



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนด์ของไลโปโปรตีนนาโนดิสก์
Coarse-grained molecular dynamics simulation of lipoprotein nanodiscs

ชื่อนิสิต นางสาวภาสวัน ภริตานนท์

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนด์ของไลโปโปรตีนนาโนดิสก์
Coarse-grained molecular dynamics simulation of lipoprotein
nanodiscs

โดย
นางสาวภาสวัน ภริตานนท์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560

โครงการ การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สแกรนด์ของไลโปโปรตีนนาโนดิสก์

โดย นางสาว ภาสวัน ภริตานนท์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ


.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ทารหนองบัว)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์)


.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนด์ของไลโปโปรตีนนาโนดิสก์

ชื่อนิติในโครงการ นางสาว ภาสวัน ภริตานนท์ เลขประจำตัว 5733140723

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

เมมเบรนโปรตีนมีความยากที่จะจัดการเนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ไม่ดี มีข้อจำกัดในการศึกษา มากกว่าโปรตีนที่ละลายน้ำได้ แนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหานี้ คือ การห่อหุ้มเมมเบรนโปรตีนด้วยนาโนดิสก์ นาโนดิสก์ เป็น สารไลโปโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิพิดไบเลเยร์ที่ถูกห่อหุ้มล้อมเป็นวงด้วยสายพอลิเพปไทด์จำนวน 2 สาย การใช้นาโนดิสก์เพื่อเป็นสารห่อหุ้มเมมเบรนโปรตีนเป็นที่น่าสนใจในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม ความรู้ความเข้าใจ เกี่ยวกับสมบัติทางกายภาพในระดับโมเลกุลยังมีไม่มากนัก การศึกษานี้ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนด์เพื่อสำรวจโครงสร้าง พลวัตและสมบัติทางกายภาพของนาโนดิสก์ในสารละลาย การศึกษานี้ได้สร้างระบบแบบจำลองแบบนาโนดิสก์สองแบบที่มีฟอสโฟลิพิดสองชนิด คือ 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) และ 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) โดยมีสายอโพลีโพรตีน เอ-วัน (Apolipoprotein A-I) ถูกห่อหุ้มล้อมฟอสโฟลิพิด เพื่อศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างของนาโนดิสก์ การจำลองด้วยวิธี CG-MD ได้ดำเนินการที่อุณหภูมิ 200 300 และ 400 เคลวิน เป็นระยะเวลา 1 ไมโครวินาที ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลทราเจคทอรีของแต่ละระบบในแต่ละอุณหภูมิซึ่งประกอบด้วยความเบี่ยงเบนของรากที่สองของค่าเฉลี่ยของผลต่างกำลังสอง (RMSD) รัศมีไจเรชัน (Rg) และพื้นที่ผิวสัมผัสตัวทำละลาย พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อสภาพทางโครงสร้างและพลวัตของนาโนดิสก์ทั้งสองชนิด นาโนดิสก์มีความความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิไปทำให้อันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับฟอสโฟลิพิดในนาโนดิสก์อ่อนลง ส่งผลให้เกิดการคลายตัวของสายอโพลีโพรตีน เอ-วัน ทำให้การจัดเรียงโมเลกุลโปรตีนและฟอสโฟลิพิดในนาโนดิสก์ จึงอยู่กันอย่างหลวมๆ และอาจทำให้ความเสถียรของโครงสร้างนาโนดิสก์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่าง DPPC-nanodisc กับ POPC-nanodisc พบว่าผลกระทบจากการเพิ่มอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของระบบ DPPC-nanodisc ไม่รุนแรงเท่ากับระบบ POPC-nanodisc โดยพบว่า DPPC-nanodisc มีการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงโครงสร้างที่มีทิศทางไปในเดียวกับการเพิ่มอุณหภูมิ ในขณะที่ การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงโครงสร้างของ POPC-nanodisc ไม่มีทิศทางที่แน่นอนเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และดูเหมือนว่า การตอบสนองต่อความร้อนของ POPC-nanodisc ทำให้โครงสร้างมีเสถียรภาพน้อยกว่า DPPC-nanodisc

คำสำคัญ : นาโนดิสก์, การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล, คอร์สเกรนด์

Project Title Coarse-grained molecular dynamics simulation of lipoprotein nanodisc
Student Name Miss Pasawan Paritanon **Student ID** 5733140723
Advisor Name Assoc. Prof. Dr. Pornthep Sompornpisut
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

Membrane proteins are difficult to handle because of poor water solubility. There are more limitations of the study than those of soluble proteins. One approach to solve this problem is to encapsulate the membrane protein with a nanodisc. The nanodisc is a lipoprotein, which consists of a phospholipid bilayer that is surrounded by two polypeptide chains. The use of nanodiscs to encapsulate membrane proteins are of recent interest. However, there is little understanding of the physical properties at the molecular level. This study uses coarse-grained molecular dynamics (CG-MD) simulation to investigate structure, dynamics and physical properties of nanodiscs in solution. This study has constructed two nanodisc model systems that have two different phospholipids: 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), which are encircled by apolipoprotein A-1. To study the influence of temperature on the stability and structural changes of the nanodiscs, the CG-MD simulations were performed at temperatures of 200, 300 and 400 K for a period of 1 microsecond. The results of each trajectory at each temperature, including root-mean-square deviation (RMSD), radius of gyration (R_g) and solvent accessible surface area show that the temperature affects both the structure and dynamics of the two nanodiscs. The nanodiscs have increased flexibility when temperature increases. Due to the increase in temperature, the interactions between proteins and phospholipids in the nanodiscs are weakened. As a result, apolipoprotein A-1 has loosely bound to the phospholipid. The protein and phospholipid molecules in the nanodiscs are loosely packed. This may reduce the stability of the nanodisc structure. Comparing the results between DPPC-nanodisc and POPC-nanodisc, it was found that the effect of temperature-induced structural change for DPPC-nanodisc is not as severe as POPC-nanodisc. For DPPC-nanodisc, changes in structural properties have the same direction as increases in temperature whereas changes in structural properties of POPC-nanodisc are uncertain as temperature increases. It seems that thermal response of POPC-nanodisc makes the structure to be less stable than DPPC-nanodisc.

Keywords : Nanodisc, Molecular dynamic, coarse-grained

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำปรึกษาและการถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว และ รองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา กรรมการสอบโครงการ ตลอดจนให้คำแนะนำและแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่ๆในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ทุกคน สำหรับการช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์และภาควิชาเคมีที่ให้การสนับสนุนในด้านเครื่องมืออุปกรณ์ ซอฟต์แวร์และสถานที่ในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนโครงการภายใต้โครงการการเรียนการสอนเพื่อสร้างเสริมประสบการณ์ประจำปีการศึกษา 2560

| สารบัญ | | หน้า |
|--|--|-----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | | ค |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | | ง |
| กิตติกรรมประกาศ | | จ |
| สารบัญ | | ฉ |
| สารบัญรูป | | ช |
| สารบัญตาราง | | ญ |
| บทที่ 1 บทนำ | | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ | | 1 |
| 1.2 นาโนดิสก์ | | 2 |
| 1.3 ชนิดของฟอสโฟลิพิด | | 6 |
| 1.4 การทบทวนวรรณกรรม | | 7 |
| 1.5 วัตถุประสงค์ของโครงการ | | 8 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ | | 9 |
| 2.1 กลศาสตร์เชิงโมเลกุล | | 9 |
| 2.2 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล | | 12 |
| 2.3 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอर्सเกรนด์ | | 13 |
| 2.4 โปรแกรมสำหรับการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล | | 14 |
| 2.5 การวิเคราะห์ผลการคำนวณ | | 15 |
| บทที่ 3 ขั้นตอนการศึกษา | | 17 |
| 3.1 วัสดุอุปกรณ์ | | 17 |
| 3.2 วิธีการทดลอง | | 17 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง | | 21 |
| 4.1 องค์ประกอบและแบบจำลองโครงสร้างของนาโนดิสก์ | | 21 |
| 4.2 แบบจำลองคอสเกรนด์ของนาโนดิสก์ | | 23 |
| 4.3 แบบจำลองคอสเกรนด์ของนาโนดิสก์ในสารละลาย | | 23 |
| 4.4 สมบัติทางโครงสร้างและพลวัตของนาโนดิสก์ | | 24 |

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ 5 สรุปลผลการทดลอง

ข้อเสนอแนะ

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก

ประวัติผู้ทำวิจัย

หน้า

31

32

33

36

40



สารบัญรูปประกอบ

| | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 1.1 รูปภาพแสดงรูปร่างของไลโปโพรตีน นาโนดิสก์ | 3 |
| รูปที่ 1.2 รูปภาพแสดงรูปร่างของ apolipoprotein A-I (ApoA-I) | 3 |
| รูปที่ 1.3 รูปภาพแสดงโครงสร้างทั้งสามแบบของ อีโพอ เอ-ไอ (ApoA-I) ในมนุษย์ | 4 |
| รูปที่ 1.4 รูปภาพแสดงการจัดเรียงตัวแบบดับเบิล เบล์ทของอีโพอ เอ-ไอ | 5 |
| รูปที่ 1.5 รูปภาพแสดงโครงสร้างของฟอสโฟลิพิด | 6 |
| รูปที่ 2.1 รูปภาพแสดงกราฟแสดงค่าพลังงานแวนเดอร์วาลส์จากการคำนวณด้วยพลังงานศักย์ Lennard-Jones และพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณ | 11 |
| รูปที่ 2.2 ภาพแสดงคอสเกรนโมเดลเป็นการจัดกลุ่มอะตอมหรือที่เรียกว่า บีต (bead) | 14 |
| รูปที่ 2.3 รูปภาพแสดงการสร้างภาพแบบจำลองโมเลกุลนาโนดิสก์แบบคอร์สเกรนดด้วยโปรแกรม VMD | 14 |
| รูปที่ 3.1 รูปภาพแสดงการแปลงแบบจำลองทุกอะตอมของนาโนดิสก์ให้เป็นบีตในโปรแกรม VMD | 18 |
| รูปที่ 3.2 รูปภาพแสดงเมนู CG Builder ในโปรแกรม VMD | 18 |
| รูปที่ 4.1 รูปภาพแสดงโครงสร้างของสายอีโพอไลโพรตีน เอ-วันทั้ง P1 และ P2 ก่อนนำมาซิมูเลชัน | 22 |
| รูปที่ 4.2 รูปภาพแสดงโครงสร้างของนาโนดิสก์ชนิด (A) และ (B) | 22 |
| รูปที่ 4.3 รูปภาพแสดงโครงสร้างแบบจำลองคอสเกรนดของนาโนดิสก์ชนิด DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc | 23 |
| รูปที่ 4.4 รูปภาพแสดงระบบแบบจำลองคอสเกรนดของนาโนดิสก์ในสารละลาย มีลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยมมุมฉากที่มีขนาด $100\text{\AA} \times 100\text{\AA} \times 140\text{\AA}$ | 24 |
| รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่า RMSD หน่วยเป็น (\AA) ของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc | 24 |
| รูปที่ 4.6 MD snapshot ของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc ที่อุณหภูมิ 300 เคลวิน | 26 |
| รูปที่ 4.7 กราฟแสดงค่า Rg หน่วยเป็น (\AA) ของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc | 27 |
| รูปที่ 4.8 กราฟแสดงค่า Surface area หน่วยเป็น (\AA^2) ของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc บริเวณผิวสัมผัส upper & lower | 28 |
| รูปที่ 4.9 กราฟแสดงค่า Standard deviation ในแต่ละอุณหภูมิของ RMSD (บนซ้าย), Radius of gyration (Rg)(บนขวา), Surface area.(ล่าง) | 29 |

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าผลการคำนวณของการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล
แบบคอร์สเกรนด์

หน้า

25



บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจของโครงการ

การศึกษาโครงสร้างระดับโมเลกุลของเมมเบรนโปรตีนมีกระบวนการที่ยุ่งยากและซับซ้อน เนื่องจากเมมเบรนโปรตีนฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นชั้นไขมัน เมมเบรนโปรตีนจึงมีสภาพการละลายน้ำต่ำมาก ปัญหาเรื่องการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดลองเพื่อวัดค่าต่างๆ ในขณะที่โปรตีนยังคงสภาพ มีความเสถียร และสามารถทำงานตลอดช่วงระยะเวลาการทดลองจึงเป็นอุปสรรคสำคัญ โดยทั่วไป การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลรวมถึงการทำงานของสารชีวโมเลกุล เช่น การหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนด้วยวิธีฟิสิกส์ศาสตร์รังสีเอ็กซ์ (x-ray crystallography) หรือการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอื่นๆ มักใช้น้ำเป็นตัวทำละลายหลัก ดังนั้น จึงเป็นเรื่องที่ทำทนายในการพัฒนาวิธีหรือกระบวนการในการหาทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษาโครงสร้างและการทำงานของโปรตีนโดยลดการเสียสภาพ หรือลดผลกระทบต่างๆ จากสภาพแวดล้อมที่มีต่อโปรตีนให้ได้มากที่สุด

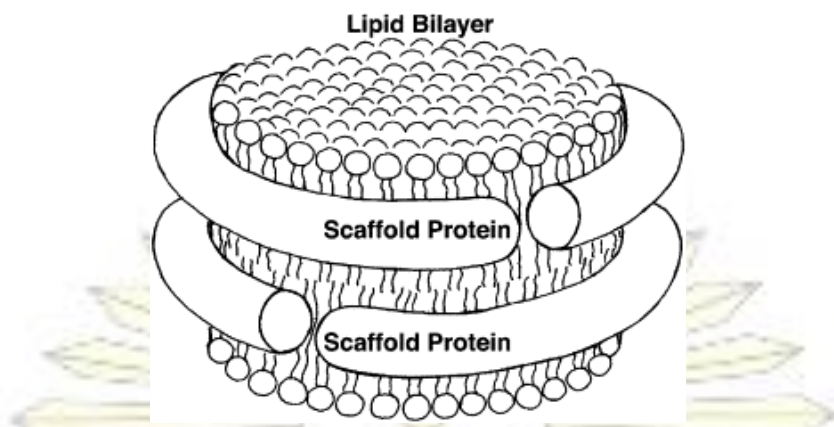
ทางเลือกหนึ่งในการใช้ตัวทำละลายเพื่อศึกษาวิจัยเมมเบรนโปรตีนคือการใช้สารหล่อหุ้มที่เป็น สารลดแรงตึงผิวเช่น ผงซักฟอก (detergent) [1] เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวมีสมบัติแอมฟิพาธิค (amphipathic) กล่าวคือ มีทั้งกลุ่มมีขั้ว (polar) ชอบน้ำ และกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในโมเลกุลเดียวกัน การใช้สารลดแรงตึงผิวไปหล่อหุ้มเมมเบรนโปรตีน ทำให้ส่วนไม่ชอบน้ำหรือไฮโดรโฟบิกของเมมเบรนโปรตีนไม่สัมผัสกับน้ำโดยตรง ซึ่งเป็นหลักการเดียวกับการชำระคราบไขมันด้วยสบู่หรือผงซักฟอก สารลดแรงตึงผิวทำหน้าที่ในการหล่อหุ้มโมเลกุลเมมเบรนโปรตีนให้อยู่ในรูปอนุภาคไมเซลล์ (micelles) โดยหันเอาส่วนที่มีความเป็นขั้วออกเพื่อรวมตัวกับน้ำ เมื่อเมมเบรนโปรตีนถูกหุ้มห่อด้วยสารลดแรงตึงผิวก็จะทำให้ละลายน้ำได้ง่าย อย่างไรก็ตาม สารลดแรงตึงผิวเป็นสารที่มีลักษณะและสมบัติบางประการแตกต่างไปจากไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นการหล่อหุ้มด้วยสารลดแรงตึงผิวนั้น สามารถส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเมมเบรนโปรตีนให้ผิดแปลกไปจากโครงสร้างที่ควรจะเป็นในธรรมชาติ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน ด้วยเหตุนี้ทำให้การแปลผลและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นตัวทำละลายให้ผลที่คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงมากเกินกว่าที่จะยอมรับได้

