

บทความปริทัศน์ (Review Article)**การประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีน**
Applications of molecular dynamics simulation techniques in protein scienceจิตรยุทธ์ จิตอ่อนน้อย^{1*}Jitrayut Jitonnorn^{1*}**บทคัดย่อ**

ตลอดหลายทศวรรษที่ผ่านมา เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญอย่างมากต่องานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีน เทคนิคนี้นิยมใช้ในการศึกษาสมบัติทางโครงสร้าง สมบัติพลวัต และสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ของโปรตีน เพื่ออธิบายและทำนายกระบวนการสำคัญทางชีวเคมีในธรรมชาติ เช่น การม้วนพับตัวของโปรตีน การเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ เสถียรภาพของโปรตีนในสารละลาย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่สัมพันธ์กับหน้าที่ของโปรตีน และการจดจำโมเลกุลของโปรตีน เช่น โปรตีน-เปปไทด์ โปรตีน-ยา และโปรตีน-ตัวรับยังเป็นต้น บทความนี้ได้นำเสนอตัวอย่างผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติดังกล่าวของโปรตีน เพื่อสะท้อนให้เห็นถึงบทบาทและการประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลในงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีนในปัจจุบัน

คำสำคัญ : การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล, การออกแบบและการจำลองชีวโมเลกุล, วิทยาศาสตร์โปรตีน, สมบัติพลวัตของโปรตีน

Abstract

Molecular dynamics (MD) simulation techniques have increasingly been applied as an essential tool in the field of protein science over the past decades. They are now routinely used to investigate the structure, dynamics, and thermodynamics of proteins to understand and predict important biochemical processes such as protein folding, enzyme catalysis, protein stability in solution, conformational changes associated with protein function, and molecular recognition of proteins such as protein-peptide, protein-drug, protein-inhibitor, etc. This review has highlighted some recent applications of MD simulations in studying such protein activities, providing the significance and applications of MD techniques currently used in protein science.

Keywords: Molecular dynamics simulation, biomolecular modeling and simulation, protein science, protein dynamics

¹ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

* Division of Chemistry, School of Science, University of Phayao, Phayao Province 56000

Corresponding author, e-mail: jitrayut.018@gmail.com

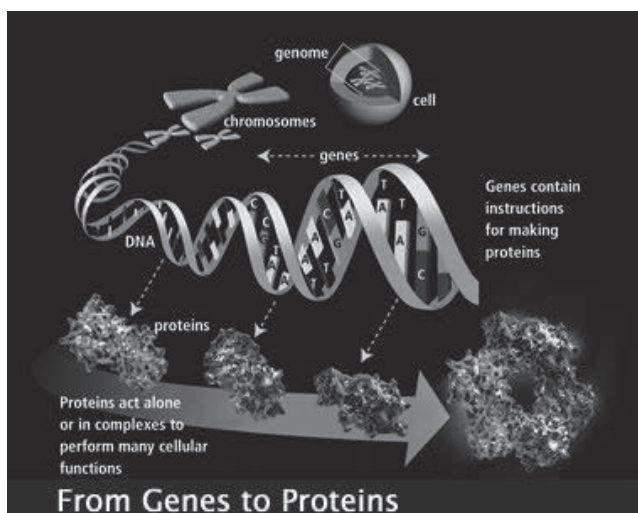
Received: 13 March 2013; Accepted: 30 March 2014

บทนำ

โปรตีน จัดเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบพื้นฐานสำคัญ และยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) พบได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โปรตีนเป็นศูนย์กลางของการทำงานในระดับเซลล์ (cellular function) ที่มีบทบาทสำคัญหลายด้านทางชีววิทยา อาทิเช่น โปรตีนสามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีเพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นต่อกระบวนการของเซลล์ โปรตีนสามารถทำหน้าที่ขนส่งโมเลกุล เช่น ฮีโมโกลบิน สามารถถ่ายโอนออกซิเจน อิเล็กตรอน และพลังงานภายในเซลล์ โปรตีนสามารถทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกัน

เช่น แอนติบอดี โดยการยึดจับกับแอนติเจน เพื่อปกป้องเซลล์จากสิ่งแปลกปลอมภายนอก

นอกจากนี้โปรตีนยังเป็นองค์ประกอบสำคัญสำหรับโครงสร้างค้ำจุนของเซลล์ เช่น คอลลาเจน (collagen) แอคติน (actin) และไมโอซิน (myosin) เป็นต้น ด้วยความสามารถในการทำงานที่หลากหลายของโปรตีนนี้เอง จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามค้นหาคำตอบ เพื่อเปิดเผยความลับของโปรตีน ตัวอย่างโครงการจีโนมมนุษย์ (Human Genome Project) (<http://genomics.energy.gov>) เป็นอีกหนึ่งความพยายามของนักวิทยาศาสตร์ที่มีเป้าหมายร่วมกันในการถอดรหัสยีน (genetic code) ของมนุษย์ในรูปของโครโมโซม (chromosomes) และ DNA จนได้โปรตีนที่มีโครงสร้างและหน้าที่ที่แตกต่างกันแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการถอดรหัสยีนของมนุษย์จนได้โครงสร้างของโปรตีนในโครงการ Human Genome Project (<http://genomics.energy.gov>)

งานวิจัยส่วนใหญ่ทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีน จะเกี่ยวข้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และหน้าที่ของโปรตีน (structure and function relationships of proteins) ซึ่งนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าน่าจะมีความเกิน โดยโครงสร้างของโปรตีนส่วนใหญ่ได้มาจากเทคนิค X-ray crystallography และอาจมีบางส่วนจากเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy และอื่นๆ นับตั้งแต่การค้นพบโครงสร้างของโปรตีนไมโอโกลบิน (myoglobin) เป็น

ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1958 [2] จำนวนโครงสร้างของโปรตีนได้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว

ปัจจุบันพบโครงสร้างของโปรตีนมากกว่า 90,000 โครงสร้าง ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลโปรตีน (Protein Data Bank) [1] อย่างไรก็ตามโครงสร้างของโปรตีนที่ตกผลึกได้นั้น เกิดจากการจัดเรียงตัวแบบบีบอัดของผลึกโปรตีน ซึ่งอาจส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการบิดเบือนไปจากโครงสร้างจริงที่พบในระบบของสิ่งมีชีวิต อีกทั้งการทำงานของโปรตีนส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับสมบัติพลวัต (protein dynamics) ซึ่งมี

