlexibleCell    no
useConstantArea    no

langevinPiston     on
langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 100.
langevinPistonDecay 50.
langevinPistonTemp 300

# Output
outputName         $outputname

restartfreq        200      ;# 500steps = every 1ps
#velDCDfile        vel0.1
#velDCDfreq        50
dcdfreq           200
xstFreq           200
outputEnergies    100
outputPressure     100

#fixedAtoms        on
#fixedAtomsForces  on
#fixedAtomsFile    ref_3BQD.pdb
#fixedAtomsCol     B

```

```
#####  
## EXTRA PARAMETERS ##  
#####
```

```
# Minimization  
minimize 100  
reinitvels 300  
  
run 10000
```

```
#####  
## EXECUTION SCRIPT ##  
#####
```

4. NVT configuration file

```
#####  
## JOB DESCRIPTION ##  
#####
```

```
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##  
#####
```

```
structure 4CS-H2O.psf  
coordinates min_4CS-H2O.coor  
binCoordinates eq_4CS-H2O_NPT-3.restart.coor  
extendedSystem eq_4CS-H2O_NPT-3.restart.xsc  
set temperature 300  
set outputname eq_4CS-H2O_NVT-0
```

```
firsttimestep 0
```

```
#####  
## SIMULATION PARAMETERS ##  
#####
```

```
# Input  
paraTypeCharmm on  
parameters par_all27_prot_na.inp  
parameters ectoin_with_H_2.par  
temperature $temperature
```

```
# Force-Field Parameters  
exclude scaled1-4  
1-4scaling 1.0  
cutoff 12.0  
switching on  
switchdist 10.0  
pairlistdist 14.0
```

```

# Integrator Parameters
timestep          2.0  ;# 2fs/step
rigidBonds        all  ;# needed for 2fs steps
nonbondedFreq     1
fullElectFrequency 2
stepspercycle     10

# Constant Temperature Control

langevin          on    ;# do langevin dynamics
langevinDamping   5     ;# damping coefficient (gamma) of
5/ps
langevinTemp      $temperature
langevinHydrogen  off   ;# don't couple langevin bath to
hydrogens

# Periodic Boundary Conditions
cellBasisVector1  76.0252  0.  0.
cellBasisVector2  0.  76.3404  0.
cellBasisVector3  0.  0  76.5701
cellOrigin        -0.1075 0.3021 -0.1166

wrapAll           on

# PME (for full-system periodic electrostatics)
PME               yes
# let NAMD determine grid
PMEGridSpacing    1.0

PMEGridSizeX     80
PMEGridSizeY     80
PMEGridSizeZ     80

# Constant Pressure Control (variable volume)
useGroupPressure  yes ;# needed for rigidBonds
useFlexibleCell   no
useConstantArea   no

#langevinPiston    on
#langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
#langevinPistonPeriod 100.
#langevinPistonDecay  50.
#langevinPistonTemp  $temperature

# Output
outputName        $outputname

restartfreq       200      ;# 500steps = every 1ps
#velDCDfile       vel0.1
#velDCDfreq       50
dcdfreq           500
xstFreq           200
outputEnergies    100
#outputPressure    100

#fixedAtoms       on

```

```

#fixedAtomsForces      on
#fixedAtomsFile        ref_DQA0.pdb
#fixedAtomsCol         B

#####
## EXTRA PARAMETERS                                     ##
#####

#reinitvels            $temperature
# For heating, use temperature reassignment.
#reassignFreq 100
#reassignTemp 0
#reassignIncr 10
#reassignHold 310
reinitvels 300

run      5000000      ;# 10ns

#####
## EXECUTION SCRIPT                                     ##
#####

```

5. Bash Script για απομόνωση τιμών από logfile

```

#!/bin/bash
echo Name of the log file?
read logname
echo Name of the measurement we need?
read measurement
echo Name of the output file?
read newfilename
grep -iw "$measurement" $logname.txt > $newfilename.txt

```

6. Script ενυδάτωσης για το packmol

