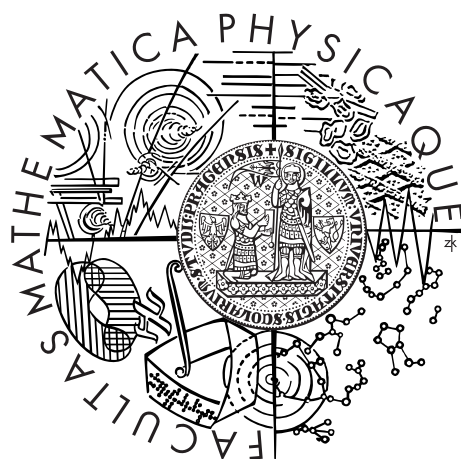


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Alexandra Kukharchuk

Interakce aminokyselin s fosfolipidovými monovrstvami

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Martina Roeselová, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2014

Tato práce byla převážně vypracována na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie Věd ČR, v. v. i., ve skupině výpočetní chemie prof. P. Jungwirtha, Ph.D. Ráda bych vyjádřila svou vděčnost za to, že jsem se mohla stát součástí této skupiny.

Chtěla bych velmi poděkovat vedoucí mé práce, RNDr. Martině Roeselové Ph.D., za její cenné profesionální rady a připomínky k této práci. Hodně si vážím její trpělivosti a času, který si mi věnovala. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Aleně Habartové za její pomoc přímo při provádění počítačových simulací a Mgr. Josefovi Melcrovi za užitečné připomínky.

Dále děkuji mé rodině za podporu v průběhu celého studia.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mému příteli Ottovi za podporu a sílu, kterou mi při psání dodával.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Název práce: Interakce aminokyselin s fosfolipidovými monovrstvami

Autor: Alexandra Kukharchuk

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Martina Roeselová Ph.D., ÚOCHB AV ČR, v. v. i.

Abstrakt: Tato práce se zabývá studiem interakcí mezi aminokyselinami s hydrofobním postranním řetězcem a fosfolipidovou monovrstvou na rozhraní voda-vzduch pomocí molekulové dynamiky. Byly provedeny tři simulace: a) simulace leucinu ve vodném roztoku, b) simulace povrchu vodného roztoku leucinu c) simulace roztoku leucinu s monovrstvou fosfolipidů DPPC na povrchu. Tyto simulace ukázaly, že leucin jeví povrchovou aktivitu a má tendenci tvořit klastry, a to přednostně na vodném povrchu. Rovněž bylo zjištěno, že leucin interkaluje mezi molekuly DPPC, což vede ke vzniku drobných pórů v DPPC monovrstvě. Výsledky simulace leucinu s DPPC monovrstvou byly porovnány s výsledky již dříve provedené obdobné simulace pro fenylalanin. Toto porovnání ukázalo, že molekuly fenylalaninu pronikají do DPPC monovrstvy více než molekuly leucinu, ačkoliv hloubka zanoření mezi molekuly DPPC je u obou aminokyselin prakticky stejná.

Klíčová slova: Langmuirovy monovrstvy, fosfolipidy, aminokyseliny.

Title: Interaction of aminoacids with phospholipid monolayers

Author: Alexandra Kukharchuk

Department: Department of Chemical Physics and Optics

Supervisor: RNDr. Martina Roeselová Ph.D., IOCB CAS

Abstract: The aim of the thesis is to get insight into the interactions between amino acids with a hydrophobic side-chain and a phospholipid monolayer on the water-air interface via molecular dynamics. There were three simulations performed: a) simulation of leucine in aqueous solution, b) simulation of leucine at the solution - air interface c) simulation of leucine solution with DPPC phospholipid monolayer at its surface. These simulations demonstrate that leucine shows surface activity and tendency to aggregate, particularly at the water surface. This tendency also remains in the presence of DPPC monolayer. In addition, intercalation of leucine between DPPC molecules was observed, leading to creation of small pores in the DPPC monolayer. The results of the simulation with leucine were compared with the results of a previously done analogous simulation with phenylalanine. The comparison showed that phenylalanine penetrates into the DPPC monolayer more than leucine, however the depth of penetration between DPPC molecules is almost the same for both amino acids.

Keywords: Langmuir monolayers, phospholipids, aminoacids.

Obsah

Úvod	2
1 Aminokyseliny a buněčné membrány	4
1.1 Aminokyseliny	4
1.2 Buněčné membrány	6
1.3 Langmuirovy monovrstvy	6
1.4 DPPC monovrstva a leucin	6
2 Molekulové simulace	8
2.1 Born-Oppenheimerova aproximace	8
2.2 Molekulová dynamika: klasická a kvantová	9
2.3 Molekulová dynamika: adiabatická a neadiabatická	9
2.4 Interakce mezi atomy	10
2.4.1 Metody výpočtu PES	10
2.4.2 Klasické interakční potenciály (force fields)	12
2.5 Algoritmy řešení klasických pohybových rovnic	13
2.6 Praktický průvodce MD simulací	14
2.6.1 Vstup a podmínky simulace	14
2.6.2 Výstup simulace a jeho analýza	16
2.7 Použitá metodologie	18
2.7.1 Parametry provedených simulací	18
2.7.2 Použitý software	18
3 Simulace Leu ve vodě a na rozhraní voda-vzduch	20
3.1 Topologie molekuly leucinu	20
3.2 Příprava počáteční konfigurace pro simulaci vnitřku a povrchu roztoku Leu	21
3.2.1 Simulace vnitřku roztoku.	22
3.2.2 Simulace povrchu roztoku.	22
3.3 Výsledky simulací	22
3.3.1 Simulace vnitřku roztoku	22
3.3.2 Simulace povrchu roztoku	23
4 Interakce Leu s monovrstvou DPPC na rozhraní voda-vzduch	26
4.1 Topologie molekuly DPPC	26
4.2 Příprava počáteční konfigurace	26
4.3 Výsledky simulací	27
5 Porovnání výsledků pro Leu a Phe	32
Závěr	35
Seznam použité literatury	36
Seznam použitých zkratk	39