เอกลักษณ์เฉพาะตัวในโปรตีนแต่ละชนิด [12] และยากต่อการตรวจวัดโดยการทดลอง ดังนั้นหากสามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของโปรตีนที่หาได้ด้วยเทคนิค X-ray และ NMR กับสมบัติพลวัตของโปรตีนได้ จะทำให้สามารถเข้าใจโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่พบว่าสมบัติพลวัตของโปรตีน คือคุณสมบัติที่สำคัญอันนำไปสู่การค้นพบหน้าที่สำคัญของโปรตีน [4] การอธิบายสมบัติพลวัตของโปรตีนนั้น สามารถศึกษาได้ด้วยเทคนิค NMR [10, 20, 24] และเทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics simulation) [4, 12, 16, 19] หรืออาศัยทั้งสองเทคนิค [27] สำหรับเทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลนั้นนิยมนำมาใช้ศึกษาสมบัติพลวัตของโปรตีนในระดับอะตอม โดยอาศัยการวิเคราะห์โครงสร้างและการมองเห็นโปรตีนเคลื่อนไหว ปัจจุบันเทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาไปพร้อมๆ กับเทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ จนสามารถจำลองระบบชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และซับซ้อนได้ใกล้เคียงกับปรากฏการณ์ทางธรรมชาติ [29] โดยสามารถจำลองระบบในคอมพิวเตอร์ตั้งแต่ช่วงเวลาสั้นที่สุดในหน่วยพิโกวินาที (ps) ไปจนถึงการจำลองในช่วงเวลาที่มีความใกล้เคียงกับเวลาจริงในระหว่างทดลองในห้องปฏิบัติการ [6]

ตลอดระยะเวลาหลายสิบปีที่ผ่านมา เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญอย่างมากต่องานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีนในปัจจุบัน โดยเฉพาะการอธิบายสมบัติเชิงโครงสร้าง สมบัติพลวัต และสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ของโปรตีน ได้แก่ การม้วนพับตัวของโปรตีน การเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ เสถียรภาพของโปรตีนในสารละลาย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่สัมพันธ์กับหน้าที่ของโปรตีน และการจดจำโมเลกุลของโปรตีน เช่น โปรตีน-เปปไทด์ โปรตีน-ยา และโปรตีน-ตัวยับยั้ง เป็นต้น ดังนั้นบทความนี้จะกล่าวถึงการประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่ออธิบายสมบัติเหล่านี้ของโปรตีน

การประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ในการศึกษาสมบัติของโปรตีน

การม้วนพับตัวของโปรตีน (protein folding)

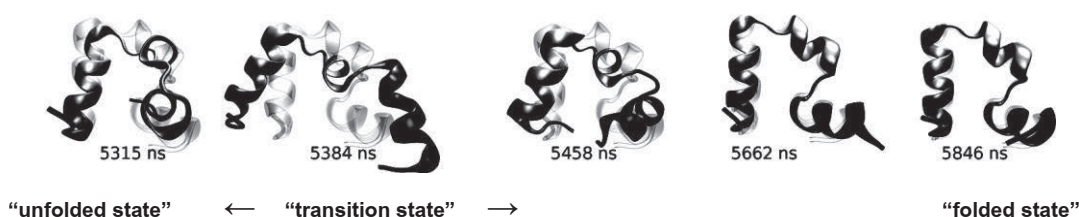
การศึกษาการม้วนพับตัวของโปรตีนนั้นเป็นเรื่องที่มีความซับซ้อนและยุ่งยาก เนื่องจากความหลากหลายกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด ซึ่งมีสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน ทำให้โปรตีนเกิดการม้วนพับตัวได้แตกต่างกัน มีโครงสร้างม้วนพับตัวที่จำเพาะเจาะจงต่อการทำงานภายในเซลล์ได้แตกต่าง และหากโปรตีนเกิดความผิดปกติในการม้วนพับตัว (misfolding) ยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้อีกด้วย (protein misfolding disease) [11] อาทิ โรคความจำเสื่อม โรคเมเร็ง เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาถึงที่มาและปัจจัยของความซับซ้อนในการม้วนพับตัว จึงเป็นเรื่องที่มีความท้าทายอย่างยิ่งในสาขาวิทยาศาสตร์โปรตีน โดยเฉพาะการศึกษากลไกการม้วนพับตัวของโปรตีนด้วยวิธีการจำลองทางคอมพิวเตอร์

ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา นับตั้งแต่มีการศึกษาการจำลองการม้วนพับตัวของโปรตีนด้วยคอมพิวเตอร์ [22] เป็นต้นมา การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ได้เข้ามามีบทบาทอย่างต่อเนื่องต่อการศึกษาวิจัยการม้วนพับของโปรตีน [25] ถึงแม้ว่าในอดีตการจำลองการม้วนพับของโปรตีนนั้นแทบจะเป็นไปไม่ได้ เนื่องจากข้อจำกัดในด้านประสิทธิภาพของคอมพิวเตอร์ในยุคนั้น แต่ปัจจุบันคอมพิวเตอร์และซอฟต์แวร์ได้รับการพัฒนามีขีดความสามารถและประสิทธิภาพที่สูงขึ้น จึงทำให้การจำลองการม้วนพับตัวของโปรตีนเป็นไปได้ ปัจจุบันพบว่า การม้วนพับของโปรตีนสามารถจำลองได้นานขึ้นจนใกล้เคียงช่วงเวลาจริงที่โปรตีนเกิดการม้วนพับ [6, 7]

อย่างไรก็ตามโปรตีนหลายชนิดอาจมีสภาวะการม้วนพับที่อ่อนไหวต่อสภาวะภายในเซลล์ ซึ่งอยู่นอกเหนือขอบเขตของการจำลอง จึงทำให้ความแม่นยำในการจำลองอาจคลาดเคลื่อนได้ ตัวอย่างการประยุกต์ใช้การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาการม้วนพับตัวของโปรตีนในระดับอะตอม เช่น Freddolino และ Schulten, 2009 [8] ได้ศึกษาการม้วนพับตัวของโปรตีน villin headpiece ซึ่งจัดเป็นโปรตีน

ขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 35 ตัวที่นิยมนำมาศึกษาการม้วนพับของโปรตีน ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้จำลองโมเลกุลของโปรตีนชนิดนี้ในสารละลายนานถึง 7 ไมโครวินาที (μs) โดยเริ่มจำลองโปรตีนจากสภาวะคลายตัว (unfolded state) ไปยังสภาวะม้วนพับตัว (folded state) ที่มีความเสถียรทางโครงสร้าง ผลการจำลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน villin headpiece เกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างระดับทุติยภูมิจนได้โครงสร้างจำลองสุดท้ายที่มีสภาวะม้วน

พับใกล้เคียงกับผลการทดลองด้วยเทคนิค X-ray crystallography ผลลัพธ์ที่ได้นี้บ่งบอกถึงความถูกต้องและความแม่นยำของเทคนิคการจำลองที่ใช้ นอกจากนี้การจำลองยังให้ข้อมูลโครงสร้างที่สภาวะแทรนซิชัน (transition state) ซึ่งพบในช่วงเวลา 5,384 นาโนวินาที (ns) แสดงดังภาพที่ 2 จึงเป็นไปได้ว่ากลไกการม้วนพับตัวของโปรตีน villin headpiece นั้นน่าจะเกิดการผลักกันของโครงสร้างระดับทุติยภูมิก่อนที่จะเกิดการม้วนพับตัวเข้าสู่โครงสร้างที่เสถียรตามธรรมชาติ