การใช้สารห่อหุ้มอีกวิธีหนึ่งคือการใช้สารกลุ่มฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ซึ่งเป็นสารไขมันในธรรมชาติหรือใกล้เคียงธรรมชาติ สำหรับห่อหุ้มเมมเบรนโปรตีน การใช้วิธีนี้จะทำให้เมมเบรนโปรตีนอยู่ในสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติมากกว่า กล่าวคือสารกลุ่มฟอสโฟลิพิดสามารถก่อตัวให้มีลักษณะเยื่อหุ้มเมมเบรนสองชั้นหรือลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) เป็นอีกรูปแบบหนึ่งของเมมเบรนที่ถูกนำมาใช้ศึกษาเมมเบรนโปรตีน ข้อดีของการใช้สารกลุ่มฟอสโฟลิพิดคือมีสภาพใกล้เคียงธรรมชาติทำให้มีผลกระทบต่อโครงสร้างและการทำงานของเมมเบรนโปรตีนน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิว [2] เนื่องจาก การจัดเรียงของโมเลกุลฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ มีสภาพเสมือนเมมเบรนโปรตีนที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับความเป็นจริงในธรรมชาติมากกว่า แต่ข้อเสียคือสภาพการละลายน้ำต่ำ [3] เป็นอุปสรรคในการนำไปศึกษาด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี

อย่างไรก็ตามมีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ในการใช้สารห่อหุ้มเมมเบรนโปรตีนให้ใกล้เคียงธรรมชาติ ในขณะที่เดียวกันสามารถละลายน้ำได้และมีผลกระทบต่อโครงสร้างและการทำงานของโปรตีนไม่มากนัก นาโนดิสก์ (Nanodisc) เป็นสารห่อหุ้มเมมเบรนโปรตีนชนิดหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นและได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องในช่วงประมาณหนึ่งทศวรรษที่ผ่านมา นาโนดิสก์คืออะไร มีองค์ประกอบและลักษณะเป็นอย่างไร จะกล่าวในหัวข้อถัดไป

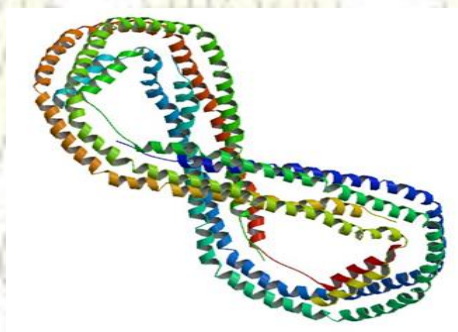
1.2. นาโนดิสก์

นาโนดิสก์ (Nanodisc) เป็นไลโปโปรตีนชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยวงสายพอลิเพปไทด์จำนวน 2 วงที่ห่อหุ้มฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ โครงสร้างของนาโนดิสก์เลียนแบบโมเลกุลไลโปโปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่าเอชดีแอล (HDL, high-density lipoprotein) นาโนดิสก์ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ทั้งสองสายขดคล้ายรูปวงแหวนปลายเปิดที่ห่อหุ้มหรือมัดกลุ่มโมเลกุลฟอสโฟลิพิด สายพอลิเพปไทด์ของนาโนดิสก์เรียกว่า เมมเบรนสคัลโฟลด์โปรตีน หรือเอ็มเอสพี (MSP) [4] ส่วนกลุ่มโมเลกุลฟอสโฟลิพิดมีการวางตัวและทิศทางในรูปของเยื่อหุ้มเมมเบรนสองชั้นหรือลิพิดไบเลเยอร์ และด้วยลักษณะคล้ายกับแผ่นดิสก์ไบเลเยอร์ (bilayer discoidal) [5] ที่มีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอ็มเอสพี นาโนดิสก์ที่สามารถเตรียมได้มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 7-17 นาโนเมตร [6] ดังรูปที่ 1.1



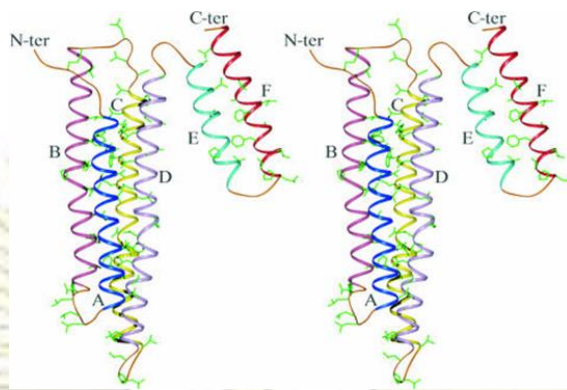
รูปที่ 1.1 : รูปภาพแสดงรูปร่างของไลโปโปรตีน นาโนดิสก์ (ที่มา: A schematic image of a nanodisc, a bioengineering device developed at the University of Illinois by Steve Sligar.)

อโพลีโปรตีน เอ-วัน หรือ อโพลี เอ-วัน (Apolipoprotein A-1, ApoA-1) (รูปที่ 1.2) เป็นเอ็มเอสพีที่มีสมบัติแอมฟิพาติก กล่าวคือ มีทั้งส่วนมีขั้วที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนไม่มีขั้วที่ไม่ชอบน้ำอยู่ภายในโมเลกุลเดียวกัน อโพลีโปรตีน เอ-วัน ประกอบด้วย กรดอะมิโนทั้งหมด 243 กรดอะมิโนซึ่งแบ่งออกเป็น 2 โดเมน คือ โดเมนปลายเอ็น (N-terminal domain) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 43 กรดอะมิโน และโดเมนปลายซี (C-terminal domain) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 200 กรดอะมิโน

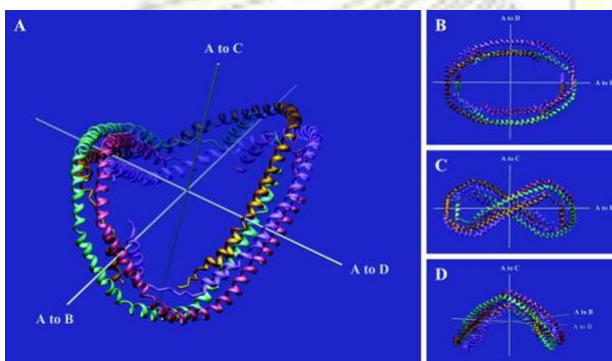


รูปที่ 1.2 : รูปภาพแสดงรูปร่างของ apolipoprotein A-1 (ApoA-1) [7-8]

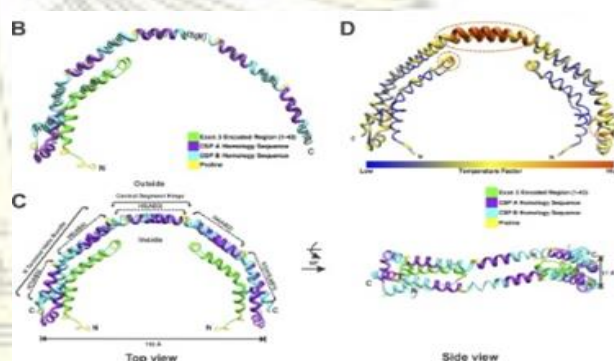
ในปัจจุบัน มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างของอโพลี เอ-วัน (ApoA-1) ในสภาพโปรตีนอิสระหรือสภาพที่ปราศจากฟอสโฟลิพิด ซึ่งปรากฏว่าโปรตีนอโพลี เอ-วันในสภาพนี้มีหลายคอนฟอร์เมชันที่แตกต่างกัน (รูปที่ 1.3) อย่างไรก็ตาม อโพลี เอ-วัน มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแบบเกลียวอัลฟา (α -helix) มากกว่าร้อยละ 80



a : โครงสร้างแบบที่ 1



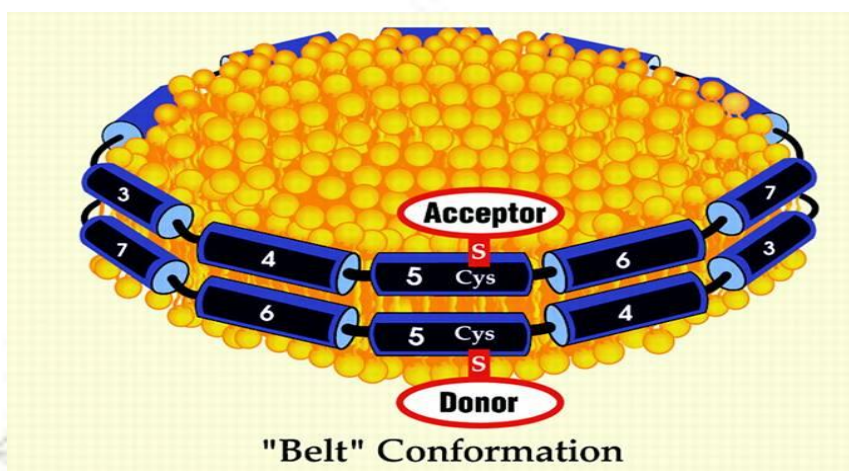
b : โครงสร้างแบบที่ 2



c : โครงสร้างแบบที่ 3

รูปที่ 1.3 : รูปภาพแสดงโครงสร้างทั้งสามแบบของ อโพ เอ-วัน (ApoA-1) ในมนุษย์ [7-9]

โครงสร้างแบบที่ 1 เป็นอโพ เอ-วัน ที่สายโพรตีนมีความยาวเต็มขนาด (full-length chain) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มโครงสร้างเกลียว 4 เกลียวที่ปลายเอ็น (N-terminal four-helix bundle) และโครงสร้างเกลียวปลายซี (C-terminal helix) ที่สั้นลงทั้งตำแหน่งปลายเอ็นและปลายซี(ดังรูปที่ 1.3a) [7] โครงสร้างอีกสองแบบคือการตัดโดเมนปลายเอ็นออกเป็นท่อนจากอโพ เอ-วัน (ApoA-1) โดยที่แบบที่สอง มีโครงสร้างเป็นวงคล้ายดิสก์ (ดังรูปที่ 1.3b) [8] ส่วนแบบที่สาม จะเป็นไดเมอร์แบบกึ่งครึ่งวงกลม (semicircle dimer) (ดังรูปที่ 1.3c) [9] โดยสายเพปไทด์ อโพ เอ-วัน จำนวนสองสายจัดวางตัวล้อมรอบโมเลกุลไขมันคล้ายเข็มขัดคู่ (belt) รัตรอบกลุ่มไขมัน เรียกการจัดเรียงลักษณะนี้ว่าดับเบิล เบลท์ (double-belt) (รูปที่ 1.4)

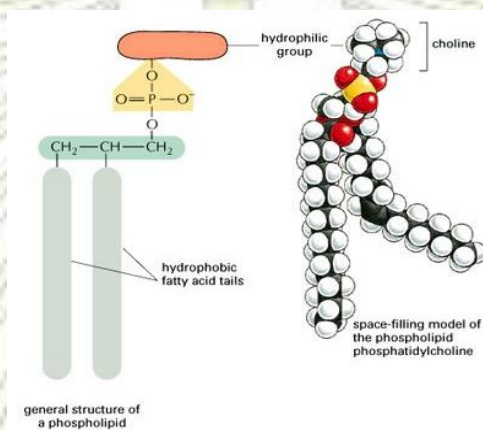


รูปที่ 1.4 : รูปภาพแสดงการจัดเรียงตัวแบบดัดเบิ้ล เบลท์ของอโป เอ-วัน (ที่มา: Structural Determination of Lipid-bound ApoA-1 Using Fluorescence Resonance Energy Transfer From the Departments of Pathology, Microbiology and Immunology, and Biochemistry, The Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, North Carolina 27157)

เนื่องจากพื้นผิวด้านนอกของนาโนดิสก์มีคุณสมบัติชอบน้ำหรือไฮโดรฟิลิก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดี นาโนดิสก์สามารถห่อหุ้มเมมเบรนโปรตีนโดยการจัดบริเวณภายในลิพิดไบเลเยอร์ให้เมมเบรนโปรตีนฝังตัวอยู่ ทำให้สามารถศึกษาเมมเบรนโปรตีนในอนุภาคนาโนดิสก์ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย นาโนดิสก์จึงเป็นสารห่อหุ้มเมมเบรนโปรตีนที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง ข้อได้เปรียบที่สำคัญคือภายในประกอบด้วยโมเลกุลฟอสโฟลิพิดจำนวนหนึ่งที่จับตัวกันในรูปของลิพิดไบเลเยอร์ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเยื่อหุ้มเซลล์สองชั้น (membrane bilayer) คงความเสถียรให้กับโปรตีน อีกทั้งน้ำสามารถเข้าถึงได้ทั้งสองด้านของนาโนดิสก์ ทำให้ลดการเสียสภาพกว่าสารละลายที่ประกอบด้วยลิโปโซม (liposomes) หรือไมเซลล์ (micelles) ดังนั้น นาโนดิสก์มีความแตกต่างไปจากสารห่อหุ้มที่เป็นสารลดแรงตึงผิว กล่าวคือนาโนดิสก์มีสถานะภาพเหมือนลิพิดไบเลเยอร์ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อโมเลกุลเมมเบรนโปรตีนถูกห่อหุ้มด้วยนาโนดิสก์ เมมเบรนโปรตีนก็จะเหมือนอยู่ในสภาพแวดล้อมใกล้เคียงเยื่อหุ้มเซลล์ [10] จากคุณสมบัติดังกล่าว นาโนดิสก์จึงได้รับความสนใจนำมาใช้เป็นตัวช่วยละลายและปรับปรุงคุณสมบัติเพื่อความเหมาะสมกับระบบที่ต้องการศึกษาโครงสร้างเมมเบรนโปรตีนอย่างแพร่หลาย [11-13]