Úvod

Zájem o pochopení a vysvětlení světa kolem sebe již odnepaměti inspiroval člověka k experimentování a přemýšlení. V současné době lze popisovat svět nejen empiricky a analyticky, ale také pomocí počítačových simulací. Experiment někdy může být proveditelný jen obtížně, v nejhorším případě jej nelze za daných podmínek uskutečnit. Mnoho reálných problémů navíc nemá analytické řešení. V takovýchto případech přichází na pomoc numerické řešení problému. Počítačová simulace dokáže uskutečnit experiment i tam, kde to není v možnostech měřicí aparatury, a získat řešení toho, co analyticky nedokážeme spočítat. Takovýto přístup má však i svou stinnou stránku – simulovaný děj se odehrává na obrazovce počítače a nemusí odpovídat realitě. Počítačová simulace je založená na teoretickém modelu, na jehož kvalitě závisí i kvalita výsledků simulace. Na druhé straně lze na základě dobře provedené simulaci dospět k novým závěrům, a tak umožnit navržení i nového teoretického modelu. Dá se proto říci, že počítačové simulace tvoří jakýsi „most mezi experimentem a teorií.“ [1]

Buňka je stavební jednotkou všech živých organismů. Její vnitřek je od okolí oddělen polopropustnou buněčnou membránou, která hraje bezprostřední roli při udržování vnitřního prostředí v buňce a transportních jevech mezi buňkou a okolním prostředím. Máme proto velký zájem o pochopení interakcí mezi buněčnou membránou a dalšími objekty, od jednoduchých molekul a iontů až po proteiny. Porozumění těmto interakcím má nejen význam v teoretickém výzkumu, ale také praktické aplikace v medicíně.

V rámci této práce jsme se zaměřili na interakce mezi aminokyselinami s hydrofobním postranním řetězcem a buněčnou membránou. Jako nástroj pro studium jsme použili počítačové simulace molekulové dynamiky. Konkrétně jsme se zabývali molekulou leucinu a jako zjednodušený model buněčné membrány posloužila Langmuirova monovrstva, tvořená fosfolipidy DPPC. Výsledky analýz provedených simulací pak umožnily porovnat chování leucinu s jinou aminokyselinou, fenylalaninem, pro kterou byly již dříve provedeny analogické simulace. Volba leucinu jako studované aminokyseliny vycházela z podobnosti ve struktuře leucinu a fenylalaninu. Obě aminokyseliny, kromě identické hydrofilní části, mají hydrofobní postranní řetězce podobné velikosti, které se však liší svým charakterem: zatímco leucin má rozvětvený alifatický postranní řetězec, fenylalanin má postranní řetězec tvořen aromatickým jádrem. Molekuly fenylalaninu jsou zajímavé především proto, že jeví unikátní schopnost samouspořádání, která prozatím nebyla plně objasněna. Cílem této práce tak bylo navázat na předchozí simulace fenylalaninu s DPPC monovrstvou [5] a pomocí porovnání s leucinem prohloubit naše znalosti o interakcích aminokyselin s fosfolipidy. Výsledky provedených simulací poslouží při interpretaci experimentů plánovaných na University of Colorado v Boulderu.

Práce se skládá z pěti kapitol. V první kapitole je uveden stručný popis chemické struktury aminokyselin a buněčných membrán. Druhá kapitola je věnována molekulovým simulacím založených na přístupu molekulové dynamiky. Tato kapitola je rozdělená na sedm podkapitol, z nichž prvních pět obsahuje teoretické základy: stručnou informaci o molekulové dynamice, jejích typech a postupech řešení a také o metodách výpočtu a parametrizace interakcí mezi atomy. Šestá

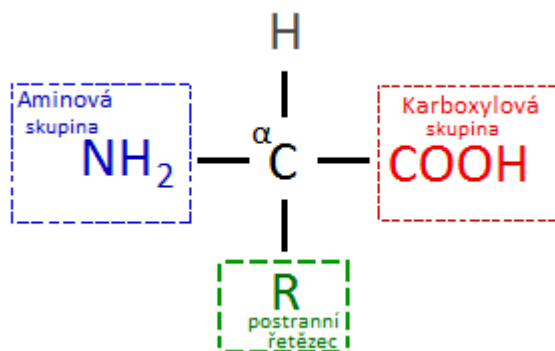
podkapitola pojednává o praktické stránce simulace: jejích vstupech, podmínkách, výstupních datech a jejich analýze. V závěrečné, sedmé části druhé kapitoly je uveden software použitý v této práci a také technické parametry provedených simulací. Třetí a čtvrtá kapitola jsou věnovány výsledkům simulací. Ve třetí kapitole jsou popsány simulace leucinu ve vodném roztoku a na jeho povrchu, čtvrtá kapitola popisuje simulace vodného roztoku leucinu s monovrstvou DPPC na povrchu. Poslední, pátá kapitola, je věnována porovnání výsledků simulací leucinu a fenylalaninu. Hlavní výsledky práce jsou pak stručně shrnuty v závěru.