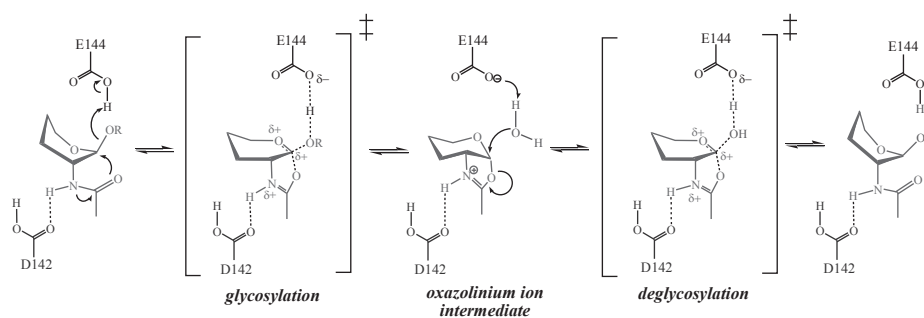
ภาพที่ 2 แสดงผลการจำลองการม้วนพับของโปรตีน villin headpiece (สีดำ) ในช่วงที่เกิดการแทรนซิชันจากสภาวะคลายตัว (unfolded state) ไปสู่สภาวะม้วนพับ (folded state) โดยเทียบกับการทดลองด้วยเทคนิค X-ray crystallography (สีเทา) [8]

การเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ (enzyme catalysis)

เอนไซม์ จัดเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการของสิ่งมีชีวิต โดยถ้าขาดเอนไซม์ระบบการทำงานของเซลล์จะผิดปกติ (malfunction) ได้ เช่น การผ่าเหล่า (mutation) การผลิตมากเกินไป (overproduction) ผลิตน้อยเกินไป (underproduction) การขาดหายไป (deletion) เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (biocatalyst) ที่มีประสิทธิภาพ และความจำเพาะเจาะจงสูง ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต ด้วยคุณสมบัติพิเศษของเอนไซม์นี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจและศึกษาสมบัติของเอนไซม์ โดยเฉพาะการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetic) และกลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมี (reaction mechanism) รวมไปถึงการระบุตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา ข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ให้ดียิ่งขึ้น และเป็นที่ต้องการต่ออุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เชื้อเพลิง อาหาร และยา เป็นต้น

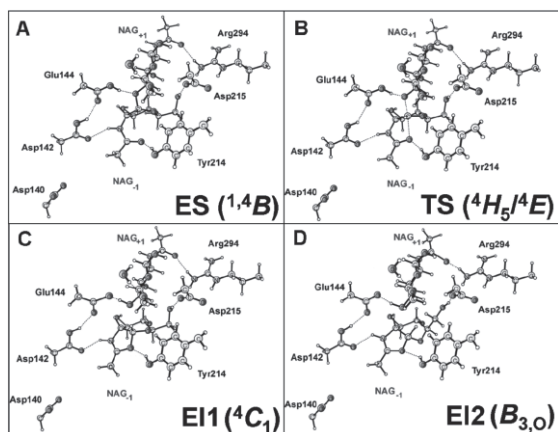
การประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลกับการศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการอธิบายสมบัติจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในระดับอะตอม โดย

พบรายงานครั้งแรกใน ปี ค.ศ. 1976 [28] โดย Arie Warshel และ Michael Levitt เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่สามารถรวมกลศาสตร์ควอนตัมเข้ากับกลศาสตร์ดั้งเดิม (หรือกลศาสตร์โมเลกุล) เพื่อจำลองกลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ได้สำเร็จ และเรียกเทคนิคใหม่นี้ว่า “เทคนิคการจำลองที่ผสมผสานระหว่างกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์โมเลกุล” (combined quantum mechanics/molecular mechanics simulation, QM/MM) [26] ปัจจุบันเทคนิคนี้มีการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย และได้รับการยอมรับ จนทำให้มีนักวิจัย 3 ท่าน คือ Arie Warshel Michael Levitt และ Martin Karplus ได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมี ประจำปี ค.ศ. 2013 เนื่องจากการคิดค้นเทคนิคใหม่นี้ ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ เช่น การศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โคติเนสปีด้วยเทคนิค QM/MM [14, 17] การศึกษาเริ่มจากการจำลองพลวัตโมเลกุลของโครงสร้างเชิงซ้อนเอนไซม์-ซับสเตรต (enzyme-substrate complex) เพื่อหาโครงสร้างที่สภาวะสมดุล จากนั้นโครงสร้างที่ได้จะนำมาใช้เป็นโครงสร้างเริ่มต้นสำหรับการศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์โคติเนส ซึ่งมีขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์โคติเนสบี

การคำนวณกลไกของปฏิกิริยา จะประกอบด้วย ขั้นตอนการเลือกบริเวณสำคัญของปฏิกิริยา ขั้นตอนการออกแบบและการกำหนดเส้นทางการเกิดปฏิกิริยา ในรูปพิกัดเชิงเส้นของระยะห่างระหว่างอะตอม (reaction coordinate) และขั้นตอนการคำนวณพื้นผิวพลังงานศักย์ (potential energy surface calculation) ของปฏิกิริยา ผลการจำลองที่ได้คือ พลังงานของปฏิกิริยา และโครงสร้างที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ โครงสร้างเชิงซ้อน เอนไซม์-ซับสเตรต (enzyme-substrate complex, ES) โครงสร้างแทรนซิชัน (transition state, TS) และ โครงสร้างมัธยันตร์ (enzyme-intermediate complex, EI) แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงพื้นผิวพลังงานศักย์ของการเร่งปฏิกิริยาเคมีในขั้นตอน glycosylation ของเอนไซม์โคติเนสบี เมื่อตำแหน่งสำคัญ 142 คือ Asp (A) และ Asn (B) [14]

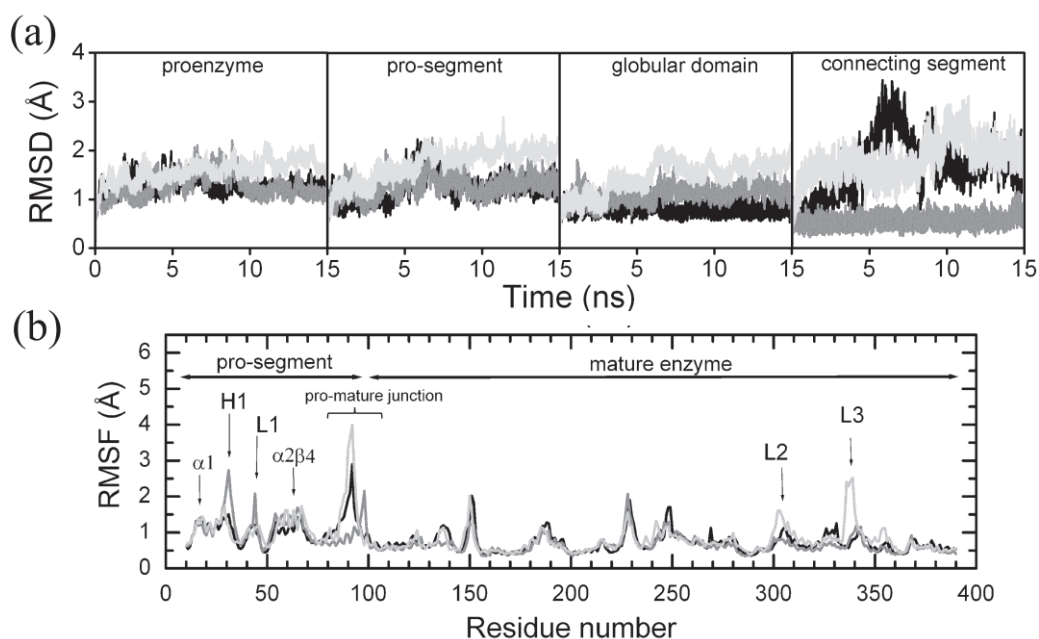
เสถียรภาพทางโครงสร้างของโปรตีนในสารละลาย (protein structural stability in solution)