1.3. ชนิดของฟอสโฟลิพิด

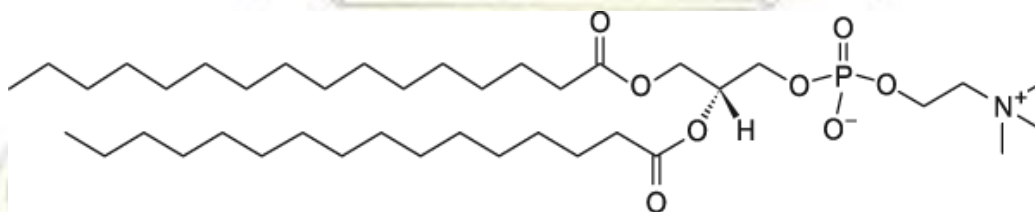
ฟอสโฟลิพิด เป็นสารไขมันที่พบทั้งในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ จัดเป็นองค์ประกอบหลักในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยฟอสโฟลิพิดเป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอล ประกอบด้วยกรดไขมันสองโมเลกุล (hydrophobic fatty acid tails) ยึดจับกับอะตอมคาร์บอนของกลีเซอรอลจำนวนสองอะตอม และอะตอมคาร์บอนอีกหนึ่งอะตอม จับกับหมู่ฟอสเฟต รวมไปถึงสารอื่นที่ยึดจับกับหมู่ฟอสเฟตอีกด้านหนึ่ง ซึ่งเป็นการกำหนดชนิดของฟอสโฟลิพิด เช่น โคลีน (choline)



รูปที่ 1.5 : รูปภาพแสดงโครงสร้างของฟอสโฟลิพิด (ที่มา: <https://ratchapark.wordpress.com>)

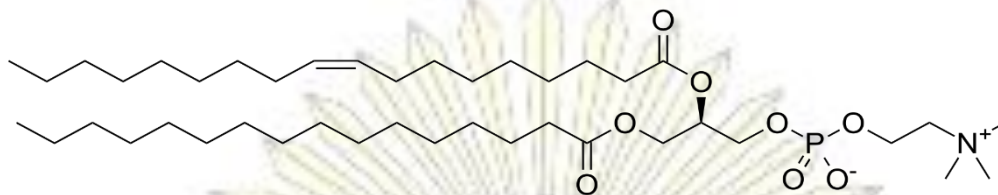
ในการศึกษานี้เลือกสร้างแบบจำลองนาโนดิสก์ที่ใช้ลิพิดของนาโนดิสก์ 2 ชนิดคือ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc เนื่องจากนาโนดิสก์ทั้งสองชนิดมีการจัดจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

โครงสร้างของ 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine หรือ DPPC



(ที่มา: Copyright 2018, Avanti Lipids Polar, Inc. | Website Designed by Denning eSolutions, Hosted by Infomedica Polar Bear photo provided by: Kyriakos Kaziras)

โครงสร้างของ 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine หรือ POPC



(ที่มา: Copyright 2018, Avanti Lipids Polar, Inc. | Website Designed by Denning eSolutions, Hosted by Infomedia Polar Bear photo provided by: Kyriakos Kaziras)

1.4. การทบทวนวรรณกรรม

อันตรกิริยาระหว่างไขมันและโปรตีนเป็นกระบวนการพื้นฐานที่สำคัญที่สุดในสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการต่างๆของเซลล์ เช่น การเรพพิเคชัน (replication), การแบ่งเซลล์ (cell division), การส่งสัญญาณ (signaling) และ การเคลื่อนไหว (movement) โดยตัวอย่างของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างไขมันและโปรตีน ได้แก่ ไลโปโปรตีน (lipoprotein) ซึ่งไลโปโปรตีนมีบทบาทสำคัญในการขนส่งโปรตีน, สารที่มีโมเลกุลเล็กๆ และสารจำพวกเมตาบอลิท เช่น คอเลสเตอรอล ภายในร่างกายจึงได้มีการปรับเปลี่ยนอนุภาคของไลโปโปรตีนเพื่อใช้ในการศึกษาเมมเบรนโปรตีน รวมไปถึงผลจากการรวมตัวกันของโปรตีนและไขมันที่สามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบทางระบบทางชีววิทยาต่อไปในอนาคต

ปลายทศวรรษที่ 1990 มีการนำกล้องจุลทรรศน์รุ่นใหม่ เรียกว่า กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมหรือ เอเอฟเอ็ม (Atomic Force Microscopes หรือ AFM) ที่สามารถทำงานใต้น้ำและเปลี่ยนรูปแบบของการถ่ายภาพ เพื่อให้ได้ตัวอย่างทางชีวภาพที่อ่อนนุ่ม โดยงานวิจัยของศาสตราจารย์แอนนา โจนาส (Ana Jonas) แห่งมหาวิทยาลัยฮิลลินอยส์ ได้บรรยายถึงกระบวนการเกี่ยวกับไขมันในเส้นเลือดและบทบาทของไลโปโปรตีน ในการส่งคอเลสเตอรอลแบบย้อนกลับ ซึ่งในกระบวนการทางการแพทย์ รูปแบบการไหลเวียนของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง หรือเอชดีแอล (high density lipoproteins, HDL) เป็นทรงกลมที่มีขนาดแตกต่างกันซึ่งประกอบด้วย คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol esters) ไขมัน และโปรตีน เนื่องจากได้รับวิธีการพัฒนาเพื่อสร้างอนุภาคเอชดีแอล ขนาดใหญ่ขึ้นมาใหม่ โดยการกำจัดสารลดแรงตึงผิวออกจากอนุภาค Apo-A I ที่ประกอบด้วยไขมันจากการแยกเลือดของมนุษย์สามารถตรวจพบอนุภาคเอชดีแอลเหล่านี้ได้ และผลที่ได้จากการตัดต่อพันธุวิศวกรรมนี้ เรียกว่า “เมมเบรนสคัลโฟลด์โปรตีน (membrane scaffold proteins)” ที่สามารถประกอบตัวเองเข้ากับ แผ่นดิสก์ฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ (discoidal phospholipid bilayers) จึงเรียกว่า นาโนดิสก์ [4]

ในปี ค.ศ.1997 ได้มีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular Dynamics Simulation: MD) ครั้งแรก ของ นาโนดิสก์ โดยใช้วิธีแบบ MD simulated annealing (MDSA) เพื่อเปรียบเทียบความเสถียรในการ จัดเรียงตัวของสายอโพลีโพรตีน เอ-วัน ทั้งสองสายที่มีลักษณะ หัวชนหัว และหัวชนหาง รวมไปถึงการ กำหนดค่าต่างๆในแบบจำลองเพื่อศึกษาสมบัติทางโครงสร้างเชิงพลวัตและสมบัติทางกายภาพของนาโนดิสก์ [17]

ในช่วงปี ค.ศ.2001–2010 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนด (coarse-grained) [14,15] จึงได้เข้ามามีบทบาทสำคัญเพื่อใช้ศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะทางกายภาพ เนื่องจากการจำลองระบบของนา โนดิสก์มีอะตอมเป็นจำนวนมาก จึงต้องใช้ทรัพยากรคอมพิวเตอร์และเวลาที่สูงด้วยเช่นกัน แบบจำลอง โครงสร้างแบบคอร์สเกรนด (coarse-grained model) เป็นการจับกลุ่มอะตอมหลายอะตอมรวมเข้าด้วยกัน เป็นวัตถุ 1 ชิ้นคล้ายเม็ดลูกปัด เรียกว่า บีด (bead) เช่น กรดอะมิโน 1 กรดอะมิโน (มีประมาณ 15-50 อะตอม) ประกอบด้วยบีด 2-5 บีด หรือน้ำ 4 โมเลกุลแทนด้วย 1 บีด เป็นต้น แบบจำลองคอร์สเกรนดจะลด จำนวน degree of freedom ของระบบได้มาก ทำให้สามารถขยายการศึกษาระบบชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ขึ้นหรือมีจำนวนอะตอมเป็นหลักหลายแสนหรือล้านอะตอมได้

1.5. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อจำลองโครงสร้างและพลวัตของนาโนดิสก์ด้วยเทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนด (coarse-grained molecular dynamics simulations) ด้วยโปรแกรม NAMD [16]
- เพื่อสำรวจอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างของนาโน ดิสก์ โดยใช้นาโนดิสก์สองชนิด ได้แก่ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กลศาสตร์เชิงโมเลกุล (Molecular mechanics)

2.1.1. ฟังก์ชันพลังงานศักย์

กลศาสตร์เชิงโมเลกุล (Molecular mechanics : MM) เป็นทฤษฎีหนึ่งที่ใช้ในการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของสารชีวโมเลกุล พลังงานศักย์ของโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลที่อยู่ภายในระบบคำนวณโดยอาศัยพื้นฐานทางกลศาสตร์ของโมเลกุล เช่น พลังงานของการสั่นของพันธะ การบิดของมุมระหว่างพันธะ การหมุนของพันธะ แรงระหว่างประจุ และแรงแวน เดอ วาลส์ เป็นต้น ดังนั้น ตามทฤษฎีกลศาสตร์เชิงโมเลกุล การคำนวณพลังงานศักย์ของระบบจะใช้สมการสำเร็จรูปซึ่งค่าพลังงานศักย์จะฟังก์ชันของตำแหน่งของนิวเคลียสหรือของอะตอม หรืออาจกล่าวง่าย ๆ ว่า พลังงานของระบบเป็นไปตามโครงสร้างของโมเลกุล

สมการที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง พลังงานศักย์รวมของระบบกับฟังก์ชันพลังงานศักย์พจน์ต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยพารามิเตอร์หรือตัวแปรเชิงโครงสร้างที่อยู่ในพจน์พลังงานศักย์เหล่านี้ ดังนั้น การคำนวณค่าพลังงานศักย์ของระบบต้องมีค่าคงที่ของชุดพารามิเตอร์ที่ใช้อ้างอิง เช่น r_0 , θ_0 , V_n , σ , q_i และ q_j (สมการที่ 1) และชุดตัวแปรที่ผันแปรตามโครงสร้าง เช่น r , θ , τ , ϕ และ r_{ij} หรืออีกนัยหนึ่ง พลังงานศักย์ของระบบเป็นผลรวมของพลังงานของโมเลกุลที่เกิดพันธะ (bonded interaction) และพลังงานของโมเลกุลที่ไม่ได้เกิดพันธะกันโดยตรง (non-bonded interaction) ดังแสดงในสมการที่ 2 ฟังก์ชันพลังงานที่เกิดพันธะภายในโมเลกุลประกอบด้วย พลังงานพันธะ (U_{bonds}), พลังงานมุมพันธะ (U_{angles}), พลังงานมุมไดฮีดรัล ($U_{\text{dihedrals}}$) ส่วนพลังงานระหว่างโมเลกุลมีสองแบบ คือ แรงระหว่างประจุ (electrostatic force, U_{ele}) และ แรงแวน เดอ วาลส์ (van der Waals force) ดังแสดงในสมการที่ 3

$$U = \sum_{\text{bonds}} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos[n\tau - \phi]) + \sum_{i < j}^{\text{atoms}} 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \quad [1]$$

$$U = U_{\text{bonded}} + U_{\text{non-bonded}} \quad [2]$$

$$U = (U_{bonds} + U_{angles} + U_{dihedrals})_{bonded} + (U_{ele} + U_{vdW})_{non-bonded} \quad [3]$$

2.1.2. พารามิเตอร์สนามแรง (Force field parameter)

force field parameter เป็นชุดพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณพลังงานศักย์ พารามิเตอร์เหล่านี้ ได้แก่ ความยาวพันธะ, มุมพันธะ และค่าคงที่ของแรง (force constants)

2.1.3. พลังงานศักย์ของอันตรกิริยาที่เกิดพันธะ (Potential energy of bonded interactions)

พลังงานอันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของความยาวพันธะฟังก์ชันพลังงานศักย์ชนิดนี้แสดงในรูปสมการการเคลื่อนที่แบบฮาร์โมนิกอย่างง่าย ดังแสดงในสมการที่ 4 โดยมีพารามิเตอร์ k_b คือ ค่าคงที่ของแรงสำหรับการยืดหดของพันธะ (bond stretching) r คือระยะห่างระหว่างอะตอมที่เกิดจากการยืดหดของพันธะและค่า r_0 คือ ความยาวพันธะ

$$U_{bonds} = \sum_{bonds} k_b (r - r_0)^2 \quad [4]$$

ค่าพลังงานอันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของมุมพันธะ (angle bending) แสดงในสมการที่ 5 k_θ คือ ค่าคงที่ของแรงจากมุมพันธะที่เปลี่ยนไปอันเกิดจากการบิดระหว่างพันธะ θ_0 คือมุมพันธะที่สมดุล

$$U_{angle} = \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad [5]$$

พลังงานอันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงมุมไดฮีดรัล (dihedral angle) ซึ่งฟังก์ชันพลังงานศักย์นี้แสดงอยู่ในรูปฟังก์ชันโคซายน์ (cosine function) แสดงดังสมการที่ 6

$$U_{dihedral} = \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} (1 + \cos[n\tau - \phi]) \quad [6]$$

โดย V_n คือ ค่าพลังงานศักย์สูงสุดของมุมไดฮีดรัล n คือ จำนวนลูกคลื่นของฟังก์ชันโคซายน์ที่อยู่ระหว่างมุม 0 ถึง 360 องศา τ คือ ค่ามุมไดฮีดรัล และ j คือ เฟสของฟังก์ชันโคซายน์

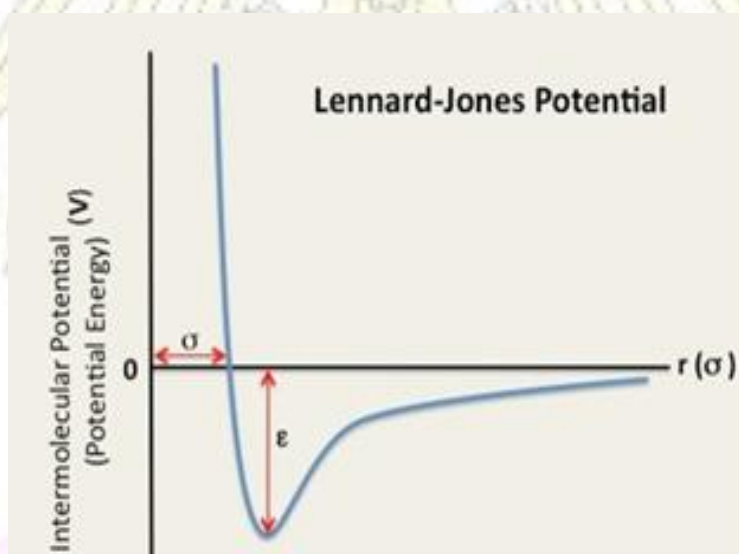
2.1.4. พลังงานศักย์ของอันตรกิริยาที่ไม่เกิดพันธะ (Potential energy of on-bonded interactions)

แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1.) อันตรกิริยาแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals interaction) เป็นแรงดึงดูดแบบอ่อนๆระหว่างอะตอม ฟังก์ชันพลังงานศักย์ที่ใช้อยู่ในรูปฟังก์ชันของพลังงานเลนนาร์ด-โจนส์ (Lennard-Jones function) (สมการที่ 7) ซึ่งประกอบด้วยแรงผลัก (repulsive force แสดงในเทอม $1/r^{12}$) และแรงดึงดูด (attractive force ของเทอม $1/r^6$) ระหว่างอะตอม i และ j

$$U_{vdW} = \sum_{i < j}^{atoms} 4\epsilon \left(\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right) \quad [7]$$