1. Aminokyseliny a buněčné membrány

1.1 Aminokyseliny

Proteiny hrají důležitou roli ve všech živých organismech a plní řádu funkcí (regulační, stavební, transportní a jiné). Stavebními jednotkami proteinů jsou aminokyseliny vázané v proteinu do řetízku pomocí peptidových vazeb. Sekvence aminokyselin v proteinech je určena genetickým kódem.

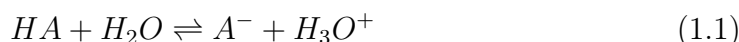
Aminokyseliny jsou organické sloučeniny současně obsahující dvě funkční skupiny: karboxylovou $-\text{COOH}$ skupinu a aminovou $-\text{NH}_2$ skupinu. Zbytek aminokyseliny, tzv. postranní řetězec (označuje se písmenem R), je pro každou aminokyselinu různý. Aminokyselina, v níž obě skupiny, aminová i karboxylová, jsou navázány na stejný atom uhlíku, se nazývá α -aminokyselina, a příslušný uhlík α -uhlík. V případě, že jsou obě skupiny od sebe odděleny dvěma uhlíky, hovoříme o β -aminokyselině, v případě třech uhlíků se jedná o γ -aminokyselinu atd. Na obr. 1.1 je znázorněna struktura proteinogenní¹ α -aminokyseliny. Podle směru stočení roviny polarizace polarizovaného světla chirálním uhlíkem se rozlišují L- a D-aminokyseliny. Proteiny jsou tvořeny α -L-aminokyselinami [9].



Obrázek 1.1: Struktura α -aminokyseliny

Díky přítomnosti kyselé i zásadité funkční skupiny je aminokyselina amfoterní látkou, tj. může se chovat jako kyselina i jako zásada. Toto chování popisuje disociační konstanta dané funkční skupiny. Disociační konstanta (označuje se K) je rovnovážná konstanta, příslušné acidobazické rovnováhy a je definována pomocí následujících vztahů (hranaté závorky značí koncentraci dané látky) [8].

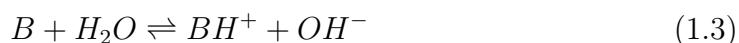
Pro kyselinu (A):



$$K_A = \frac{[\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]} \quad (1.2)$$

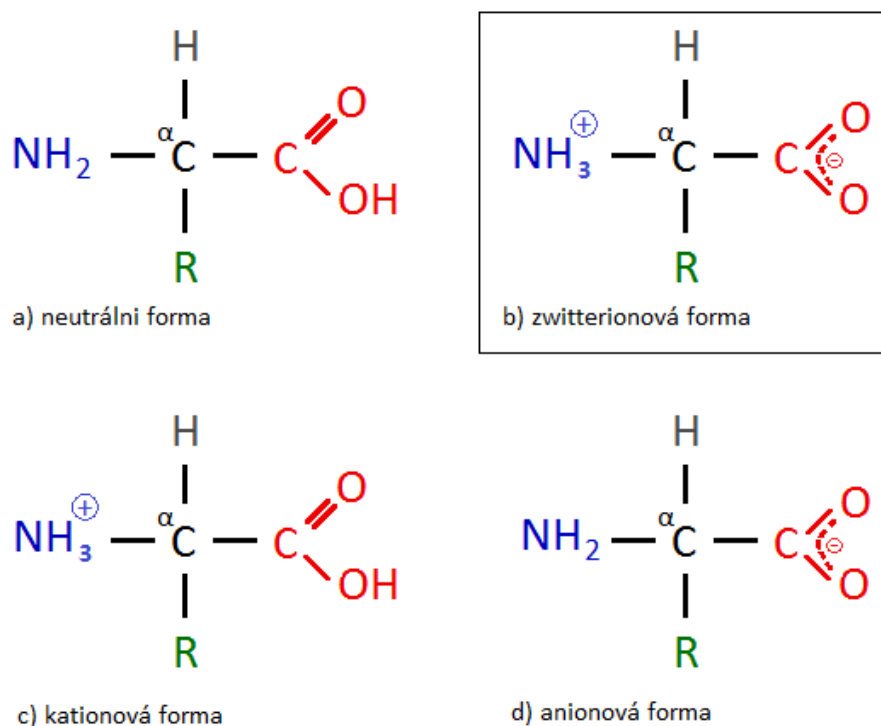
¹proteinogenní je taková aminokyselina, která může tvořit protein