โครงสร้างโปรตีนส่วนใหญ่แล้ว ได้มาจากเทคนิคการฉายรังสีเอกซ์ (X-ray) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดจากการตกผลึกในสถานะของแข็ง จึงทำให้ได้เพียงโครงสร้างเดียว (static X-ray structure) ซึ่งขัดแย้งกับความเป็นจริงของโครงสร้างโปรตีนในสารละลาย ซึ่งอาจมีได้หลายโครงสร้าง อีกทั้งการทำงานของโปรตีนหลายชนิดพบว่าขึ้นอยู่กับสมบัติพลวัตที่มีการเปลี่ยนโครงสร้างได้หลายแบบ (conformational change) ด้วยเหตุนี้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการทำนายสมบัติพลวัตและเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีนในสารละลาย ตัวอย่างเช่น การศึกษาความเสถียรทางโครงสร้างของโปรตีนโปรคาร์บอกซิเปปติเดส (procarboxypeptidase, PCP) โดยใช้วิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics simulation) [16]

การศึกษาเริ่มจากโครงสร้าง X-ray ของโปรตีน PCP ชนิด A1 A2 และ B และทำการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของโครงสร้างโปรตีนทั้งสามชนิดในน้ำที่อุณหภูมิ 300 เคลวิน นาน 15 นาโนวินาที ผลการวิเคราะห์เสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีนจากการจำลองเทียบกับโครงสร้างจาก X-ray แสดงดังภาพที่ 5 โดยการวิเคราะห์โครงสร้าง ด้วยวิธี Root Mean Square Displacement (RMSD) จะบอกถึงการเบี่ยงเบนของอะตอมในโครงสร้างโปรตีนเทียบกับระยะเวลาการจำลอง จากภาพที่ 5a จะเห็นได้ว่าเสถียรภาพของโปรตีนทั้งสามไม่คงที่ในช่วงแรกของการจำลอง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาโนวินาที พบว่าโปรตีนสามารถปรับตัวเข้ากับสารละลายได้ดีขึ้น และเริ่มเข้าสู่สภาวะสมดุล

นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณส่วนต่างๆ ของโปรตีน เช่น pro-segment globular domain และ connecting segment มีเสถียรภาพทางโครงสร้างที่แตกต่างกันไปตามชนิดและความยืดหยุ่นของโครงสร้างโปรตีน ส่วนการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธี Root Means Square Fluctuation (RMSF) จะบอกถึงความยืดหยุ่น

ของตำแหน่งกรดอะมิโนแต่ละตัวภายในโครงสร้างโปรตีน โดยคำนวณจากการกวัดแกว่งโดยเฉลี่ยที่พบในช่วงของการจำลอง โดยพบว่าโปรตีนทั้งสามแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เกิดความยืดหยุ่นสูงคล้ายๆ กัน โดยเฉพาะบริเวณ pro-mature junction ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่างส่วน pro-segment กับส่วนของเอนไซม์



ภาพที่ 5 แสดงเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน PCPA1 (สีดำ) PCPA2 (สีเทาเข้ม) และ PCPB (สีเทาอ่อน) ในน้ำ เทียบกับโครงสร้าง X-ray เมื่อจำลองนาน 15 นาโนวินาที โดยการวิเคราะห์ข้อมูลโครงสร้างด้วยวิธี (ก) RMSD และ (ข) RMSF [16]

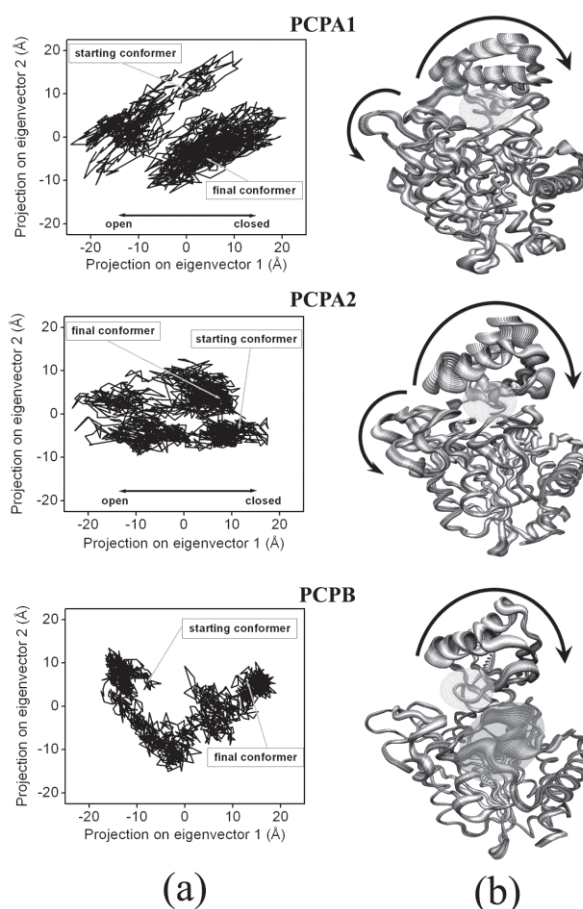
การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างที่สัมพันธ์กับหน้าที่ของโปรตีน (conformational changes associated with protein function)

ดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อที่ผ่านมา สมบัติพลวัตของโปรตีนจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับหน้าที่ของโปรตีน เพื่อให้เห็นภาพจะขอยกตัวอย่างเดิมของการจำลองพลวัตของโปรตีน PCP โดยมีการวิเคราะห์โครงสร้างที่ได้จากการจำลองด้วยวิธี principle component analysis ซึ่งเป็นวิธีทางสถิติที่นิยมใช้ในการจัดกลุ่มข้อมูลที่มีความสำคัญจากมากไปน้อย เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง

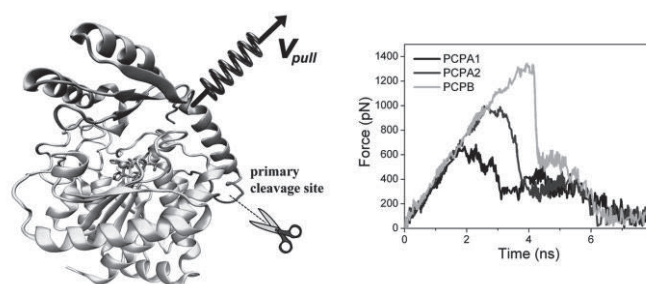
ชุดข้อมูลกับการเคลื่อนไหวของโปรตีน [12] ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึงการเคลื่อนไหวของโปรตีนในชุดข้อมูลหลัก 2 ชุดแรก (PC1 และ PC2) ที่มีความสำคัญที่สุดในระหว่างการจำลอง จากภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่าโปรตีน PCPA1 และ PCPA2 มีลักษณะการเคลื่อนไหวที่คล้ายคลึงกันดังภาพ ขณะที่โปรตีน PCPB แสดงลักษณะการเคลื่อนไหวแตกต่างไปจาก PCPA1 และ PCPA2 ผลการจำลองพลวัตนี้สามารถอธิบายการเกิดและไม่เกิดแอคติวิตีของโปรตีน PCPA และ PCPB ตามลำดับ ในห้องปฏิบัติการได้เป็นครั้งแรก

นอกจากนี้ยังมีการศึกษากลไกการเปลี่ยนโปรตีน PCP ให้อยู่ในรูป active โดยใช้วิธีการจำลองที่ซับซ้อนขึ้น ตัวอย่างเช่น การศึกษาเชิงเปรียบเทียบของกลไกการเกิดเอนไซม์คาร์บอกซิเปปทิเดส A1, A2 และ B โดยใช้วิธีการเร่งการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (steered molecular dynamics simulation, SMD) [18] การจำลองเริ่มจากการหาโครงสร้างที่สภาวะสมดุล จากนั้นทำการจำลองด้วยวิธี SMD เพื่อเร่งขั้นตอนการหลุดออกของส่วนบังคับการทำงานกับส่วนของเอนไซม์ โดยการจำลอง SMD นี้จะต้องกำหนดทิศทางและขนาดของแรงที่ใช้ดึงให้เหมาะสมก่อนทดลอง (ดังภาพที่ 7 ด้านซ้าย)

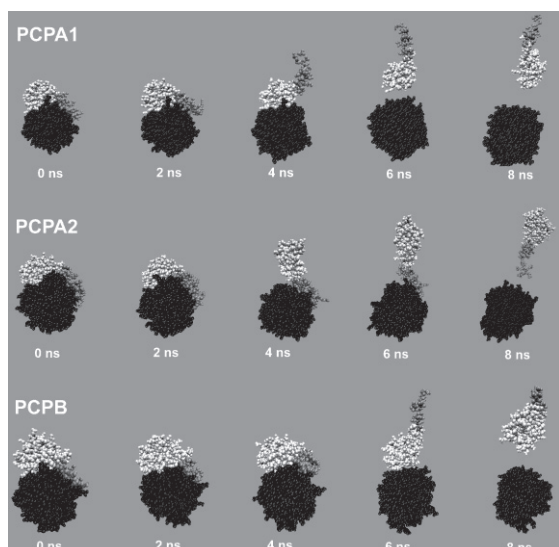
ผลการจำลองพลวัตที่ได้ด้วยวิธี SMD นี้คือขนาดของแรงที่เปลี่ยนไปในช่วงระยะเวลาที่ใช้สำหรับจำลองการดึง ซึ่งค่าแรงนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นภายในโปรตีน โดยพบว่าลำดับของแรงสูงสุดที่สามารถทำให้เริ่มเกิดการแตกออกระหว่างส่วนบังคับกับส่วนของเอนไซม์คือ PCPB > PCPA2 > PCPA1 (ภาพที่ 7 ด้านขวา) การจำลองจะสิ้นสุดลง เมื่อแรงมีค่าเป็นศูนย์ และ ณ จุดนี้เองโปรตีนทั้งสองบริเวณได้หลุดออกจากกันอย่างสมบูรณ์ และเมื่อเปรียบเทียบภาพรวมของการจำลอง จะสามารถทำนายลักษณะและกลไกของการหลุดออก แสดงดังภาพที่ 8 นอกจากนี้ยังพบว่าความแตกต่างของอันตรกิริยาภายในโปรตีนทั้งสามเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดกลไกการแตกออกที่แตกต่างกันอีกด้วย



ภาพที่ 6 แสดงโหมดหลักของการเคลื่อนไหวของโปรตีน จากการวิเคราะห์โครงสร้างที่ได้จากการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล [18]



ภาพที่ 7 แสดงทิศทางการดึงโปรตีนบริเวณ activation segment ออกจากเอนไซม์ เมื่อพันธะเปปไทด์ที่ตำแหน่ง primary cleavage site ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทริปซิน [18]



ภาพที่ 8 แสดงกลไกการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโปรตีนคาร์บอกซิเปปทิเดส (ทำงานไม่ได้) ไปเป็นเอนไซม์คาร์บอกซิเปปทิเดส (ทำงานได้) [18]

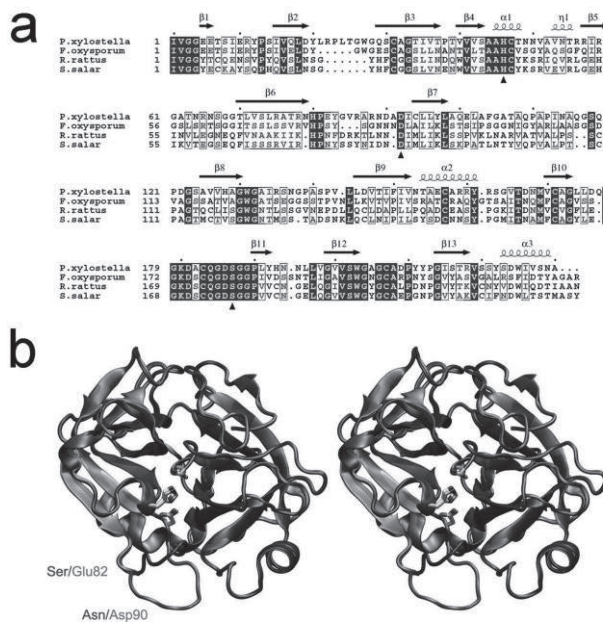
การจดจำโมเลกุลของโปรตีน (Molecular recognition of protein complexes)

คุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของโปรตีนคือความสามารถในการจดจำโมเลกุล (Molecular recognition) ซึ่งพบว่าโปรตีนสามารถจดจำโมเลกุลที่มีขนาดแตกต่างกันได้ เช่น ยา เปปไทด์ หรือโปรตีน การศึกษาสมบัตินี้ด้วยเทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลสามารถช่วยอธิบายพฤติกรรมในระดับอะตอมสำหรับการยึดจับกันของโมเลกุลเหล่านี้กับโปรตีนได้ โดยหากเราต้องการจะศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับตัวยาหรือตัวลิแกนด์ใดๆ (protein-ligand interaction) นั้น สิ่งแรกที่ต้องทำก็คือ การสำรวจข้อมูลเบื้องต้นของโครงสร้างโปรตีนเป้าหมายในฐานข้อมูลโปรตีน (Protein databank) [1] ซึ่งฐานข้อมูลนี้สามารถดาวน์โหลดได้จากเว็บไซต์ <http://www.rcsb.org> โดยไม่มีค่าใช้จ่าย และบ่อยครั้งจะไม่พบในข้อมูลโครงสร้างโปรตีนเป้าหมายที่จะนำมาใช้ศึกษาดังกล่าว