โดยมีพารามิเตอร์ คือ ϵ เรียกว่า well-depth ซึ่งเป็นค่าพลังงานที่มีค่าแรงกระทำมากที่สุด, r_{ij} ระยะทางระหว่างสองอะตอม i^{th} และอะตอม j^{th} และ σ เป็นระยะห่างระหว่างอะตอมที่มีค่าพลังงานศักย์เท่ากับศูนย์ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 : รูปภาพแสดงกราฟแสดงค่าพลังงานแวนเดอร์วาลส์จากการคำนวณด้วยพลังงานศักย์ Lennard-Jones และพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณ (ที่มา: Davis ChemWiki by University of California, 2012)

2.) แรงแระหว่างประจุ (Electrostatic interaction) เป็นแรงแระหว่างประจุสุทธิของอะตอม ฟังก์ชันพลังงานศักย์ของแรงแระหว่างประจุคำนวณโดยอาศัยกฎคูลอมบ์ ดังแสดงในสมการที่ 8 เมื่อ q_i และ q_j คือค่าประจุสุทธิของอะตอมนั้นๆ (net atomic charge) และ ϵ คือ ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant)

$$U_{ele} = \frac{1}{4\pi\epsilon} \sum_{i<j}^{atoms} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad [8]$$

2.2 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (Molecular dynamics simulation)

2.2.1 ความหมาย

การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเป็นเทคนิคการจำลองทางเคมีคอมพิวเตอร์ใช้เพื่ออธิบายถึงพฤติกรรมและสมบัติพลวัตของโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่ในระบบ วิธีการจำลองพลวัตของโมเลกุลอาศัยการแก้สมการกฎข้อที่ 2 ของนิวตัน การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาสมบัติเชิงโครงสร้าง สมบัติพลวัต และสมบัติอุณหพลศาสตร์ (Thermodynamics) ของโปรตีน ใช้กันอย่างแพร่หลายในการคำนวณคุณสมบัติของระบบเกี่ยวกับการเคลื่อนที่และอุณหพลศาสตร์ เพื่ออธิบายและทำนายกระบวนการสำคัญทางชีวเคมีในธรรมชาติ เช่น การม้วนพับของโปรตีน การเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ เสถียรภาพของโปรตีนในสารละลาย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่สัมพันธ์กับหน้าที่ของโปรตีน การจดจำโมเลกุลของโปรตีน เป็นต้น

2.2.2 กฎของนิวตัน

เมื่อการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลถูกใช้สำหรับศึกษาพฤติกรรมเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่ขึ้นกับเวลาตามกฎข้อที่สองของนิวตัน และอันตรปฏิกิริยาระหว่างอะตอมภายในโมเลกุลที่ถูกสมมุติขึ้นจากการใช้ สนามแรง (force field) จะอาศัยสมการการเคลื่อนที่ดังสมการที่ 9

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a} = m_i \frac{d\vec{v}}{dt} = m_i \frac{d^2 \vec{r}}{dt^2} \quad [9]$$

เมื่อ $F_i^{\vec{}}$ คือ แรงของอะตอมที่กระทำต่อเวลา (N)

m_i คือ มวลของอะตอม

\vec{v} คือ ความเร็วของอะตอม

\vec{a} คือ ความเร่งของอะตอม

\vec{r} คือ ตำแหน่งของอะตอม

โดยแรง \vec{F}_i สามารถเขียนในรูปของ gradient of the potential energy ได้เป็น

$$\vec{F}_i = -\nabla V_i(\vec{R}) = \frac{dV}{d\vec{r}_i} \quad [10]$$

เมื่อ $V_i(\vec{R})$ คือ พลังงานศักย์ของระบบ

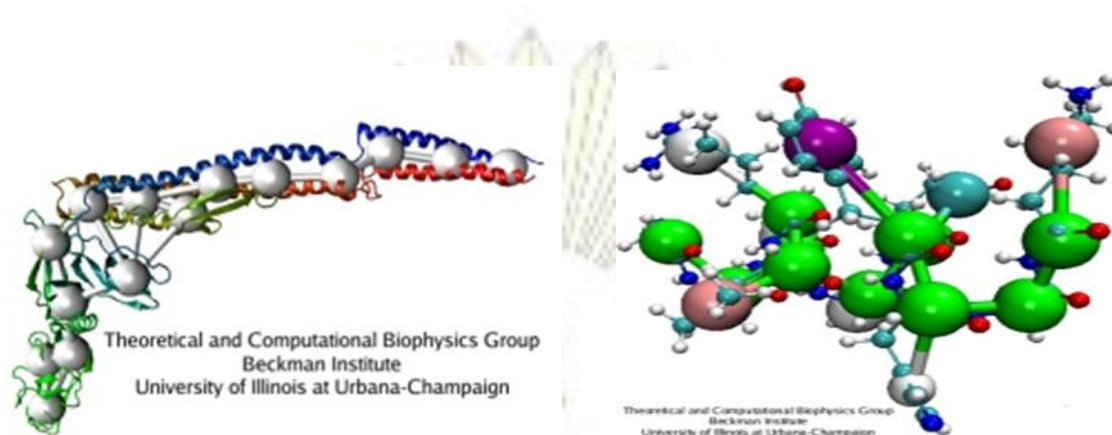
นำสมการ [9] มารวมกับสมการ [10] ได้

$$-\frac{dV}{d\vec{r}_i} = m_i \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} \quad [11]$$

ดังนั้น ศักย์ของการเปลี่ยนตำแหน่งของอะตอมเกี่ยวข้องกับสมการการเคลื่อนที่ของนิวตันตามหน่วยเวลา

2.3 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรน (coarse-grained molecular dynamics simulation)

ในบางครั้ง เราไม่สามารถดำเนินการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบทุกอะตอม (all-atom molecular dynamics simulation) กับระบบที่ใหญ่มากๆ และมีจำนวนอะตอมหลายแสนหรือหลายล้านอะตอม เพราะจำเป็นต้องใช้คอมพิวเตอร์สมรรถนะสูงที่ใช้ทรัพยากรต่างๆ จำนวนมากและมีราคาแพง เช่น หน่วยประมวลผลกลางแบบขนาน หน่วยประมวลผลกราฟิก หน่วยความจำ ความเร็วในการรับส่งข้อมูลผ่านเครือข่าย นอกจากนี้ใช้เวลาคำนวณที่ยาวนาน ทำให้เป็นข้อจำกัดในการศึกษา เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนเป็นเทคนิคการจำลองโมเลกุลความละเอียดต่ำ จะช่วยลดความต้องการการใช้ทรัพยากรต่างๆ เหล่านี้ลงอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือ แบบจำลองโมเลกุลแบบคอร์สเกรนเป็นการจัดกลุ่มของอะตอมหลายๆอะตอมรวมเป็นวัตถุ 1 ชิ้นคล้ายเม็ดลูกปัด เรียกว่า บีด (bead) เช่น 1 กรดอะมิโน มีจำนวนประมาณ 15-50 อะตอม ซึ่งเมื่อแปรเป็นการจำลองแบบคอสเกรนจะประกอบด้วย 2-5 บีด หรือน้ำ 4 โมเลกุลแทนด้วย บีด 1 บีด เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของโมเดลที่ใช้ แบบจำลองคอร์สเกรนจะลดจำนวน degree of freedom ของระบบได้มากทำให้ลดเวลาในการคำนวณลง แบบจำลองคอร์สเกรนเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายในการทำแบบจำลองเชิงโมเลกุลด้านชีวโมเลกุล ซึ่งการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนถูกประยุกต์ใช้ในการทำนายโครงสร้างโปรตีน, การทำนายอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน โดยงานวิจัยนี้อาศัย Martini force fields เพื่อระบุคุณสมบัติสำหรับการคำนวณพลังงานของระบบ



รูปที่ 2.2 : ภาพแสดงคอสมอนโมเดลเป็นการจัดกลุ่มอะตอมหรือที่เรียกว่า บีต (bead)

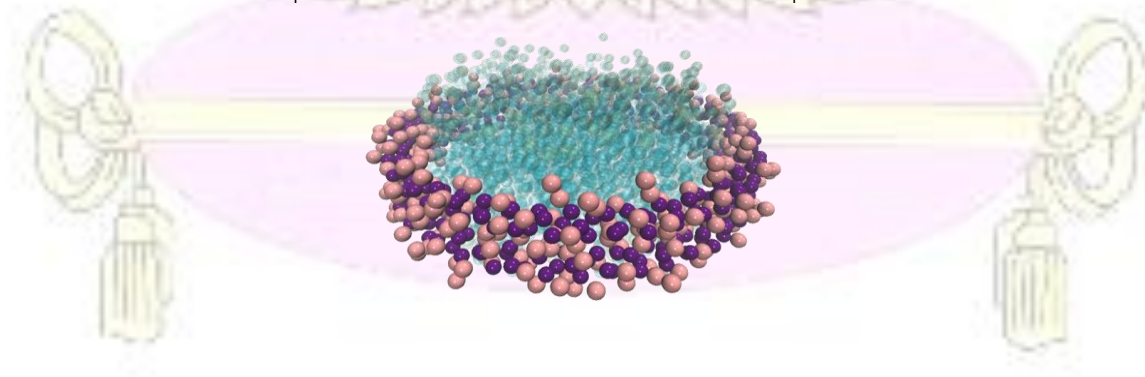
2.4 โปรแกรมสำหรับการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

2.4.1 โปรแกรม NAMD

โปรแกรม NAMD เป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบทุกอะตอมและแบบคอสมอน NAMD ถูกออกแบบมาเพื่อการจำลองที่มีประสิทธิภาพของระบบเชิงชีวโมเลกุลขนาดใหญ่

2.4.2 โปรแกรม VMD

โปรแกรม VMD เป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์กราฟิกที่ใช้สำหรับแสดงภาพแบบจำลองโมเลกุลสามมิติ ใช้สร้างภาพโมเลกุลเสมือน (molecular visualization) ใช้เตรียมอินพุทหรือค่าตัวแปรต่างๆเพื่อป้อนให้กับซิมูเลชัน และใช้วิเคราะห์ทราเจกทอรี (analysis of MD trajectory) ซึ่งเป็นข้อมูลที่บันทึกไว้ในระหว่างซิมูเลชัน เนื่องจากโปรแกรม VMD สามารถอ่านไฟล์โครงสร้างในรูปแบบ Protein Data Bank (PDB) และแสดงผลโครงสร้างหลังจากการคำนวณสิ้นสุด ทั้งนี้โปรแกรม VMD มีวิธีการที่หลากหลายสำหรับการแสดงผลการเปลี่ยนแปลงสี จุด เส้น รูปทรง ลักษณะสัญญาณต่างๆ เช่น CPK, licorice, ribbons, cartoon เป็นต้น เพื่อเพิ่มความเข้าใจ และโมดูลอื่นๆที่ VMD สามารถใช้สังเกตการเคลื่อนไหวและวิเคราะห์ผลการคำนวณของการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลได้ รวมทั้งแสดงผลการเคลื่อนไหวของโมเลกุลที่กำลังจำลองบนคอมพิวเตอร์



รูปที่ 2.3 : รูปภาพแสดงการสร้างภาพแบบจำลองโมเลกุลนาโนติสก์แบบคอร์สเกรนดด้วยโปรแกรม VMD

2.5 การวิเคราะห์ผลการคำนวณ

ในระหว่างซิมูเลชันจะมีการบันทึกข้อมูลโครงสร้าง ได้แก่ พิกัด (x,y,z) ของอะตอมต่างๆ ในระบบ โดยจะบันทึกทุกๆ ช่วงเวลาหนึ่งๆ ตามที่กำหนดไว้ เมื่อจบสิ้นการคำนวณ ข้อมูลทั้งหมดที่ถูกบันทึกนี้เรียกว่า ทราเจคทอรี (trajectory) โดยทั่วไปการวิเคราะห์ผลการคำนวณคือการนำข้อมูลทราเจคทอรีไปทำการประมวลผลหาค่าต่างๆ ต่อไป

2.5.1 ค่ารากที่สองของความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยกำลังสอง Root-mean-square deviation (RMSD)

RMSD เป็นค่าที่บอกระดับความแตกต่างระหว่างโครงสร้างที่ได้ระหว่างซิมูเลชันเทียบกับโครงสร้างอ้างอิง เป็นเกณฑ์หนึ่งที่ใช้ประเมินคุณภาพและการดำเนินไปของซิมูเลชัน การคำนวณหา RMSD ของซิมูเลชัน ทำได้โดยมีสมการดังต่อไปนี้

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2} \quad [13]$$

โดยที่ δ_i เป็นระยะห่างหรือความแตกต่างของตำแหน่งของ บิต i ในข้อมูลทราเจคทอรีเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้นซึ่งใช้เป็นโครงสร้างอ้างอิง

ค่า RMSD จะแสดงเป็นหน่วยความยาว คือ Angström (Å) ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 10^{-10} เมตร

2.5.2 ค่าการคลายและหดตัวของโปรตีน : รัศมีไจเรชันของนาโนติสก์ (Radius of gyration, R_g)

เป็นค่าที่บอกการคงสภาพรูปร่างหรือการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันของโครงสร้างสารในช่วงระยะเวลาของการซิมูเลชัน โดยรัศมีไจเรชัน (r_{gyr}) วัดได้จากค่าเฉลี่ยของผลต่างกำลังสองของระยะห่างของอะตอมต่างๆ กับระยะห่างของศูนย์กลางมวล (center of mass) ดังสมการ

$$r_{gyr} = \frac{\sum_{i=1}^n m_i (r_i - r_{cms})^2}{\sum_{i=1}^n m_i} \quad [14]$$

โดยที่ r_i คือ ตำแหน่งของอะตอม i^{th} r_{cms} คือ ตำแหน่งของศูนย์กลางมวล m_i คือ มวลของอะตอม i^{th}

2.5.3 พื้นที่ผิวสัมผัสทำละลาย (Solvent accessible surface area)

พื้นที่ผิวสัมผัสตัวทำละลายของนาโนติสก์เป็นสมบัติทางกายภาพที่เป็นตัวแปรสำคัญชนิดหนึ่งในการศึกษาโปรตีนในนาโนติสก์ ซึ่งฟอสฟอลิพิดไบเลเยอร์ในนาโนติสก์มีด้านสัมผัสกับตัวทำละลาย (solvent accessible side) อยู่สองด้าน ได้แก่ ชั้นด้านบน (upper leaflet) และชั้นด้านล่าง (lower leaflet) ชั้นด้านบนเปรียบเสมือนด้านสัมผัสนอกเซลล์ (extracellular side) ส่วนชั้นด้านล่างเปรียบเสมือนด้านสัมผัสในเซลล์ (intracellular side) นั่นเอง โดยสามารถหาค่าพื้นที่ผิวสัมผัสทำละลายได้จากสมการแสดงความสัมพันธ์ของไขมันและโปรตีนได้ดังนี้

$$N_L S = (0.423 M - 9.75) ^2$$

โดยที่ N_L คือ จำนวนของไขมันในนาโนติสก์

M คือ จำนวนกรดอะมิโนในสคัฟโพลด์โปรตีน

และ S คือ พื้นที่ผิวสัมผัสทำละลาย (Solvent accessible surface area) หน่วย \AA^2

บทที่ 3

ขั้นตอนการศึกษา

3.1. วัสดุอุปกรณ์

3.1.1. Hardware

- คอมพิวเตอร์ส่วนตัว
- External disk
- คอมพิวเตอร์แม่ข่าย (Server) โดยใช้คอมพิวเตอร์ของ Center of Excellent in Computational Chemistry (CECC) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