Pro zásadu (B):



$$K_B = \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]} \quad (1.4)$$

V tabulkách se uvádí hodnoty pK , definované vztahem: $pK = -\log_{10}K$. Disociační konstanta je mírou kyselosti/zásaditosti látek (čím je hodnota K vyšší, tím je kyselina nebo zásada silnější). Průměrná hodnota pK karboxylové skupiny u aminokyselin je přibližně $pK_{COOH} = 2,2$, aminoskupiny $pK_{NH_2} = 9,4$. Přítomnost dvou titrovatelných skupin (karboxylové a aminové) tak dovolu je aminokyselině se ve vodném roztoku vyskytovat ve třech různých formách v závislosti na pH prostředí. Při nízké hodnotě pH se aminokyselina nachází v kationové formě (dochází k protonaci aminoskupiny), viz obr. 1.2 c, při vysokých hodnotách pH prostředí má aminokyselina naopak anionovou formu (dochází k odštěpení protonu z karboxylové skupiny), viz obr. 1.2 d. Stav, při kterém aminokyselina obsahuje pozitivní i negativní náboj stejné velikosti (a tudíž se navenek jeví jako neutrální) se nazývá zwitterionovou formou, viz 1.2 b. Kladný náboj je soustředěn na aminoskupině NH_3^+ , která proton přijala, a záporný náboj na karboxylové skupině COO^- , u které došlo k odštěpení protonu. V takové formě se aminokyseliny vyskytují při běžných hodnotách pH vnitřních prostředí organismů, v širokém intervalu $pK_{COOH} < pH < pK_{NH_2}$.



Obrázek 1.2: Formy α -aminokyselin: a) neutrální forma, b) zwitterionová forma, c) kationová forma, d) anionová forma

1.2 Buněčné membrány

Buněčné membrány jsou součástí všech živých organismů. Jsou tvořeny dvouvrstvou lipidů, do které jsou integrovány bílkoviny. Hlavní součástí lipidové dvouvrstvy jsou fosfolipidy obsahující hydrofilní a hydrofobní část, což podmiňuje vzájemné natočení obou vrstev fosfolipidů v buněčné membráně hydrofilními částmi směrem ven do okolního vodného prostředí a hydrofobními částmi směrem k sobě, dovnitř membrány. Membrána tak představuje bariéru, která od sebe odděluje dvě různá prostředí: například cytoplasmatická buněčná membrána odděluje vnitřní část buňky (cytoplasmu) od vnějšího prostředí, hraje proto důležitou roli při transportu látek z a do buňky.

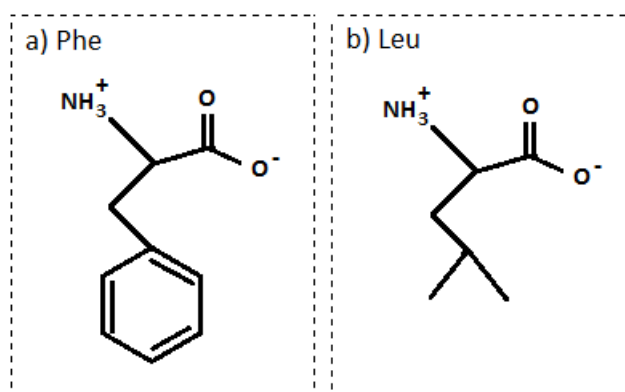
1.3 Langmuirovy monovrstvy

Pro studium procesů v buněčných membránách se kromě fosfolipidových dvouvrstev používají často také monovrstvy fosfolipidů na povrchu vody či vodného roztoku. Tyto tzv. Langmuirovy monovrstvy umožňují kontrolovat uspořádání fosfolipidů v závislosti na míře stlačení monovrstvy a studovat interakci fosfolipidů s nejrůznějšími látkami.

1.4 DPPC monovrstva a leucin

Tato práce je zaměřená na zkoumání interakce leucinu s fosfolipidy. Jako zjednodušený model buněčné membrány byla v této práci zvolena fosfolipidová monovrstva, složená z molekul DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine).

Leucin (zkráceně Leu) je základní proteinogenní aminokyselina. Mezi její hlavní biologické funkce patří účast při stavbě a vývoji svalových tkání (slouží jako zdroj energie pro svaly na buněčné úrovni, a také chrání svaly proti ztratě svaloviny). Leucin patří k esenciálním aminokyselinám, tj. není syntetizován lidským tělem, a proto musí být přijímán v potravě.



Obrázek 1.3: a) Struktura molekuly Phe ve zwitterionové formě, b) Struktura molekuly Leu ve zwitterionové formě

Jak je vidět z obr. 1.3, struktura Leu (podrobněji v kapitole 3.1) je podobná struktuře jiné proteinogenní aminokyseliny - fenylalaninu (zkráceně Phe). Tato podobnost byla důvodem pro volbu Leu pro simulace provedené v této práci. Molekula Phe je unikátní z hlediska její schopnosti k samouspořádání (angl. self-assembly). Bylo prokázáno, že peptidy, tvořené Phe, jsou schopné tvořit uspořádané nanostruktury ve vodném roztoku [13]. Kromě toho hrají molekuly Phe klíčovou roli při tvorbě amyloidních struktur [12].