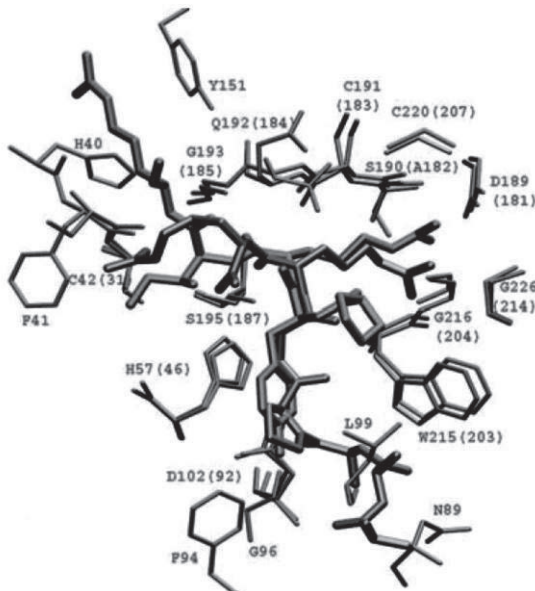
ด้วยเหตุนี้ การออกแบบโครงสร้างโปรตีนจึงเกิดขึ้น โดยอาศัยวิธีการเทียบเคียงข้อมูลระหว่างลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้าง เรียกว่า โฮโมโลยีโมเดลลิง (homology modeling) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการทำนายโครงสร้างโปรตีนเป้าหมาย (protein target) จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) และ

โครงสร้างโปรตีนต้นแบบ (protein template) ที่มีความใกล้เคียงกันกับโปรตีนเป้าหมาย และมักจะนิยมใช้โปรตีนต้นแบบมากกว่าหนึ่งโครงสร้างในการออกแบบโมเดลโดยวิธีโฮโมโลยี เมื่อต้องการศึกษาพลังงานอิสระของการยึดจับ [12] วิธีการนี้มักจะนิยมนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการออกแบบยา ในกรณีที่เกิดจากปัญหาการดื้อยา หรือการเกิดโรคอุบัติใหม่ที่ยังไม่มีการค้นพบโครงสร้างของโปรตีนเป้าหมายมาก่อน ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำเพิ่มจำนวนมากขึ้น ตัวอย่างเช่น โรคไข้หวัดนก H5N1 โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องในคนหรือ HIV และโรค SARS

ตัวอย่างงานวิจัยที่แสดงถึงการประยุกต์ใช้เทคนิคการออกแบบโครงสร้างโปรตีนด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อทำนายคุณสมบัติการจดจำโมเลกุลของโปรตีน เช่น การออกแบบตัวยับยั้งเปปไทด์ (peptide inhibitor) จากตำแหน่งโปรรีเจียน (proregion) ของเอนไซม์ทริปซิน ลำไส้ของหนูอนไยฝัก สำหรับใช้เป็นยาฆ่าแมลง [16] โดยการศึกษาได้ประยุกต์ใช้วิธีการทำโฮโมโลยีโมเดลลิง (homology modeling) ดังภาพที่ 9 และยังได้ทำนายความสามารถในการยึดจับของตัวยับยั้งเปปไทด์โดยการจำลองการยึดจับของโมเลกุล (molecular docking) ที่เกิดจากการออกแบบทั้ง 7 แบบ คือ AAPGHR AAPGRR AAPGKR AAPGHRI APGHRIV PGHRIVG AAAAPGH และ AAAAPG โดยพบว่า เปปไทด์ AAPGRR เป็นตัวยับยั้งที่ดีที่สุด เนื่องจากให้ค่าพลังงานการยึดจับต่ำสุด (docking/binding energy) นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างบริเวณยึดจับของเปปไทด์ตัวนี้กับเอนไซม์ทริปซินให้ความสอดคล้องกันกับโครงสร้างของตัวยับยั้งทริปซินที่ได้จากการทดลอง (X-ray structure) ดังแสดงในภาพที่ 10

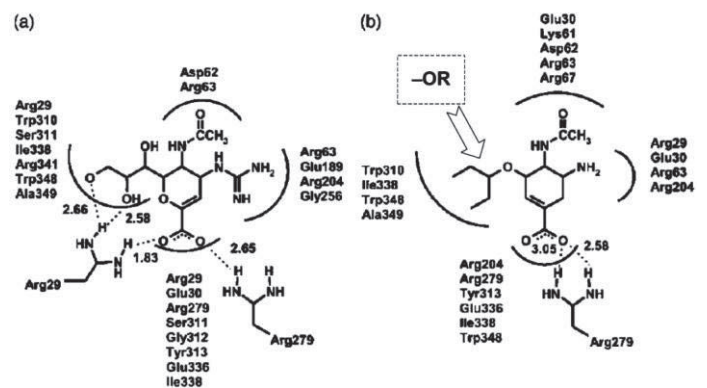


ภาพที่ 9 แสดงวิธีโฮโมโลยีโมเดลล์ โดยการทำนายโครงสร้างโปรตีนจากการเทียบเคียงความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน (a) ไปเป็นโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ทรอปซิน (b) [18]



ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างบริเวณยึดจับของเอนไซม์เป้าหมาย กับตัวยับยั้งเปปไทด์ AAAPGRR ที่ให้ผลการยึดจับดีที่สุด และยังพบว่า มีตำแหน่งยึดจับที่ใกล้เคียงกับตัวยับยั้งแมลงที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูลโปรตีน [15]

ตัวอย่างงานวิจัยในกลุ่มของโรคอุบัติใหม่ ได้แก่ การศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์นิวรามิไดเนส (neuraminidase) โดยใช้เคมีคอมพิวเตอร์ และการทำนายตำแหน่งยึดจับของยาต้านโรคไข้หวัดนก (H5N1) 2 ตัว คือ oseltamivir และ zanamivir ดังภาพที่ 11 [3] เนื่องจากในช่วงที่เกิดโรคระบาดยังไม่มีข้อมูลโครงสร้างของเอนไซม์เป้าหมายนี้ แต่ทราบข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไข้หวัดนก H5N1 การศึกษาจึงเริ่มจากการออกแบบโครงสร้างเอนไซม์นิวรามิไดเนสโดยใช้วิธีโฮโมโลยี จากนั้นทำนายโครงสร้างตำแหน่งยึดจับของตัวยาททั้งสองด้วยวิธีการจำลอง docking ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตัวยาน zanamivir และ oseltamivir มีความสามารถในการยึดจับกับเอนไซม์นิวรามิไดเนส N1 ได้ลดลง เมื่อเทียบกับเอนไซม์ตัวเดียวกันในสายพันธุ์ N2 และ N9 สอดคล้องกับรายงานการดื้อยาในตัวยาททั้งสอง [13] นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังสามารถบอกได้ว่าตัวยาน zanamivir น่าจะยังให้ผลดีกว่าตัวยาน oseltamivir เนื่องจากปัจจัยหลักทางโครงสร้างที่บริเวณยึดจับ ซึ่งพบว่าตัวยาน oseltamivir มีหมู่อัลคอกไซด์ (-OR) ซึ่งมีความยืดหยุ่นสูง จึงทำให้เกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์ไม่ดี ดังแสดงในภาพที่ 11