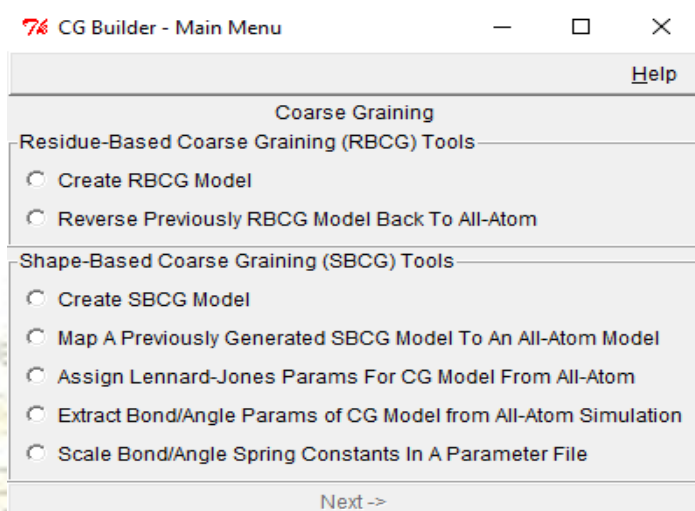
3.1.2. Software

- MobaXterm
- NAMD
- VMD 1.9.3
- Microsoft Excel
- OriginPro 8.5

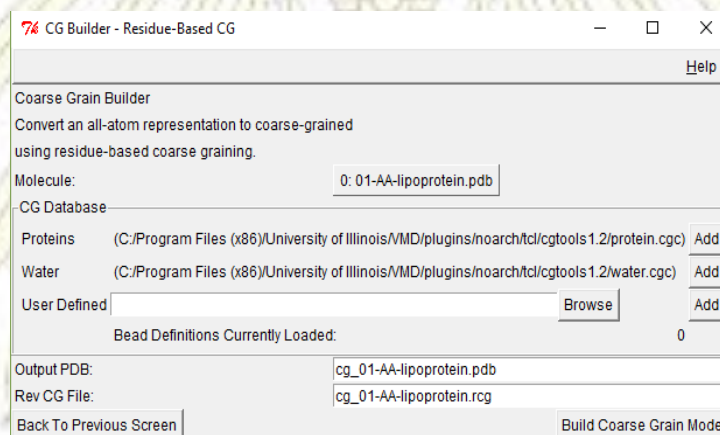
3.2. วิธีการทดลอง

3.2.1. การเตรียมแบบจำลองโครงสร้างของไลโปโปรตีนนาโนดิสก์โดยใช้โปรแกรม VMD 1.9.3

1. เข้าโปรแกรม VMD แล้วโหลดไฟล์โครงสร้างนาโนดิสก์ จาก Protein Data Bank ซึ่งเป็นแบบจำลองทุกอะตอม (all-atom model) (File → Browse → Load)
2. แปลงให้อยู่ในรูปแบบจำลองคอร์สแกรนด์ก่อนการแก้ไข โดยการแปลงแบบจำลองทุกอะตอมของนาโนดิสก์ให้เป็นบีต โดยการเปิดเมนู CG Builder ในโปรแกรม VMD (Extensions → Modeling → CG Builder) และ เลือกกดคำว่า “Create RBCG Model” ตามด้วยกด Next



รูปที่ 3.1 : รูปภาพแสดงการแปลงแบบจำลองทุกระดับของนาโนตีกให้เป็นบิต ในโปรแกรม VMD
หลังจากกด Next ก็จะไปสู่ หน้าต่าง CG Builder



รูปที่ 3.2 : รูปภาพแสดงเมนู CG Builder ในโปรแกรม VMD

หลังจากนั้น กด Build Coarse Grain Model โดยจะได้ไฟล์เอาท์พุท (output) ออกมาสำหรับ PDB/RCG ไฟล์ คือ AA-protein-mempatch.pdb และ AA-protein-mempatch.rcg ซึ่งถูกเปลี่ยนชื่อเป็น Cg-protein-mempatch.pdb และ Cg-protein-mempatch.rcg

3. สร้างไฟล์ PSF ใช้ไฟล์ชุดคำสั่งว่า 02a-make-initial-CG-psf.tcl ซึ่งมีไฟล์ Cg-protein-mempatch.pdb เป็นข้อมูลอินพุท (input) เข้าไปเพื่อให้ได้ Cg-protein-mempatch-init.psf เป็นข้อมูลเอาท์พุทออกมา ประมวลผลไฟล์ชุดคำสั่งนี้โดยการป้อนคำสั่ง `vmd -dispdev text -e 02a-make-initial-CG-psf.tcl`

4. แก้ไขไฟล์ PSF โดยใช้ ไฟล์ชุดคำสั่งชื่อ fix_martini_psf.tcl ซึ่งมีไฟล์ AA-lipoprotein.pdb และ AA-lipoprotein.psf เป็นข้อมูลอินพุท เพื่อให้ได้ cg-protein-mempatch-fixed.psf และ cg-protein-mempatch-fixed.pdb เป็นข้อมูลเอาต์พุทออกมา ประมวลผลไฟล์ชุดคำสั่งนี้โดยการป้อนคำสั่ง vmd -dispdev text -e 02b-correct-CG-psf.tcl

5. เติมน้ำของตัวทำละลาย (น้ำ) ล้อมรอบโปรตีน และปิดของไขมัน โดยใช้ไฟล์ชุดคำสั่งชื่อ 03a-solvate.tcl ซึ่งใช้ไฟล์ cg-protein-mempatch-fixed.psf และ cg-protein-mempatch-fixed.pdb เป็นข้อมูลอินพุทเพื่อให้ได้ solvated.psf และ solvated.pdb เป็นข้อมูลเอาต์พุทออกมา ประมวลผลไฟล์ชุดคำสั่งนี้โดยการป้อนคำสั่ง vmd -dispdev text -e 03a-solvate.tcl

6. ลบปิดของตัวทำละลายที่ซ้อนทับตำแหน่งกัน (การเติมน้ำทำให้เกิดการซ้อนทับตำแหน่งปิดของโปรตีน และของไขมัน) โดยใช้ไฟล์ชุดคำสั่งชื่อ 03b-remove-waters.tcl ซึ่งใช้ไฟล์ solvated.psf และ solvated.pdb เป็นข้อมูลอินพุทเข้าไป เพื่อให้ได้ solvated2.psf และ solvated2.pdb เป็นข้อมูลเอาต์พุทออกมา ประมวลผลไฟล์ชุดคำสั่งนี้โดยการป้อนคำสั่ง vmd -dispdev text -e 03b-remove-waters.tcl

7. เติมน้ำของไอออนต่างๆเพื่อให้ประจุรวมของระบบเป็นกลาง โดยใช้ไฟล์ชุดคำสั่งชื่อ 04-ionize.tcl ซึ่งใช้ไฟล์ solvated2.psf และ solvated2.pdb เป็นข้อมูลอินพุทเข้าไป เพื่อให้ได้ไฟล์ ionized.pdb และ ionized.psf เป็นข้อมูลเอาต์พุทออกมา ประมวลผลไฟล์ชุดคำสั่งนี้โดยการป้อนคำสั่ง vmd -dispdev text -e 04-ionize.tcl

โดยไฟล์ที่ได้ออกมา ionized.pdb และ ionized.psf จะเป็นไฟล์แบบจำลองคอสมอสเทรตของนาโนติสก์ที่สภาวะเริ่มต้นสำหรับรันคอนเกรนตโมเลกูลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน ในลำดับถัดไป

3.2.2. การรันคอนเกรนตโมเลกูลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน ด้วย โปรแกรม NAMD

เตรียมไฟล์อินพุท เพื่อจัดตั้งค่าและกำหนดตัวแปรต่างๆ ที่ใช้ในโมเลกูลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน จำนวนอนุภาคปิดที่ใช้ในการจำลองนี้เท่ากับ 26,000 ปิด ซึ่งประมาณได้เท่ากับ 620,000 อะตอม การศึกษาเลือกทำการจำลองพลวัตของนาโนติสก์ไว้ที่ 3 อุณหภูมิ คือ 200 เคลวิน, 300 เคลวิน และ 400 เคลวิน ภายใต้อุณหภูมิ 1 บรรยากาศ กำหนดค่า Time-step ไว้ที่ 20 femtosecond จำลองโดยใช้เทคนิค Periodic Boundary Condition ซึ่ง 1 unit cell กำหนดให้มีขนาด $100 \times 100 \times 140 \text{ \AA}$ กำหนดค่า cutoff ของการคำนวณพลังงานศักย์ไว้ที่ 12 \AA พลังงานศักย์ของระบบจะถูกปรับให้มีพลังงานลดลงจนต่ำที่สุด ณ คอนฟิกูเรชันนั้นก่อนที่จะดำเนินการจำลองด้วยเทคนิคโมเลกูลาร์ไดนามิกส์ซิมูเลชัน ซึ่งจำนวนครั้งของการเปลี่ยน

ตำแหน่งหรือเคลื่อนที่ของระบบจะกำหนดไว้ให้มีค่าประมาณอย่างน้อย 50 ล้านครั้งซึ่งเท่ากับจำลองพลวัตของนาโนติสก์เป็นเวลาประมาณ 1 ไมโครวินาที

3.2.3. วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NAMD

นำข้อมูลเอ้าท์พุทที่ได้ออกมาจากการรัน MD มาเป็นไฟล์อินพุทในการวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆทางระบบชีวโมเลกุล ได้แก่

- ค่า RMSD
- ค่า Rg
- ค่า Surface area

โดยไฟล์เอ้าท์พุทที่ได้ออกมาจะเป็นไฟล์ .dat ที่สามารถนำไป plot graph เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป



บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1. องค์ประกอบและแบบจำลองโครงสร้างของนาโนดิสก์

นาโนดิสก์ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยสายอโพลีโพรตีน เอ-วัน จำนวน 2 สาย และกลุ่มของโมเลกุลฟอสโฟลิพิด สำหรับฟอสโฟลิพิดได้เลือกทำการศึกษาสารไขมันฟอสเฟต 2 ชนิด ได้แก่ 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) และ 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) อัตราส่วนระหว่างโปรตีนต่อฟอสโฟลิพิด เท่ากับ 1:160 และ 1:130 ตามลำดับ

สำหรับสายอโพลีโพรตีน เอ-วัน แต่ละสายมีจำนวนกรดอะมิโนรวมทั้งหมด 243 เรสซิดูว์ อย่างไรก็ตามโครงสร้างสามมิติของอโพลีโพรตีน เอ-วัน มีอยู่เพียง 189 เรสซิดูว์ โดยที่ส่วนของโครงสร้างของกรดอะมิโน 54 ลำดับแรกนั้นขาดหายไป ลำดับกรดอะมิโนของอโพลีโพรตีน เอ-วัน P1 และ P2 แสดงได้ดังนี้

>P1-chain

STFSKLRQLGQVPTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFOKKWQEEMEL

YRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRQL

AARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLROGLLPVLESFKVSFLSALE

EYTKKLNTQ

>P2-chain

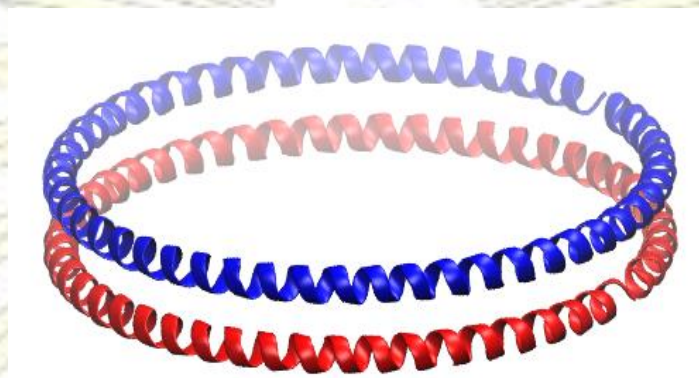
STFSKLRQLGQVPTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFOKKWQEEMEL

YRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRQL

AARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLROGLLPVLESFKVSFLSALE

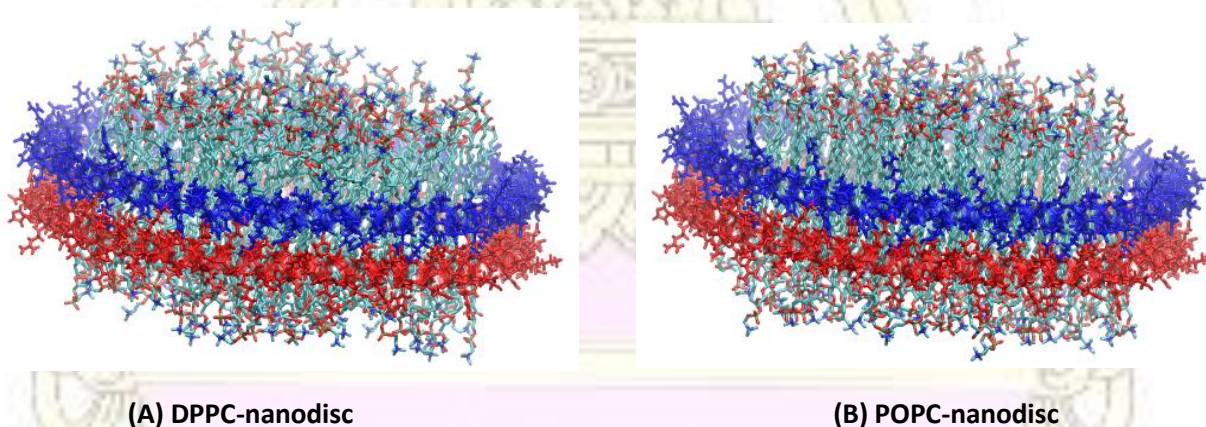
EYTKKLNTQ

โครงสร้างของสายอโพลีโปรตีน เอ-วันทั้ง P1 และ P2 ก่อนนำมาซิมูเลชัน มีโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) แบบเกลียวอัลฟา (α -helix) โดยที่ N-terminal ม้วนเข้าหา C-terminal คล้ายรูปร่างของวงแหวนไม่ปิดวง 2 ชั้นดังรูป



รูปที่ 4.1 : รูปภาพแสดงโครงสร้างของสายอโพลีโปรตีน เอ-วันทั้ง P1 และ P2 ก่อนนำมาซิมูเลชัน