Obě aminokyseliny, Leu i Phe, mají identickou hydrofilní část. Leu, na rozdíl od Phe, však neobsahuje benzenový kruh, ale hydrofobní část molekuly je tvořena rozvětveným alifatickým řetězcem. Porovnání obou aminokyselin tak může vést k hlubšímu pochopení jejich interakcí v buněčných membránech a případnému objasnění unikátnosti chování molekul Phe.

2. Molekulové simulace

V oblasti počítačových simulací molekulových systémů se používají dva hlavní přístupy: Monte Carlo a molekulová dynamika. Oba lze využít k získání statisticko-termodynamických informací o vlastnostech systému v rovnováze. Molekulová dynamika, která byla použita v této práci, navíc umožňuje také řešení dynamických problémů (zkoumání vývoje systému v čase).

2.1 Born-Oppenheimerova aproximace

Důležitým základem pro popis dynamiky (časového vývoje) molekulového systému je Born-Oppenheimerova aproximace (zkráceně B-O), která je odvozena z adiabatické aproximace. Podstata adiabatické aproximace spočívá v separaci pohybu elektronů a jader. Hmotnost elektronů je o několik řádů menší než hmotnost jader, dá se proto předpokládat, že rychlosti elektronů jsou výrazně větší než rychlosti jader, a že se každé konfigurační změně jader elektrony přizpůsobí okamžitě. Potom platí, že elektrony konají pohyb v poli pevně umístěných jader. Je ale zapotřebí vzít v úvahu i to, že elektrony jsou záporně nabitě částice a vytváří nábojové pole, na které jádra pomalu reagují. S ohledem na tyto úvahy lze separovat vlnovou funkci $\psi(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_j)$, popisující systém jader a elektronů, na dvě vlnové funkce: na elektronovou $\chi_{\mathbf{R}_j}(\mathbf{r}_i)$ a jadernou $\varphi(\mathbf{R}_j)$, kde \mathbf{r}_i a \mathbf{R}_j jsou příslušné polohové vektory pro elektrony a jádra:

$$\psi(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_j) = \chi_{\mathbf{R}_j}(\mathbf{r}_i)\varphi(\mathbf{R}_j) \quad (2.1)$$

Systém n elektronů a N jader popsáný vlnovou funkcí $\psi(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_j)$ splňuje nečasovou Schrödingerovu rovnici (zde a dále zanedbáváme relativistické efekty), která má po rozepsání operátoru kinetické energie, obsaženého v hamiltoniánu, tvar:

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2m} \sum_{i=1}^n \Delta_i - \sum_{j=1}^N \frac{\hbar^2}{2M_j} \Delta_j + V \right) \psi(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_j) = E\psi(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_j) \quad (2.2)$$

Hmotnost elektronu je označena m , hmotnosti jader M_j . Potenciál V zahrnuje interakci typu elektron-elektron, jádro-jádro, elektron-jádro a jejich interakci s vnějším polem.

Elektronová vlnová funkce $\chi_{\mathbf{R}_j}(\mathbf{r}_i)$ splňuje nečasovou Schrödingerovu rovnici pro pevné polohy jader \mathbf{R}_j :

$$\hat{H}_e \chi_{\mathbf{R}_j}(\mathbf{r}_i) = E_e(\mathbf{R}_j) \chi_{\mathbf{R}_j}(\mathbf{r}_i) \quad (2.3)$$

kde \hat{H}_e je hamiltonián působící na elektronovou vlnovou funkci. Rovnice 2.3 představuje rovnici pro vlastní stavy a energie elektronů při pevné poloze jader. Energie $E_e(\mathbf{R}_j)$ zahrnuje jak elektrostatickou interakci jader, tak vliv elektronů na jádra. Lze ji proto považovat za efektivní interakční energii jader závisící na jejich konfiguraci. Mnohadimenzionální funkce $E_e(\mathbf{R}_j)$ se označuje termínem hyperplocha potenciální energie (angl. Potential Energy Surface, PES).

Matematickou formulací adiabatické aproximace je stacionární Schrödingerova rovnice pro vlnovou funkci jader, která se získá tak, že se v rovnici 2.2 využije separace vlnové funkce 2.1. Za předpokladu malé změny elektronové vlnové funkce v závislosti na změně polohy jader lze rovnici 2.2 zredukovat na tvar, který představuje Bornovu-Oppenheimerovu aproximaci:

$$(T_{\text{jádra}} + E_e(\mathbf{R}_j)) \varphi(\mathbf{R}_j) = E_{\text{tot}} \varphi(\mathbf{R}_j) \quad (2.4)$$

kde $T_{\text{jádra}}$ je operátor kinetické energie pro jádra, E_{tot} představuje celkovou energii jader.

2.2 Molekulová dynamika: klasická a kvantová

Molekulová dynamika (běžně se používá zkratka MD) představuje počítačovou simulaci časového vývoje jader soustavy N atomů. Podle přístupu k popisu pohybu jader atomů dělíme MD na klasickou a kvantovou.