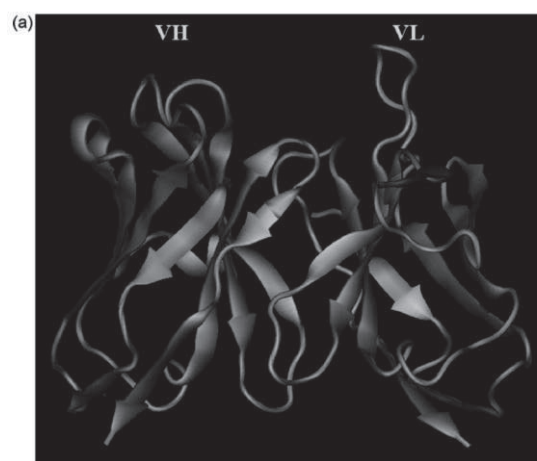


ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งยึดจับและอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์นิวรามิไดเนสกับยาต้านไข้หวัดนก (a) zanamivir และ (b) oseltamivir [23]

นอกจากโปรตีนจะมีสมบัติในการจดจำโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก อย่างเช่น ตัวยับยั้งหรือตัวยาน ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว โปรตีนยังสามารถจดจำโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น โปรตีนได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น การทำนายโครงสร้าง

บริเวณยึดจับและอันตรกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน (antigen-antibody interaction) [21] โดยเริ่มจากการทำนายโครงสร้างโปรตีนของแอนติบอดี ซึ่งเกิดจากการสายโซ่พอลิเปปไทด์ 2 เส้น คือ heavy chain (VH) และ light chain (VL) ยึดจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide) โดยวิธีโฮโมโลยีโมเดลลิง ดังแสดงในภาพที่ 12 จากนั้นทำการจำลองการยึดจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ในการศึกษาี้แอนติเจนทั้งหมด 9 แบบ ได้แก่ p17.1-p17.9 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งออกแบบขึ้นมาในคอมพิวเตอร์ เพื่อเลียนแบบตำแหน่ง C-terminal epitope (DTGHSSQVSQNY) ของโดเมนบริเวณ p17 ของเชื้อ HIV-1 ซึ่งเชื่อว่าจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดี ผลการจำลองจะให้ค่าพลังงานของการยึดจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน และตำแหน่งกรดอะมิโนของแอนติบอดีที่เกิดอันตรกิริยาแบบ hydrophobic และ hydrophilic ข้อมูลเหล่านี้ได้นำไปทดสอบในห้องปฏิบัติการ

โดยพบว่ามีความสอดคล้องกันจริงระหว่างผลการทดลองทั้งสอง และเมื่อนำโครงสร้างบริเวณยึดจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีมาวิเคราะห์ค่าพลังงานอิสระของอันตรกิริยาของการยึดจับ ทำให้ทราบตำแหน่งสำคัญบนบริเวณยึดจับของแอนติบอดี ดังภาพที่ 13 โดยพิจารณาจากขนาดของกราฟพลังงานในกรดอะมิโนแต่ละตัว คณะผู้วิจัยยังได้เสนอแนะว่าวิธีการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อทำนายตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการยึดจับระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในระบบอื่นๆ ได้โดยไม่จำเป็นต้องรู้โครงสร้างบริเวณยึดจับมาก่อน อีกทั้งยังสามารถปรับปรุงความสามารถในการยึดจับของแอนติบอดีให้ดีขึ้นได้ โดยอาศัยการปรับเปลี่ยนกรดอะมิโนในคอมพิวเตอร์ ซึ่งสามารถทำได้ง่ายกว่าการทดลองในห้องปฏิบัติการ



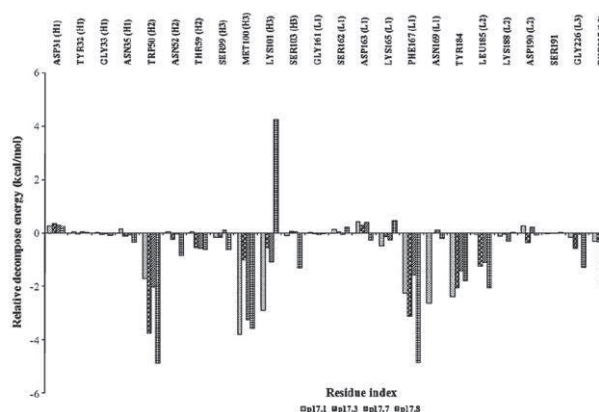
(b) VH sequence

QIQLVQSGPELKKEGETVEISCKASGYTFDYGMNWMKQAPGKSLKWMGW	50
CDR H1	
INTYTGFTYADEFGKGRFAFSLETSASTAYLQINNLSKSEDMATYFCRSRM	100
CDR H2	
KGSYWGQGTIVTSA	115
CDR H3	
VL sequence	
DVVMQTPTLTSLVTIGQFPASISCKSSQSLLSGSGDTFLNWLQRFQSPK	50
CDR L1	
RLIYLVSKLDSGVDFRFTGSGSGDTFLKISRVEADLGYYCQGTSLP	100
CDR L2	
QTFGGGKLEIK	112
CDR L3	

ภาพที่ 12 แสดงโครงสร้างแอนติบอดีจากการทำนายด้วยวิธีโฮโมโลยีโมเดลลิง (a) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนของ heavy chain (VH) และ light chain (VL) ดังแสดงใน (b) [21]

ตารางที่ 1 ค่าพลังงานของการยึดจับ (PMF score) ระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนและตำแหน่งกรดอะมิโนของแอนติบอดีที่เกิดอันตรกิริยาแบบ hydrophobic และ hydrophilic [21]

Peptide names	Peptide sequences	PMF score (kcal/mol)
p17.1	¹²¹ DTGHSSQVSQNY ¹³²	-902.11
p17.2	¹²¹ DTGHNSQVSQNY ¹³²	-899.18
p17.3	¹²¹ DTGHSSQVSQNY ¹³²	-882.65
p17.4	¹²¹ DTGHNSQVSQNY ¹³²	-898.71
p17.5	¹²¹ NTGHSSQVSQNY ¹³²	-843.51
p17.6	¹²¹ DTGNSSQVSQNY ¹³²	-846.12
p17.7	¹²¹ DTGHSSQASQNY ¹³²	-829.94
p17.8	¹²¹ DTGHSKQVSQNY ¹³²	-926.79
p17.9	¹²¹ DTGNNSQVSQNY ¹³²	-841.02