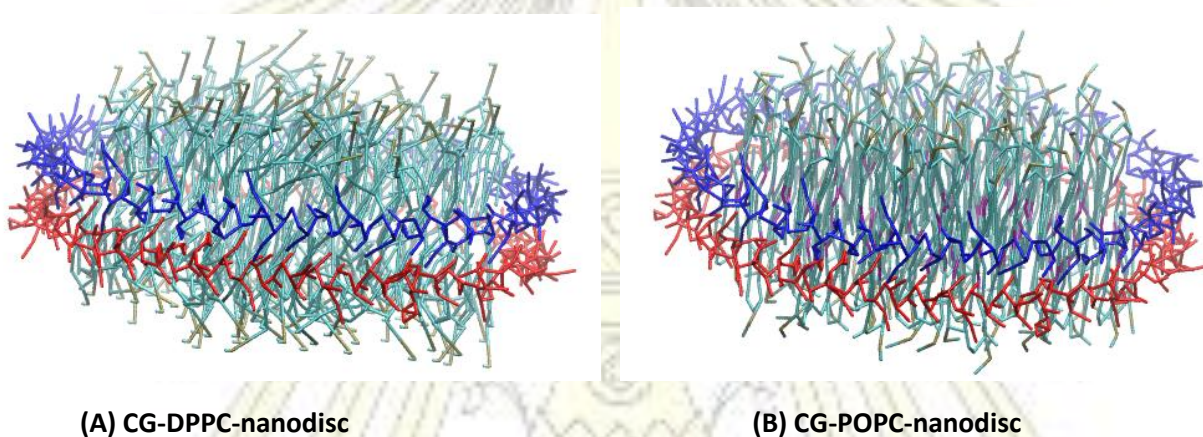
สายอโพลีโปรตีน เอ-วัน ทั้ง P1 และ P2 ห่อล้อมส่วนของไบเลเย์ฟอสโฟลิพิด DPPC และ POPC รูปร่างหรือโครงสร้างของนาโนดิสก์แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปภาพที่ 4.2 : รูปภาพแสดงโครงสร้างของนาโนดิสก์ชนิด (A) และ (B)

4.2. แบบจำลองคอร์สเกรนธ์ของนาโนดิสก์

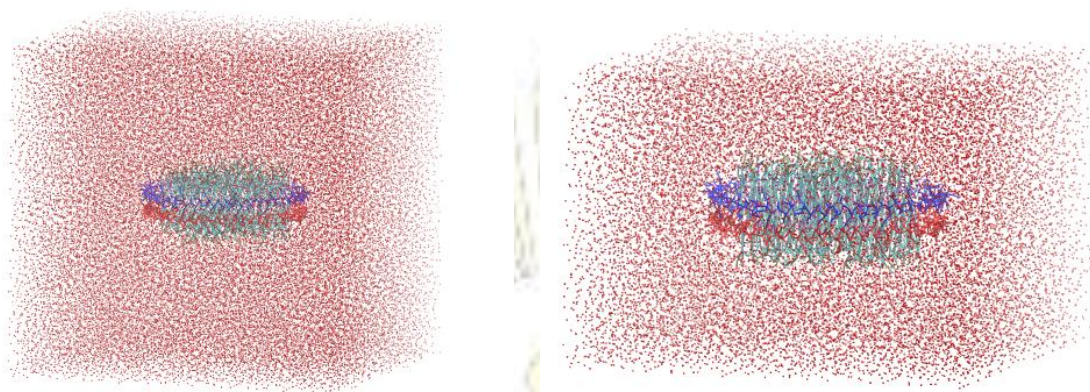
แบบจำลองนาโนดิสก์ชนิด POPC-nanodisc และ DPPC-nanodisc ที่แสดงในรูปที่ 4.2 เป็นแบบจำลองทุกอะตอม (all-atom model) โดยมีจำนวนอะตอมทั้งหมดประมาณ 25,000 และ 27,000 อะตอมตามลำดับ เมื่อแปลงจากแบบจำลองทุกอะตอมให้เป็นแบบจำลองคอร์สเกรนธ์ พบว่าจะมีจำนวนปีตประมาณ 2,600 และ 2,700 ปีต จะเห็นได้ว่าปริมาณของอนุภาคในแบบจำลองคอร์สเกรนธ์ลดลงประมาณ 10 เท่า ซึ่งทำให้ degree of freedom ของการเคลื่อนที่ของระบบในการทำซิมูเลชันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นั่นหมายถึงเวลาที่ใช้ในการคำนวณพลังงานของอันตรกิริยาต่างๆ ในระบบจะลดลงไปด้วย แบบจำลองคอร์สเกรนธ์ของนาโนดิสก์แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปภาพที่ 4.3 : รูปภาพแสดงโครงสร้างแบบจำลองคอร์สเกรนธ์ของนาโนดิสก์ชนิด DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc

4.3. แบบจำลองคอร์สเกรนธ์ของนาโนดิสก์ในสารละลาย : คอนฟิกรูเรชันก่อนเริ่มซิมูเรชัน

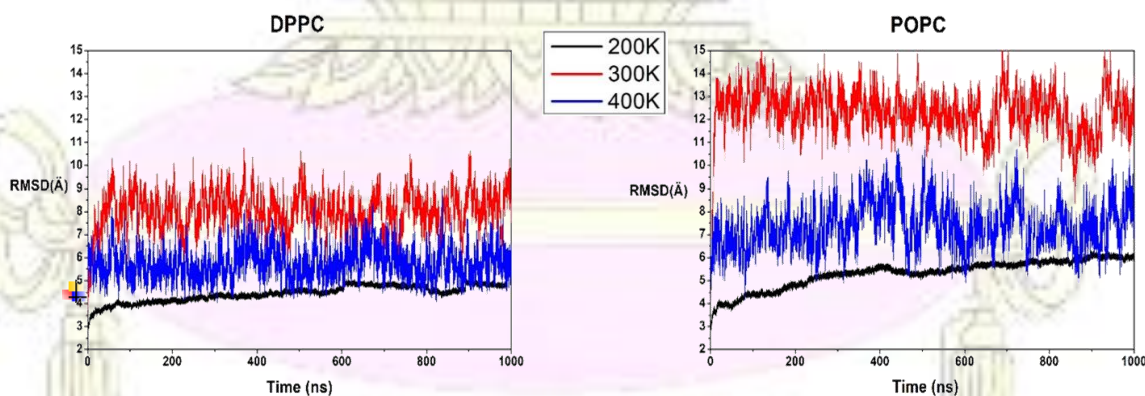
แบบจำลองคอร์สเกรนธ์ของนาโนดิสก์ในสารละลายได้จากการวางปีตซึ่งแทนแบบจำลองคอร์สเกรนธ์ของโมเลกุลน้ำรอบๆ แบบจำลองคอร์สเกรนธ์ของนาโนดิสก์ที่ได้ในข้อ 4.3 ทำให้จำนวนปีตทั้งหมดของระบบ POPC-nanodisc และ DPPC-nanodisc มีประมาณ 26,000 ปีต ซึ่งเทียบได้กับจำนวนอะตอมประมาณ 300,000 อะตอมในแบบจำลองทุกอะตอม จะเห็นได้ชัดเจนว่าการใช้แบบจำลองคอร์สเกรนธ์ลด degree of freedom ของระบบอย่างมีนัยสำคัญ ระบบแบบจำลองคอร์สเกรนธ์ของนาโนดิสก์ในสารละลายมีลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยมมุมฉากที่มีขนาด $100\text{\AA} \times 100\text{\AA} \times 140\text{\AA}$ แสดงดังรูปที่ 4.4



รูปภาพที่ 4.4 : รูปภาพแสดงระบบแบบจำลองคอร์สเกรนด์ของนาโนดิสก์ในสารละลายมีลักษณะเป็นทรงสี่เหลี่ยมมุมฉากที่มีขนาด $100\text{\AA} \times 100\text{\AA} \times 140\text{\AA}$

4.4. สมบัติทางโครงสร้างและพลวัตของนาโนดิสก์

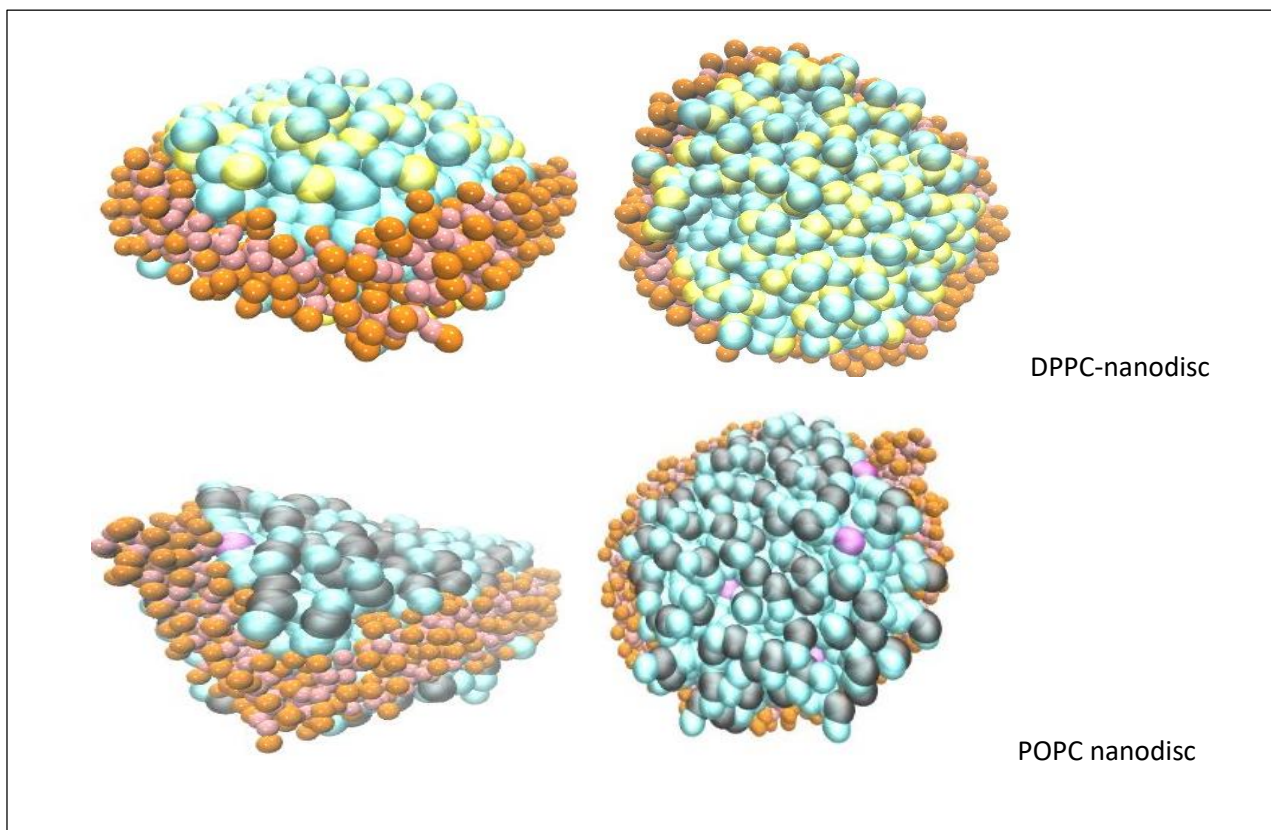
4.4.1. ค่าความเบี่ยงเบนของรากที่สองของค่าเฉลี่ยกำลังสอง (Root-mean-square deviation) หรือ RMSD เป็นดัชนีชี้วัดชนิดหนึ่งในการบอกสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตของโมเลกุลที่ได้จากซิมูเลชัน สำหรับการวิเคราะห์นี้ กราฟ RMSD ตามฟังก์ชันของเวลาแสดงความแตกต่างระหว่างสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตของนาโนดิสก์ในสารละลายระหว่างช่วงเวลา 1 ไมโครวินาทีเมื่อเปรียบเทียบกับนาโนดิสก์ที่คอนฟิกูเรชันก่อนเริ่มซิมูเลชัน (รูปที่ 4.4) จากกราฟรูปภาพที่ 4.5 ที่อุณหภูมิ 200K, 300K และ 400K ค่าเฉลี่ย $\text{RMSD} \pm \text{SD}$ ของระบบ DPPC-nanodisc ในช่วง 200 นาโนวินาทีสุดท้าย มีค่าประมาณ $4.7 \pm 0.2\text{\AA}$, $8.2 \pm 0.8\text{\AA}$ และ $5.8 \pm 0.7\text{\AA}$ ตามลำดับ ในขณะที่ ค่าเฉลี่ย $\text{RMSD} \pm \text{SD}$ ของกราฟ RMSD ของระบบ POPC-nanodisc ในช่วง 200 นาโนวินาทีสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 200K, 300K และ 400K มีค่าประมาณ $6.0 \pm 0.1\text{\AA}$, $12.0 \pm 1.1\text{\AA}$ และ $7.4 \pm 0.9\text{\AA}$ ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ค่า RMSD ของระบบ POPC-nanodisc ในทั้งสามอุณหภูมิ สูงกว่าค่า RMSD ของระบบ DPPC-nanodisc แสดงว่า โครงสร้างของ POPC-nanodisc แตกต่างไปจากโครงสร้างก่อนเริ่มซิมูเลชันมากกว่าโครงสร้างของ DPPC-nanodisc



รูปที่ 4.5 : กราฟแสดงค่า RMSD หน่วยเป็น (Å) ของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc

| T(K) | RMSD \pm SD (Å) | | Rg \pm SD (Å) | | Surface \pm SD (upper) (Å ²) | | Surface \pm SD (lower) (Å ²) | |
|-------|-------------------|----------------|-----------------|----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| | DPPC | POPC | DPPC | POPC | DPPC | POPC | DPPC | POPC |
| 200 K | 4.7 \pm 0.2 | 6.0 \pm 0.1 | 46.1 \pm 0.1 | 45.4 \pm 0.1 | 19500 \pm 100 | 15800 \pm 100 | 19500 \pm 100 | 17300 \pm 200 |
| 300K | 8.2 \pm 0.8 | 12.0 \pm 1.1 | 46.6 \pm 0.5 | 44.8 \pm 0.7 | 20300 \pm 200 | 16700 \pm 200 | 20300 \pm 200 | 18100 \pm 200 |
| 400 K | 5.8 \pm 0.7 | 7.4 \pm 0.9 | 49.2 \pm 0.3 | 48.1 \pm 0.6 | 20600 \pm 200 | 18500 \pm 200 | 20600 \pm 200 | 17500 \pm 100 |

ตารางที่ 1 : ตารางแสดงค่าผลการคำนวณของการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนด



รูปที่ 4.6 : MD snapshot ของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc ที่อุณหภูมิ 300 เคลวิน