V rámci kvantového popisu (při platnosti B-O aproximace) je informace o systému obsažena ve vlnové funkci $\varphi(\mathbf{R}_j, t)$ závislé na poloze jader a na čase. Časový vývoj systému získáme řešením nestacionární Schrödingerovy rovnice:

$$i\hbar \frac{\partial \varphi(\mathbf{R}_j, t)}{\partial t} = \left[-\sum_{i=1}^N \frac{\hbar^2}{2M_j} \Delta_j + E_e(\mathbf{R}_j) \right] \varphi(\mathbf{R}_j, t) \quad (2.5)$$

kde M_j označuje hmotnosti jader, $E_e(\mathbf{R}_j)$ je efektivní interakční potenciál jader (viz rovnice 2.3). Nejčastější případy, kdy nemůžeme kvantové jevy zanedbat, jsou v zásadě dva: situace, kdy se atomy inherentně chovají kvantově (např. tunelový jev) a interakce s kvantovými objekty (např. interakce s elektromagnetickým zářením - fotoelektrický jev).

Vzhledem k vysoké hmotnosti jader je ale ve většině případů k popisu jejich dynamiky dostatečný klasický přístup, založený na řešení klasických pohybových rovnic, např. Newtonových:

$$M_k \frac{d^2 \mathbf{R}_k}{dt^2} = -\nabla_{\mathbf{R}_k} E_e(\mathbf{R}_j), \quad k = 1, \dots, N \quad (2.6)$$

kde N je počet jader (používáme již výše zavedené označení).

Jak vyplývá z rovnic 2.5 a 2.6, v obou případech, klasickém i kvantovém, je pro popis dynamiky systému klíčová znalost efektivního interakčního potenciálu jader $E_e(\mathbf{R}_j)$, tj. hyperplochy potenciální energie, viz níže kap. 2.4.

2.3 Molekulová dynamika: adiabatická a neadiabatická

Standardní (adiabatická) MD je založena na předpokladu splnění Born-Oppenheimerovy aproximace (rovnice 2.4), tj. na předpokladu separace pohybu jader a elektronů. Jádra se pohybují po jednom povrchu potenciální energie odpovídajícím jednomu (nejčastěji základnímu) elektronovému stavu systému. Tato představa však pro některé systémy selhává, není například použitelná pro případ, kdy jsou elektronové hladiny systému velmi blízko u sebe.

Není-li splněná B-O aproximace, mluvíme o neadiabatické MD. V rámci klasického popisu je její hlavní myšlenkou 'přeskakování' systému mezi různými potenciálovými povrchy, které přísluší různým elektronovým stavům (tzv. 'surface hopping').

2.4 Interakce mezi atomy

Pro simulaci molekulové dynamiky může být potenciálový povrch zkonstruován předem, nebo může být počítán za chodu simulace (angl. 'on the fly') tak, že je pro každou konfiguraci atomů v každém kroku vyřešena elektronová Schrödingerova rovnice 2.3.

2.4.1 Metody výpočtu PES

Pro popis dynamiky systému N atomů je potřeba vědět, jak mezi sebou atomy, resp. jádra, interagují, jaké síly mezi nimi působí. K tomu je v principu třeba znát $3N$ -dimenzionální hyperplochu potenciální energie:

$$V(\mathbf{R}_j) \equiv E_e(\mathbf{R}_j) \quad (2.7)$$

kde $E_e(\mathbf{R}_j)$ je řešením 2.3.

Konstrukce povrchu potenciální energie pro systém mnoha atomů je komplikovaným úkolem a pro jeho řešení existují různé metody: neempirické (*ab initio*), semiempirické a empirické. *Ab initio* metody jsou metody řešení stacionární elektronové Schrödingerovy rovnice pro pevné polohy jader (rovnice 2.3) bez použití empirických dat.

- Hartree-Fock

Hlavní myšlenkou Hartree-Fockovy metody je zavedení tzv. self-konzistentního pole (angl. self-consistent field), ve kterém se daný elektron pohybuje a které je tvořeno ostatními elektrony. Takovým způsobem se mnohačasticový problém řešení Schrödingerovy rovnice redukuje na jednočasticový. Na rozdíl od původní Hartreeho metody, kde vlnová funkce byla navržena ve tvaru součinu jednoelektronových vlnových funkcí, v Hartree-Fockově metodě se uvažuje vlnová funkce ve tvaru Slaterova determinantu, což umožňuje respektování antisymetrie vlnové funkce.

- post-Hartree-Fock

Jako post-Hartree-Fockovy metody se označují *ab initio* metody, ve kterých se započítává dynamická elektronová korelace způsobená elektrostatickou repulzí elektronů. Do této kategorie patří, například metoda vázaných klastrů a konfigurační interakce.

- Teorie hustotního funkcionálu (angl. Density Functional Theory, DFT)

Hlavní myšlenka DFT spočívá v nahrazení víceelektronové vlnové funkce elektronovou hustotou (stále se předpokládá splnění B-O aproximace). Počet parametrů se redukuje z $3n$ (kde n je počet elektronů) na 3 prostorové souřadnice.

Základem DFT je Hohenbergův-Kohnův teorém, který říká, že "vlnová funkce ψ nedegenerovaného základního stavu mnohaelektronového systému je jednoznačným funkcionálem jednoelektronové hustoty $\rho(r)$ " [6], tj.

$$\psi = \psi[\rho] \quad (2.8)$$

Jednoelektronová hustota je určena vztahem:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{j=1}^n |\psi_j(\mathbf{r})|^2, \quad (2.9)$$

kde $\psi_j(\mathbf{r})$ je prostorové části jednoelektronových vlnových funkcí [6].