ภาพที่ 13 แสดงตำแหน่งสำคัญบนบริเวณยึดจับของแอนติบอดี [21]

สรุปผลการศึกษา

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีนได้ก้าวหน้าไปมาก เนื่องจากข้อมูลโครงสร้างของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนเป็นไปได้ อย่างไรก็ตามความเข้าใจในหน้าที่ของโปรตีนอย่างแท้จริงนั้นจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาสมบัติพลวัตของโปรตีนไปพร้อมๆ กัน ซึ่งเป็นสมบัติที่ยากต่อการศึกษาด้วยวิธีการทดลอง ในขณะที่การประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลสามารถนำมาช่วยอธิบายสมบัติของโปรตีนได้เป็นอย่างดี ดังตัวอย่างบทความวิจัยที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น ได้แก่ การม้วนพับตัวของโปรตีน การเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ เสถียรภาพของโปรตีนในสารละลาย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่สัมพันธ์กับหน้าที่ของโปรตีน และการจดจำโมเลกุลของโปรตีน ดังนั้นเทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลจึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างมากต่องานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีน นอกจากนี้ยังมีการคาดการณ์ว่าหากขีดความสามารถของเทคโนโลยีคอมพิวเตอร์เติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคู่ไปกับการพัฒนาเทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล ในอนาคตเราอาจเห็นการจำลองของระบบที่มีขนาดใหญ่ในระดับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตก็เป็นได้

กิตติกรรมประกาศ

บทความวิชาการนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยพะเยา (เลขที่สัญญา R020056216016) และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านสำหรับการตรวจสอบต้นฉบับของบทความวิชาการเรื่องนี้เป็นอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

1. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242.
2. Bluhm, M.M., Bodo, G., Dintzis, H.M. and Kendrew, J.C. (1958). The crystal structure of myoglobin. IV. a fourier projection of sperm-whale myoglobin by the method of isomorphous replacement. *Proc. R. Soc. Lond. A, Math. Phys. Sci.* 246: 369-389.
3. Daidone, I. and Amadei, A. (2012). Essential dynamics: foundation and applications. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2: 762-770.
4. Dodson, G.G., Lane, D.P. and Verma, C.S. (2008). Molecular simulations of protein dynamics: new windows on mechanisms in biology. *EMBO Rep.* 9: 144-150.
5. Fisette, O., Lague, P., Gagne, S. and Morin, S. (2012). Synergistic applications of MD and NMR for the study of biological systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 254208.
6. Freddolino, P.L., Harrison, C.B., Liu, Y. and Schulten, K. (2010). Challenges in protein folding simulations: Timescale, representation, and analysis. *Nat. Phys.* 6: 751-758.
7. Freddolino, P.L., Liu, F., Gruebele, M. and Schulten, K. (2008). Ten-microsecond molecular dynamics simulation of a fast-folding WW domain. *Biophys. J.* 94: L75-77.

8. Freddolino, P.L. and Schulten, K. (2009). Common structural transitions in explicit-solvent simulations of villin headpiece folding. *Biophys. J.* 97: 2338-2347.
9. Genheden, S. (2012). Are Homology Models Sufficiently Good for Free-Energy Simulations? *J. Chem. Inf. Model.* 52: 3013-3021.
10. Göbl, C. and Tjandra, N. (2012). Application of Solution NMR Spectroscopy to Study Protein Dynamics. *Entropy* 14: 581-598.
11. Hammarstrom, P. (2009). Protein folding, misfolding and disease. *FEBS Lett.* 583: 2579-2580.
12. Henzler-Wildman, K. and Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature* 450: 964-972. <http://genomics.energy.gov>.
13. Hurt, A.C., Lowther, S., Middleton, D. and Barr, I.G. (2010). Assessing the development of oseltamivir and zanamivir resistance in A(H5N1) influenza viruses using a ferret model. *Antiviral Res.* 87: 361-366.
14. Jitonnorn, J., Lee, V.S., Nimmanpipug, P., Rowlands, H.A. and Mulholland, A.J. (2011). Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate-assisted catalysis in family 18 chitinases: Conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in ChiB. *Biochemistry* 50: 4697-4711.
15. Jitonnorn, J., Lomthaisong, K. and Lee, V.S. (2012). Computational design of peptide inhibitor based on modifications of proregion from *Plutella xylostella* midgut trypsin. *Chem. Biol. Drug Des.* 79 : 583-593.
16. Jitonnorn, J. and Mulholland, A. (2012). Insights into conformational changes of procarboxypeptidase A and B from simulations: a plausible explanation for different intrinsic activity. *Theor. Chem. Acc.* 131: 1-13.
17. Jitonnorn, J., Mulholland, A.J., Nimmanpipug, P. and Lee, V.S. (2011). Hybrid QM/MM study on the deglycosylation step of chitin hydrolysis catalysed by chitinase B from *Serratia marcescens*. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 5: 47-57.
18. Jitonnorn, J. and Sontag, C. (2012). Comparative study on activation mechanism of carboxypeptidase A1, A2 and B: First insights from steered molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.* 38C: 298-303.
19. Karplus, M. and McCammon, J.A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* 9: 646-652.
20. Kleckner, I.R. and Foster, M.P. (2011). An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814: 942-968.
21. Lee, V.S., Tue-ngeun, P., Nangola, S., Kitidee, K., Jitonnorn, J., Nimmanpipug, P., Jiranusornkul, S. and Tayapiwatana, C. (2010). Pairwise decomposition of residue interaction energies of single chain Fv with HIV-1 p17 epitope variants. *Mol. Immunol.* 47: 982-990.
22. Levitt, M. and Warshel, A. (1975). Computer simulation of protein folding. *Nature* 253: 694-698.
23. Nimmanpipug, P., Jitonnorn, J., Ngaojampa, C., Hannongbua, S. and Lee, V.S. (2007). A computational H5N1 neuraminidase model and its binding to commercial drugs. *Mol. Simul.* 33: 487-493.
24. Osawa, M., Takeuchi, K., Ueda, T., Nishida, N. and Shimada, I. (2012). Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22: 660-669.

25. Scheraga, H.A., Khalili, M. and Liwo, A. (2007). Protein-folding dynamics: overview of molecular simulation techniques. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58: 57-83.
26. Senn, H.M. and Thiel, W. (2009). QM/MM methods for biomolecular systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48: 1198-1229.
27. Trbovic, N., Kim, B., Friesner, R.A. and Palmer, A.G., 3rd (2008). Structural analysis of protein dynamics by MD simulations and NMR spin-relaxation. *Proteins* 71: 684-694.
28. Warshel, A. and Levitt, M. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* 103: 227-249.
29. Zwier, M.C. and Chong, L.T. (2010). Reaching biological timescales with all-atom molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10: 745-752.