```

tolerance 2.0
filetype pdb
output solvated_ectoine.pdb

structure ectoin.pdb
  number 320
  center
  fixed 0. 0. 0. 0. 0. 0.
end structure

structure H2O.pdb
  number 9999
  inside box -50. -50. -50. 50. 50. 50.
end structure

```

7. Conf_PBC.tcl script για τον υπολογισμό διαστάσεων του κελιού

```
# Periodic Boundary Conditions
set sel [atomselect top all]
set cen [measure center $sel]
set mm [measure minmax $sel]
set vmin [lindex $mm 0]
set vmax [lindex $mm 1]
set vdif [vecsub $vmax $vmin]
set xx [lindex $vdif 0]
set yy [lindex $vdif 1]
set zz [lindex $vdif 2]
set cenx [lindex $cen 0]
set ceny [lindex $cen 1]
set cenx [lindex $cen 2]
set padding 0
# PME (for full-system periodic electrostatics)
package require pmepot
set gridsizex [::PMEPot::good_fft_dim $xx]
set gridsizey [::PMEPot::good_fft_dim $yy]
set gridsizez [::PMEPot::good_fft_dim $zz]

#Now let's print necessary lines to be inserted in namd.conf
file

puts "TO_NAMD:cellBasisVector1      [expr $xx+$padding]      0.
0."
puts "TO_NAMD:cellBasisVector2      0.      [expr $yy+$padding]
0."
puts "TO_NAMD:cellBasisVector3      0.      0      [expr
$zz+$padding]"
puts "TO_NAMD:cellOrigin              $cenx $ceny $cenx"
puts "TO_NAMD:wrapAll                  on"
puts "TO_NAMD:PME                       yes"
puts "TO_NAMD:PMEGridSizeX             $gridsizex"
puts "TO_NAMD:PMEGridSizeY             $gridsizey"
puts "TO_NAMD:PMEGridSizeZ             $gridsizez"
```


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] <http://m3g.iqm.unicamp.br/packmol/home.shtml>
- [2] <https://www.rcsb.org/>
- [3] <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
- [4] <http://www.arguslab.com/>
- [5] <http://www.openrasmol.org/>
- [6] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
- [7] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>
- [8] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/psfgen/>
- [9] <http://m3g.iqm.unicamp.br/packmol/home.shtml>
- [10] Graf, R. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clinics in dermatology* 326-33. From: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691511>.
- [11] Bernard, T. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens* *Microbiology* 139. From: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-139-1-129>.
- [12] PubChem. Διαθέσιμο σε: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/126041#section=Top>
- [13] Peters, P. The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiology Letters* 71. Διαθέσιμο σε: <https://academic.oup.com/femsle/article/71/1-2/157/556953>
- [14] Reshetnikov, A. Genes and enzymes of ectoine biosynthesis in halotolerant methanotrophs.. *Methods Enzymology* 495. Διαθέσιμο σε: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419912>
- [15] PubChem. Διαθέσιμο σε: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/deuterium_oxide#section=Top
- [16] Water Structure and Science. Διαθέσιμο σε: http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_properties.html
- [17] Katz, J.J. 1965. Chemical and biological studies with deuterium. 39th Annual Priestly Lecture, Pennsylvania State University, University Park, Pa. pp. 1–110, August 2008.
- [18] Mosin, O. V; Ignatov, I. (2012). "Studying of Isotopic Effects of Heavy Water in Biological Systems on Example of Prokaryotic and Eukaryotic Cells". *Biomedicine*. **1** (1–3): 31–50.
- [19] Heavy water reactors : status and projected development. — Vienna : International Atomic Energy Agency, 2002. — (Technical reports series, ISSN 0074–1914 ; no. 407)
- [20] <https://sno.phy.queensu.ca/sno/sno2.html>