Celková energie systému je dána vztahem:

$$E = \langle \psi | H | \psi \rangle, \quad (2.10)$$

kde H je hamiltonián systému elektronů, obsahující operátor kinetické energie T , operátor elektrostatické repulze elektronů U a jednočásticový vnější potenciál V :

$$H = T + U + V \quad (2.11)$$

Vzhledem k tomu, že vlnová funkce základního stavu je jednoznačným funkcionálem jednoelektronové hustoty (2.8), je jednoznačným funkcionálem jednoelektronové hustoty i energie E :

$$E[\rho] = \langle \psi[\rho] | H | \psi[\rho] \rangle \quad (2.12)$$

S využitím toho, že Hohenbergův-Kohnův teorém platí i pro navzájem neinteragující elektrony, lze dospět k následujícímu výrazu pro celkovou energii základního stavu:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = \int T_s[\rho(\mathbf{r})] d\mathbf{r} + \int v(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \quad (2.13)$$

$$+ \frac{e^2}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}' + E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$$

První člen výrazu 2.13, funkcionál kinetické energie, je stejný jako pro neinteragující elektrony, druhý člen je vnější potenciál a třetí člen popisuje coulombovskou interakci elektronů. Poslední člen rovnice 2.13 vystihuje výměnné-korelační jevy. Tento člen však nelze analyticky spočítat, a proto se používá jeho aproximace.

Variáční úloha hledání minima funkcionálu $E[\rho]$ může být řešena pomocí Kohn-Shamových rovnic, které se řeší iterakční metodou vedoucí k selfkonzistenci a které lze zapsat v následujícím tvaru:

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m}\Delta + v_{eff}(\mathbf{r})\right]\psi_j(\mathbf{r}) = \epsilon_j\psi_j(\mathbf{r}) \quad (2.14)$$

kde v_{eff} je jednočásticový potenciál rovný:

$$v_{eff}(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + e^2 \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + V_{xc}(\mathbf{r}) \quad (2.15)$$

2.4.2 Klasické interakční potenciály (force fields)

Velké molekulové systémy lze v řadě případů úspěšně modelovat, aniž by bylo nutné provádět kvantově-mechanické výpočty. Potenciální energie systému atomů se v takovém případě vyjadřuje pomocí interakčních potenciálů, tzv. silových polí (angl. force fields), které vycházejí z klasické představy atomů jako kuliček. Interakce mezi atomy je popsána sadou matematických funkcí s parametry, jejichž hodnoty se získávají z experimentu nebo z kvantově-chemických výpočtů.

Síly působící na jednotlivé atomy (jádra) při klasickém popisu pak lze získat derivováním:

$$\mathbf{F}_{\mathbf{R}_k} = -\nabla_{\mathbf{R}_k} V(\mathbf{R}_j), \quad k = 1, \dots, N \quad (2.16)$$

Interakce mezi jednotlivými atomy ve zkoumaném systému lze rozdělit do dvou skupin:

- vazebné interakce mezi atomy uvnitř jedné molekuly, tj. mezi atomy spojenými chemickými vazbami
- nevazebné interakce mezi atomy různých molekul nebo mezi "vzdálenějšími" atomy téže molekuly, které nejsou spojeny chemickou vazbou.

Typický tvar jednoduchého interakčního potenciálu je popsán následujícím výrazem [1]:

$$V = \sum_{vazby} k_i(r_i - r_0)^2 + \sum_{\text{úhly}} k_i(\alpha_i - \alpha_i^0)^2 + \sum_{dihedrálly} v_i(1 + \cos(n_i\delta_i - \delta_i^0)) + \quad (2.17)$$

$$+ \sum_{i < j} 4\varepsilon_{ij} \left((\sigma_{ij}/r_{ij})^{12} - 2(\sigma_{ij}/r_{ij})^6 \right) + \sum_{i < j} \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{e_i e_j}{r_{ij}}$$

Vazebné interakce jsou popsány prvními třemi členy výrazu 2.17. První člen představuje potenciál chemických vazeb, druhý potenciál vazebných úhlů. Oba členy jsou popsány pomocí harmonického potenciálu, kde k je silová konstanta (tuhost vazby), r je vzdálenost atomů, r_0 je jejich rovnovážná vzdálenost, α je úhel mezi atomy, α^0 je jeho rovnovážná hodnota. Třetí člen, popsáný pomocí kosinové funkce, představuje periodický potenciál pro dihedrální úhly (δ označuje úhel rotace, δ^0 je fázový posun, n určuje počet maxim a minim na intervalu od 0 do 2π). Čtvrtý a pátý člen popisují nevazebné interakce.

Lennard-Jonesův potenciál (dále jen L-J potenciál), čtvrtý člen rovnice 2.17, je model vzájemné párové disperzní interakce mezi částicemi v závislosti na vzdálenosti mezi nimi. Vzdálenost mezi částicemi i a j je značena r_{ij} , σ představuje vzdálenost, ve které interakční potenciál nabývá minima, ε je hloubka potenciálového minima. První člen ve vzorci pro L-J potenciál odpovídá za vzájemné odpuzování atomů na malých vzdálenostech, druhý vystihuje jejich přitažlivou interakci. Poslední, pátý člen rovnice 2.17, popisuje elektrostatickou interakci podle Coulombova zákona.