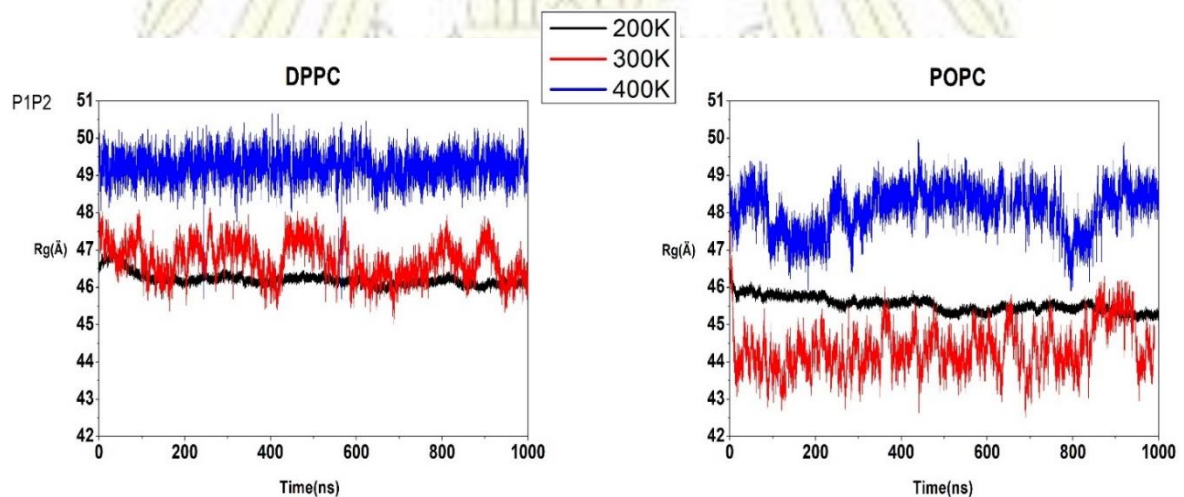
โดยที่ค่า SD ของระบบ POPC-nanodisc ในทั้งสามอุณหภูมิ สูงกว่าค่า SD ของระบบ DPPC-nanodisc แสดงว่า POPC-nanodisc มีขนาด (magnitude) ของพลวัตหรือการขยับไปมาของอะตอม (atomic fluctuation) มากกว่า DPPC-nanodisc ดังนั้น โดยรวมแล้ว POPC-nanodisc มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและความยืดหยุ่นที่มากกว่า DPPC-nanodisc นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาค่า SD ที่อุณหภูมิ 200K ต่ำกว่าค่า SD ที่ 300K และ 400K ซึ่งเหมือนกันทั้งสองระบบ แสดงว่าที่อุณหภูมิ 200K DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc มีความยืดหยุ่นต่ำ ในขณะที่ความยืดหยุ่นของนาโนดิสก์ที่ 300K และ 400K นั้นไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

4.4.2. การคลายและหดตัวของโปรตีน : รัศมีไจเรชันของนาโนดิสก์ (Radius of gyration, R_g)

ในทางฟิสิกส์ของพอลิเมอร์ ค่า R_g สามารถบอกขนาดและรูปทรงของสายพอลิเมอร์ ในขณะที่ ค่า R_g ของโปรตีน สามารถบอกการคงสภาพของโครงสร้างสามมิติ เช่น หากโปรตีนเสียสภาพ (denaturation) ค่า R_g ของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5-2.5 เท่า ดังนั้น เมื่อประยุกต์ ค่า R_g ของนาโนดิสก์ในซิมูเลชันนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อบอกการคงสภาพรูปร่างหรือการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันของนาโนดิสก์ในช่วงระยะเวลา 1 ไมโครวินาทีของการซิมูเลชัน

จากกราฟรูป 4.7 ค่า $R_g \pm SD$ ของสายโพลีโพรพิลีน เอ-วันทั้งสองสาย (P1P2) ของระบบ DPPC-nanodisc ในช่วง 200 นาโนวินาทีสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 200K, 300K และ 400K มีค่าประมาณ $46.1 \pm 0.1 \text{ \AA}$, $46.6 \pm 0.5 \text{ \AA}$ และ $49.2 \pm 0.3 \text{ \AA}$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า คอนฟอร์เมชันของสายโพลีโพรพิลีน เอ-วันตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ กล่าวคือเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น มีผลให้ค่า $R_g \pm SD$ สูงขึ้น คอนฟอร์เมชันของสายโพลีโพรพิลีน เอมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น โดยเฉพาะที่ 400K ค่า $R_g \pm SD$ สูงกว่าที่ 200K และ 300K การเพิ่มขึ้นของค่า R_g อาจเกี่ยวข้องกับการคลายตัวของโปรตีนทำให้โครงสร้างของโปรตีนที่อยู่กันอย่างหลวมๆ แสดงให้เห็นว่าคอนฟอร์เมชันเอนโทรปีของโปรตีนเพิ่มขึ้น

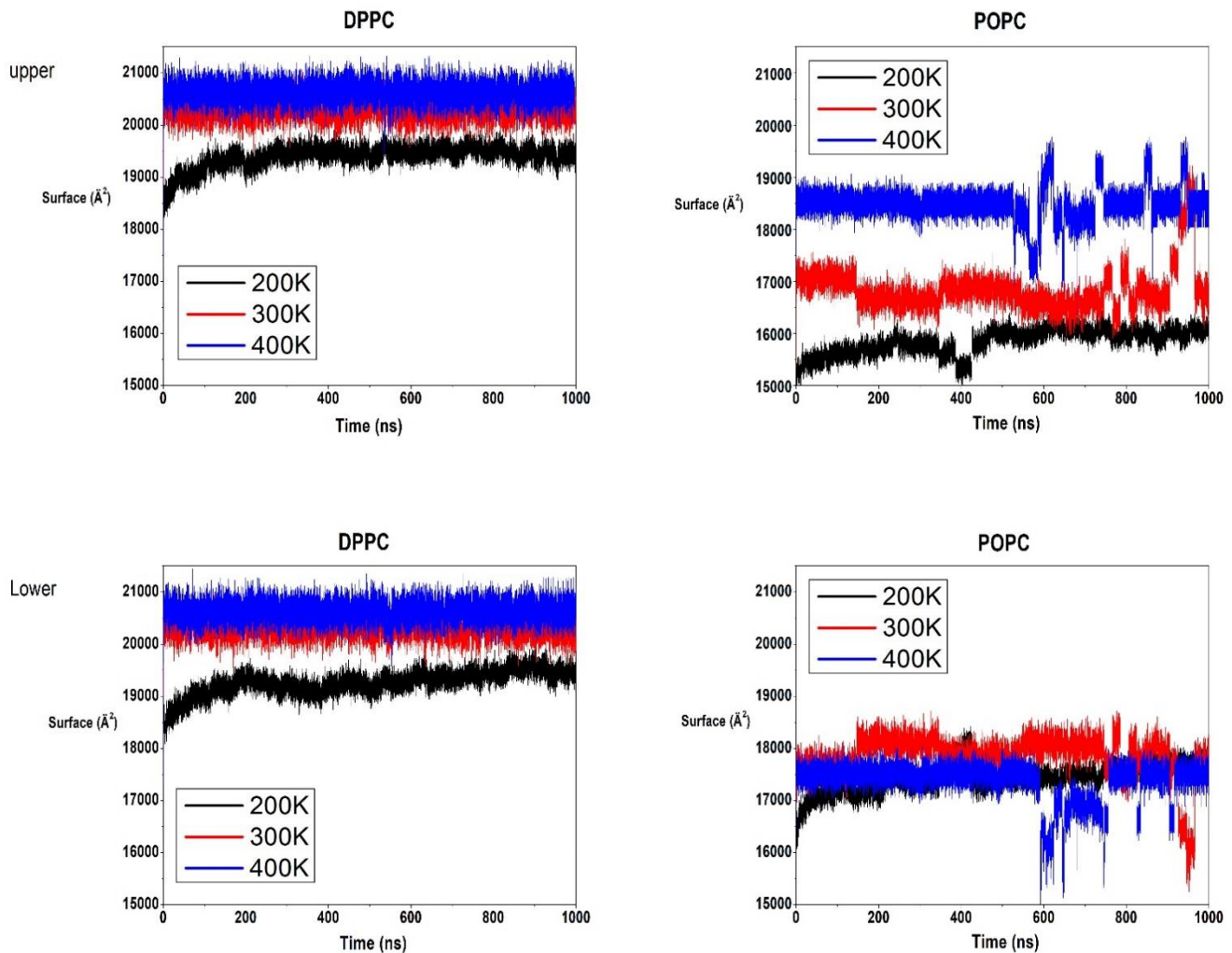
อย่างไรก็ตาม พฤติกรรมของสายโพลีโพรพิลีน เอ-วัน P1 P2 ในระบบ POPC-nanodisc นั้นแตกต่างไปจากระบบ DPPC-nanodisc พบว่า ค่า $R_g \pm SD$ ของสาย P1P2 ของระบบ POPC-nanodisc ในช่วง 200 นาโนวินาทีสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 200K, 300K และ 400K มีค่าประมาณ $45.4 \pm 0.1 \text{ \AA}$, $44.8 \pm 0.7 \text{ \AA}$ และ $48.1 \pm 0.6 \text{ \AA}$ ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่า ที่ 300K ค่า R_g ลดลงเมื่อเทียบกับที่ 200K เป็นไปได้ว่า มีการหดตัวของโปรตีน คอนฟอร์เมชันเอนโทรปีของโปรตีนลดลง และค่า R_g สูงขึ้นที่อุณหภูมิ 400K แสดงว่าเกิดการคลายตัวของโปรตีน เช่นเดียวกับระบบ DPPC-nanodisc คอนฟอร์เมชันเอนโทรปีของโปรตีนเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.7 : กราฟแสดงค่า R_g หน่วยเป็น (Å) ของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc

4.4.3. พื้นที่ผิวสัมผัสทำละลาย (Solvent accessible surface area) ของฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ในนาโนดิสก์

ผลการคำนวณพื้นที่ผิวฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ของนาโนดิสก์ในช่วงระยะเวลา 1 ไมโครวินาทีของการซิมูเลชัน ที่อุณหภูมิ 200K, 300K และ 400K คือ



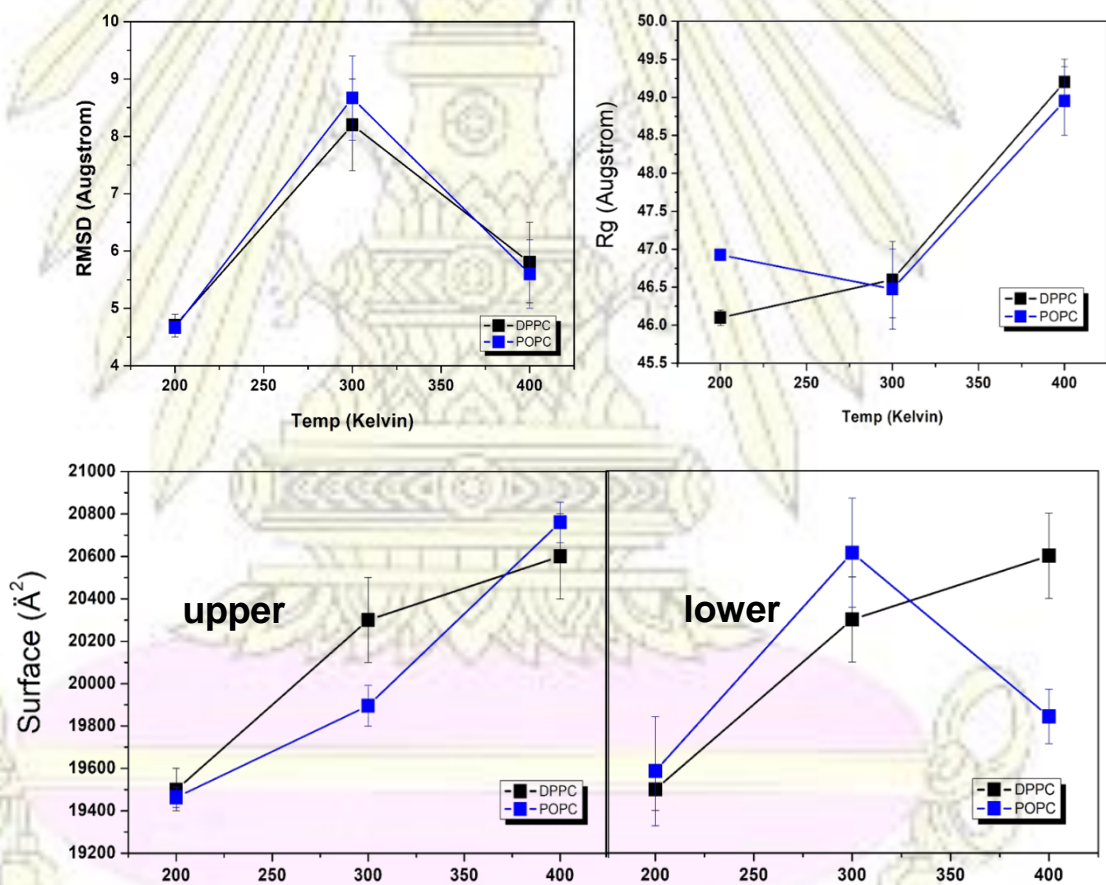
รูปที่ 4.8 : กราฟแสดงค่า Surface area หน่วยเป็น (\AA^2) ของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc บริเวณผิวสัมผัส upper & lower

จากกราฟรูปที่ 4.8 ค่าพื้นที่ผิวฟอสโฟลิพิดไบเลเยอร์ของระบบ DPPC-nanodisc ($\text{Surface} \pm \text{SD}$) ในช่วง 200 นาโนวินาทีสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 200K, 300K และ 400K สำหรับ upper leaflet มีค่าประมาณ $19500 \pm 100 \text{\AA}^2$, $20300 \pm 200 \text{\AA}^2$ และ $20600 \pm 200 \text{\AA}^2$ ตามลำดับ และสำหรับ lower leaflet มีค่าประมาณ

19500 \pm 100 \AA^2 , 20300 \pm 200 \AA^2 และ 20600 \pm 200 \AA^2 ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น พื้นที่ผิวสัมผัสฟอสฟอลิพิดไบเลเยอร์ทั้งสองด้านเพิ่มขึ้น

ส่วนในกรณีค่าพื้นที่ผิวฟอสฟอลิพิดไบเลเยอร์ของระบบ POPC-nanodisc (ในช่วงคงที่) ที่อุณหภูมิ 200K, 300K และ 400K สำหรับ upper leaflet มีค่าประมาณ 15800 \pm 100 \AA^2 , 16700 \pm 200 \AA^2 และ 18500 \pm 200 \AA^2 ตามลำดับ และสำหรับ lower leaflet มีค่าประมาณ 17300 \pm 200 \AA^2 , 18100 \pm 200 \AA^2 และ 17500 \pm 100 \AA^2 ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น พื้นที่ผิวสัมผัสฟอสฟอลิพิดไบเลเยอร์ด้านหนึ่งเพิ่มขึ้นในขณะที่อีกด้านหนึ่งไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด

อนึ่ง การวิเคราะห์พื้นที่ผิวฟอสฟอลิพิดไบเลเยอร์ของระบบ POPC-nanodisc ต้องทำอย่างระมัดระวัง เนื่องจากกราฟ Surface ของระบบ POPC-nanodisc มีความคลาดเคลื่อน จะเห็นได้จากค่า Surface area ที่เปลี่ยนแปลงกะทันหันหลายช่วงของกราฟ ความคลาดเคลื่อนนี้เกิดจากความผิดพลาดทางเทคนิคที่ยังไม่หาวิธีแก้ไขไม่ได้



รูปที่ 4.9 : กราฟแสดงค่า Standard deviation ในแต่ละอุณหภูมิของ RMSD (บนซ้าย), Radius of gyration (Rg)(บนขวา), Surface area.(ล่าง)

จากกราฟรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่า ค่า Standard deviation ในแต่ละอุณหภูมิของ RMSD มีลักษณะที่สอดคล้องไปในทางเดียวกัน เนื่องจากเมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่า RMSD ของนาโนดิสก์ทั้งสองระบบก็เพิ่มขึ้น และหากค่า RMSD ลดลง ค่า RMSD ของนาโนดิสก์ทั้งสองระบบก็ลดลงด้วย ซึ่งเรียกลักษณะค่า Standard deviation แบบนี้ว่า monotone และจากกราฟ Rg เมื่อพิจารณาค่า Standard deviation ในแต่ละอุณหภูมินั้นจะเห็นว่า มีลักษณะที่ไม่สอดคล้องกันในบางช่วงอุณหภูมินั้นก็คือช่วง อุณหภูมิ 200 K – 300 K เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ค่า RMSD ของนาโนดิสก์ระบบ DPPC เพิ่มขึ้น แต่ระบบ POPC ลดลง ซึ่งเรียกลักษณะค่า Standard deviation แบบนี้ว่า non-monotone

และจากผลการวิเคราะห์ RMSD, Rg และ Surface ตามที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อโครงสร้าง พลวัต ความยืดหยุ่น การหดและคลายตัวของสายอโพลีโพรตีน เอ-วันทั้งสองสาย พบว่าซิมูเลชันที่อุณหภูมิสูงโครงสร้างของ POPC-nanodisc มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างมากกว่า DPPC-nanodisc เช่นเดียวกัน ขนาดของพลวัตของ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับผลของซิมูเลชันที่อุณหภูมิสูงขึ้น และดูเหมือนว่าการเปลี่ยนแปลงทางพลวัตของ POPC-nanodisc นั้นไวต่ออุณหภูมิมากกว่า DPPC-nanodisc ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการคลายตัวของสายอโพลีโพรตีน เอ-วัน ที่อุณหภูมิสูงทำให้การจัดเรียงโมเลกุลโพรตีนและฟอสโฟลิพิดใน POPC-nanodisc อยู่กันอย่างหลวมๆ ในขณะที่ DPPC-nanodisc แม้ว่าจะมีการคลายตัวของสายอโพลีโพรตีน เอ-วัน แต่ระดับของการคลายตัวนั้นน้อยกว่า โมเลกุลโพรตีนและฟอสโฟลิพิดอยู่กันอย่างอัดแน่นมากกว่า

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้จำลองโครงสร้างของนาโนดิสก์ในสารละลายด้วยเทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลแบบคอร์สเกรนด์ แบบจำลองที่ใช้เป็นนาโนดิสก์สองชนิดคือ DPPC-nanodisc และ POPC-nanodisc โดยมีอุณหภูมิเป็นตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของนาโนดิสก์ในสารละลายดำเนินที่ 3 อุณหภูมิ คือ 200 300 และ 400 เคลวิน เป็นระยะเวลา 1 ไมโครวินาที ทั้งนี้เพื่อการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรและการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างของนาโนดิสก์ การวิเคราะห์ผลการจำลองคำนวณใช้วิธีการคำนวณ ความเบี่ยงเบนของรากที่สองของค่าเฉลี่ยของผลต่างกำลังสอง รัศมีไจเรชันและพื้นที่ผิวสัมผัสทำละลาย ผลการวิเคราะห์พบว่าอุณหภูมิมิผลต่อสภาพทางโครงสร้างและพลวัตของนาโนดิสก์ทั้งสองชนิด นาโนดิสก์มีความความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ ทั้งนี้ การเพิ่มอุณหภูมิกระตุ้นอะตอมต่างๆให้เคลื่อนที่มากและเร็วขึ้น ช่วยลดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับฟอสโฟลิพิดในนาโนดิสก์อ่อนลง ส่งผลให้เกิดการคลายตัวของสายอโพลีโปรตีน เอ-วัน ดังนั้น การจัดเรียงโมเลกุลโปรตีนและฟอสโฟลิพิดในนาโนดิสก์จึงอยู่กันอย่างหลวมๆ ที่อุณหภูมิสูง ความเสถียรของโครงสร้างจึงลดลง เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่าง DPPC-nanodisc กับ POPC-nanodisc พบว่าผลกระทบจากการเพิ่มอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของระบบ DPPC-nanodisc ไม่รุนแรงเท่ากับระบบ POPC-nanodisc โดยพบว่า DPPC-nanodisc มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างที่มีทิศทางเดียวกับการเพิ่มอุณหภูมิ ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของ POPC-nanodisc ไม่มีทิศทางที่แน่นอน และดูเหมือนว่า POPC-nanodisc มีความเสถียรทางโครงสร้างน้อยกว่า DPPC-nanodisc

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป ประการแรก คือการใช้ชนิดของฟอสฟอริตเพียงสองชนิดมาเปรียบเทียบกันเพื่อวิเคราะห์ผลต่อรูปร่างและความเสถียรของนาโนดิสก์ ดังนั้นหาก ใช้ชนิดของฟอสฟอริตชนิดอื่นให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้เข้ามาเปรียบเทียบเพื่อให้ชนิดของฟอสฟอริตที่เหมาะสมที่สุด เพื่อใช้พัฒนาไลโปโปรตีนนาโนดิสก์ให้มีประสิทธิภาพการทำงานที่ดีกับเมมเบรนโปรตีนต่อไป และประการที่สอง คือการนำไลโปโปรตีนนาโนดิสก์ไปใช้ประโยชน์กับงานวิจัยอื่น ที่ไม่ใช่การศึกษาโครงสร้างของเมมเบรนโปรตีนที่สภาวะละลายน้ำ เพื่อใช้ประโยชน์ให้มากที่สุดจากนาโนดิสก์



เอกสารอ้างอิง

1. Marcella, O.R.; Thomas, A.; Dirk, L. The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins. *Current Protocols in Protein Science*. (2016), 84, pp.4.8.1-4.8.35
2. Stephen, H.W. The progress of membrane protein structure determination. *Protein Science*. (2004), 13, pp.1948-1949
3. Bayburt, T.H.; Sligar, S.G. Single-Molecule Height Measurements on Microsomal Cytochrome P450 in Nanometer-Scale Phospholipid Bilayer Disks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002), 99, pp.6725-6730
4. Mary, A.S.; Ilia, G.D.; Stephen, G.S. Nanodiscs as a new tool to examine lipid-protein interactions. *Author manuscript*. (2013), 974, pp.415-433
5. Bayburt, T.H.; Grinkova, Y.V.; Sligar, S.G. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett.* (2002), 2, pp.853-856
6. Denisov, I. G.; Grinkova, Y. V.; Lazarides, A.A.; Sligar, S. G. Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size. *J. Am. Chem. Soc.* (2004), 126, pp.3477-3487
7. Ajees, A.A.; Anantharamaiah, G.M.; Mishra, V.K.; Hussain, M.M.; Murthy, H.M.K. Crystal Structure of Human Apolipoprotein A-1: Insights into Its Protective Effect against Cardiovascular Diseases. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006), 103, pp.2126-2131

8. Borhani, D.W.; Rogers, D.P.; Engler, J.A.; Brouillette, C.G. Crystal Structure of Truncated Human Apolipoprotein A-1 Suggests a Lipid-Bound Conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1997), 94, pp.12291–12296
9. Mei, X.; Atkinson, D. Crystal Structure of C-Terminal Truncated Apolipoprotein A-1 Reveals the Assembly of High Density Lipoprotein (HDL) by Dimerization. *J. Biol. Chem.* (2011), 286, pp.38570–38582
10. Bayburt, T.H.; Sligar, S.G. Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Letters.* (2010), 584, pp.1721-1727
11. Siuda, I.; Tieleman, D.P. Molecular Models of Nanodiscs. *JCTC.* (2015), 11, pp.4923-4932
12. Bond, P.J.; Holyoake, J.; Ivetac, A.; Khalid, S.; Sansom, M.S.P. Coarse-grained molecular dynamics simulations of membrane proteins and peptides. *Journal of Structural Biology.* (2007), 157, pp. 593–605
13. Phillips, J.C.; Wriggers, W.; Jonas, A.; Li, Z.; Schulten, K. Structural models of human apolipoprotein A-1: a critical analysis and review. *Biophys J.* (1997), 73(5), pp.2337–2346
14. Amy, Y.S.; Anton, A.; Peter, L.F.; Klaus, S. A coarse grained protein-lipid model with application to lipoprotein particles. *J Phys Chem B.* (2006), 110(8), pp.3674-3684

15. Shih, A.Y.; Freddolino, P.L.; Arkhipov, A.; Schulten, K. Assembly of lipoprotein particles revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations. *Journal of Structural Biology*. (2006), 157(3), pp.579-592
16. Phillips, J.C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R.D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*. (2005), 26(16), pp. 1781-802
17. Mohsen, P.; Richard W.P. Molecular dynamics simulations of lipid nanodiscs. *Biochim Biophys Acta*. (2018), 2736(18), pp. 133



ภาคผนวก

รายละเอียดขั้นตอนการรัน Coarse-grained Simulation ด้วย โปรแกรม NAMD

ขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอนของการเขียนไฟล์ด้วยโปรแกรม NAMD เพื่อจะทำการจำลอง MD และ อภิปรายไฟล์ เอ้าท์พุท และ ผลของการจำลอง MD

1. นำไฟล์ Nanodisc-min.conf มาทำการ minimization ก่อนทุกครั้งที่จะทำการรัน MD โดยขั้นตอน การ minimization นี้เป็นการขยับอะตอมที่อาจจะถูกวางไว้ใกล้กันเกินไปจากขั้นตอนของการใส่ อะตอมไฮโดรเจนหรือโมเลกุลของน้ำออกจากกัน เพราะถ้าหากเริ่มรัน MD โดยที่อะตอมอยู่ใกล้กันเกินไปจะ ส่งผลทำให้อะตอมถูกผลักออกจากกัน ซึ่งเป็นผลทำให้ระบบพังได้ ซึ่งใช้ ionized.pdb และ ionized.psf เป็นไฟล์เริ่มต้น

2. ก่อนทำการ minimize ต้องใส่ค่า Parameters ต่างๆ โดยพิมพ์คำว่า vi Nanodisc-min.conf ซึ่งเป็นโปรแกรมคำสั่งที่เข้าไปยังหน้าต่างของ Nanodisc-min.conf เพื่อทำการแก้ไขค่าต่างๆ และสามารถ เลือก set อุณหภูมิตามที่ต้องการ ซึ่งในการทำงานวิจัยครั้งนี้ ได้เลือกทำการวิเคราะห์การจำลองนาโนดิสก์ที่ อุณหภูมิ 3 อุณหภูมิ คือ 200 เคลวิน, 300 เคลวิน, และ 400 เคลวิน และ เลือก parameters cosAngles พิมพ์ว่า on หลังจากนั้นเลื่อนลงไป #Force-Field Parameters และเลือกใส่ค่าเป็นดังนี้

| | |
|------------------|------|
| exclude | 1-2 |
| 1-4scaling | 1.0 |
| cutoff | 12.0 |
| switching | on |
| martiniSwitching | on |
| PME | off |
| switchdist | 9.0 |
| pairlistdist | 14.0 |
| dielectric | 15.0 |

3. แล้วเลื่อนลงไป #Integrator Parameters เพื่อใส่ค่าลงไป

```
timestep          20.0
nonbondedFreq     1
stepspercycle     10
```

4. ใส่ค่า water Boxize ตามที่เหมาะสมกับขนาดของนาโนดิสก์ โดยสามารถดูค่า Boxize ได้จาก คำสั่ง VMD ใน linux Command คือ vmd -dispdev text -e 03-boxsize.tcl โดยที่ค่าจะออกมาเป็น ค่า Max และ ค่า Min ของแกน X, Y, Z หากต้องการหาค่า Boxize ของแกน ก็ให้นำค่า Max - Min จะได้ค่าออกมา ส่วนค่า cell Origin ก็นำค่ามาใส่ได้เลย โดยใส่ parameter ที่มีชื่อว่า # Periodic Boundary Conditions ดังเช่น

```
# Periodic Boundary Conditions
if {1} {
cellBasisVector1 X 0.0 0.0
cellBasisVector2 0.0 Y 0.0
cellBasisVector3 0.0 0.0 Z
cell Origin - - -
}
```

5. ดำเนินการ minimize โดยใช้ค่า minimize เริ่มต้นที่ 6000 step หลังจากใส่ค่า parameter ครบแล้ว ทำการ minimization โดยใช้คำสั่ง charmrun +p1 namd2 Nanodisc-min.conf > Nanodisc-min.out ซึ่งจะได้ ไฟล์ Nanodisc-min.out ออกมาเป็นข้อมูล output เพื่อนำไปใช้เป็นไฟล์เริ่มต้นในการรัน MD

6. เขียนสคริปเตรียมไฟล์และใส่ค่า parametes ต่างๆลงในไฟล์เพื่อทำการรัน MD โดยใช้ไฟล์ Nanodisc-min.out เป็นไฟล์ input เพื่อที่จะให้ได้ ไฟล์ Nanodisc-01.out เป็นไฟล์ output ออกมา โดยสคริปนี้ใช้ชื่อว่า Nanodisc-01.conf

```
set inputname Nanodisc-min.out

set outputname Nanodisc-01.out
```

7. หลังจากนั้นใส่ค่า parameters ต่างๆเหมือนกับ สคริป Nanodisc-min.conf เพียงแค่เปลี่ยนค่า minimize เป็น 20,000 step และใช้ค่า run MD 100,000 step

8. เขียนสคริป Nanodisc.conf โดย set inputname และ outputname ตามลำดับตัวเลขยกตัวอย่างเช่น

➤ สคริป Nanodisc-02.conf
 set inputname Nanodisc-01.out
 set outputname Nanodisc-02.out

➤ สคริป Nanodisc-03.conf
 set inputname Nanodisc-02.out
 set outputname Nanodisc-03.out

โดยเขียนไฟล์สคริปจนถึง Nanodisc-60.conf

9. เมื่อทำการเตรียมไฟล์สคริปเสร็จแล้ว ก็ทำการรัน MD โดยใช้โปรแกรมคำสั่ง

```
runCalc=1
dryRun() {
if [ "${1}" == "--log" ]; then
    logFile="${2}"
    shift
    shift
else
    logFile=/dev/stdout
fi
if [ "${runCalc}" -eq 0 ]; then
    echo "${*}" \> ${logFile}
else
    "${@}" > "${logFile}"
fi
```



```
}  
for i in {01..60}; do  
    dryRun --log "Nanodisc-$i.out" charmrun +p2 namd2 +idlepoll Nanodisc-$i.conf  
    wait  
done
```

ซึ่งเป็นคำสั่งที่ใส่ไฟล์ .conf เป็นไฟล์ อินพุท เข้าไปเพื่อให้ได้ไฟล์ เอ้าท์พุท ออกมา ตามที่ได้เขียนไว้ในสคริป



ประวัติผู้ทำการวิจัย

นางสาว ภาสวัน ภริตานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 9 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดพัทลุง สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนพัทลุง จังหวัดพัทลุง เมื่อปีการศึกษา 2556 เคยได้รับรางวัล นักเรียนดีเด่น เมื่อ พ.ศ.2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 1/110 ลุมพินีคอนโดโครงการ 2 ซอย ลาดปลาเค้า 70 แขวง อนุสาวรีย์ เขต บางเขน จังหวัด กรุงเทพมหานครไปรษณีย์ 10220 อีเมลล์ pasawan.paritanon@hotmail.com