- [21] Kermel, F. *Broadband dielectric spectroscopy*. (chapters 1,7,16,18)
- [22] Debye, P., *Polar Molecules*; Dover: New York, 1929.
- [23] Takashima, S., *Electrical Properties of Biopolymers and Membranes*; Adam Holger: Bristol, 1989
- [24] Asami, K.; Yonezawa, T.; Wakamatsu, H.; Koyanagi, N., *Bioelectrochem Bioenergetics*, 1996, 40, 141-145.
- [25] Gheorghiu, E., *Bioelectromagnetics*, 1996, 17, 475-482.
- [26] Yang, L.; Weerasinghe, S.; Smith, P.; Pettitt, B., *Biophysical Journal*, 1995, 69, 1519-1527.
- [27] Yarnell, J.; Katz, M.; Wenzel, R.; Koenig, S. (1973). "Structure Factor and Radial Distribution Function for Liquid Argon at 85 °K". *Physical Review A*. **7** (6): 2130.

- [28] <http://isaacs.sourceforge.net/phys/rdfs.html>
- [29] Matteoli, E. A simple expression for radial distribution functions of pure fluids and mixtures. *J. Chem. Phys.* 103. Διαθέσιμο σε: <https://pdfs.semanticscholar.org/7306/742db34d0036f67ffa934d653f58b900d59e.pdf>
- [30] Rapaport, D. C. (2001). *The Art of Molecular Dynamics Simulation*, Cambridge: Cambridge University.
- [31] Allen, M. P. & Tildesley, D. J. (1987). *Computer Simulation of Liquids*, Oxford: Clarendon.
- [32] "Introduction to Molecular Dynamics Simulation", Michael P. Allen, *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, Lecture Notes, Norbert Attig, Kurt Binder, Helmut Grubmüller, Kurt Kremer (Eds.), John von Neumann Institute for Computing, Juelich, NIC Series, Vol. 23, ISBN 3-00-012641-4, pp. 1-28, 2004.
- [33] <http://staff.science.nus.edu.sg/~phywjs/lecture-notes/cpnote3.pdf>
- [34] "Molecular Dynamics", Jaroslaw Meller, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001*, Nature Publishing Group / www.els.net
- [35] *Series on Neutron Techniques and Applications - Vol 2. Single Crystal Neutron Diffraction From Molecular Materials*. Chick C Wilson. Editor World Scientific 2000. ISBN 981-02-3776-6
- [36] <http://wild.life.nctu.edu.tw/class/common/energy-unit-conv-table.html>
- [37] University of Illinois, *NAMD TUTORIAL Unix/MacOSX Version*. Διαθέσιμο σε: <https://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-unix.pdf>
- [38] Huggins, D. (Φεβρουάριος 2012). Correlations in Liquid Water for the TIP3P-Ewald, TIP4P-2005, TIP5P-Ewald and SWM4-NDP Models. *J Chem Phys.* Διαθέσιμο σε: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4766739/>
- [39] V. Zoete, M. A. Cuendet, A. Grosdidier, O. Michielin, *SwissParam, a Fast Force Field Generation Tool For Small Organic Molecules*, *J. Comput. Chem*, 2011, 32(11), 2359-68. PMID: 21541964, DOI: 10.1002/jcc.21816.
- [40] L. Martínez, R. Andrade, E. G. Birgin, J. M. Martínez. Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 30(13):2157-2164, 2009.
- [41] Ryan J Halter, Tian Zhou, Paul M Meaney, Alex Hartov, Richard J Barth Jr, Kari M Rosenkranz, Wendy A Wells, Christine A Kogel, Andrea Borsic, Elizabeth J, Rizzo, and Keith D Paulsen, The correlation of in vivo and ex vivo tissue dielectric properties to validate electromagnetic breast imaging: initial clinical experience. *Physiol Meas.* 2009 June ; 30(6): S121–S136. doi:10.1088/0967-3334/30/6/S08
- [42] Nathaniel D. Kwok Dominique Thomas, Bilal Chughtai, (2018). Chapter 16 - Transurethral Microwave Thermotherapy for Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia, In "A Comprehensive Guide to the Prostate Eastern and Western Approaches for Management of BPH", Pages 131-141, Academic Press ISBN: 9780128114643
- [43] http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_vibrational_spectrum.html