Konkrétní tvar interakčního potenciálu se může v jednotlivých případech lišit, ale obecný tvar 2.17 vystihuje základní předpoklady, se kterými empirické potenciály pracují. Atomy jsou reprezentovány kuličkami s bodovým nábojem v jejich centru, které jsou navzájem spojeny pružnými vazbami. Zanedbávají se vícečásticové ne vazebné interakce, tj. interakce mezi třemi a více atomy (sčítá se pouze přes párové interakce) [14]. Pro přesnější popis interakčního potenciálu lze provést řadu vylepšení [1], např.:

- první a druhý členy rovnice 2.17 nahradit Morseho potenciálem vystihujícím anharmonicitu prodlužování a zkracování vazby nebo zvětšení/zmenšení vazebného úhlu [2]:

$$V_{Morse} = D_e \left[1 - e^{-\beta(r-r_0)} \right]^2 \quad (2.18)$$

- přidat neharmonické členy do výrazu popisujícího torzní úhly
- pro přesnější popis repulze mezi atomy nahradit L-J potenciál potenciálem Buckinghamovým ve tvaru:

$$V_{Buckingham} = D(e^{-ar} - b/r^6) \quad (2.19)$$

2.5 Algoritmy řešení klasických pohybových rovnic

Pro popis časového vývoje systému se v klasické molekulové dynamice nejčastěji využívají Newtonovy pohybové rovnice (2.6). Ty představují soustavu obyčejných diferenciálních rovnic 2. řádu, která se pro mnohačásticové systémy řeší numericky. Nejpoužívanější algoritmy, tzv. propágatory, jsou založené na metodě konečných diferencí (řešení v čase $t + \delta t$ se získá z řešení v čase t , příp. časech předchozích).

Často používanou metodou v praxi je Verletova metoda [20], vycházející z Taylorova rozvoje souřadnic (do druhého řádu) a využívající symetrizace v čase. Pomocí Taylorova rozvoje v čase směrem dopředu nebo dozadu dostaneme následující rovnice:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (2.20)$$

$$\mathbf{r}(t - \delta t) = \mathbf{r}(t) - \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (2.21)$$

Vektory \mathbf{r} , \mathbf{v} značí polohový vektor a rychlost, \mathbf{a} je zrychlení rovné \mathbf{F}/m . Sečtením rovnic 2.20 a 2.21 pak dostáváme Verletův propagátor:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (2.22)$$

Odečtením rovnic 2.20 a 2.21 se získá rychlost v čase t :

$$\mathbf{v}(t) = \frac{\mathbf{r}(t + \delta t) - \mathbf{r}(t - \delta t)}{2\delta t} \quad (2.23)$$

Tato metoda se hodí pro simulace velkých systémů, jelikož i při použití delšího časového kroku (typicky v řádu jednotek fs) se chová jako stabilní.

Jednou z modifikací Verletovy metody je tzv. *leap-frog* metoda [19], která implicitně zahrnuje rychlosti. Hodnoty nové polohy a rychlosti se počítají ze vztahů:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) \quad (2.24)$$

$$\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) = \mathbf{v}(t - \frac{1}{2}\delta t) + \delta t \mathbf{a}(t) \quad (2.25)$$

Jinou metodou propagace v čase je metoda typu prediktor-korektor zavedená Gearem. Tato metoda spočívá v odhadnutí řešení (nových souřadnic) v prvním kroku a následně opravě zrychlení, které se pak použije v následujícím kroku ke zpřesnění řešení (hodnot nových souřadnic). Tato třída algoritmů se zvláště hodí pro výpočet s velmi krátkým časovým krokem, kdy od simulace vyžadujeme vysokou přesnost.

2.6 Praktický průvodce MD simulací

Tato část pojednává podrobněji o klasické molekulové dynamice, přesněji o tom, jaké systémy a za jakých podmínek lze simulovat a co je výstupem simulace. Dále jsou zmíněny některé metody analýzy výsledků a také omezení MD simulací.

2.6.1 Vstup a podmínky simulace

Pomocí MD lze v současnosti simulovat systémy obsahující řádově až $10^5 - 10^6$ atomů, což v případě izolovaného systému představuje makromolekuly či molekulové klastry o rozměrech kolem $1\mu m$, není však možné kvůli komplikovanosti potenciálu a s tím spojené výpočetní náročnosti přímo simulovat makroskopické systémy, např. roztoky, obsahující řádově 10^{23} atomů. Pro překonání tohoto problému se zavádí periodické okrajové podmínky (angl. PBC - periodic boundary conditions). Hlavní myšlenka spočívá v tom, že si zvolíme konečný atomární systém a "uzavřeme" ho do simulačního boxu - centrální krychle¹. Tuto krychli obklopíme ze všech stran do nekonečna jejími replikami, identickými krychlemi. Pro zachování stálého objemu (počtu částic) v uvažované krychli musí platit pravidlo, že dojde-li k úniku částice z krychle, musí z opačné strany vstoupit identická částice. Dalším předpokladem je konvence nejbližšího obrazu [1], podle které se uvažují interakce dané částice jenom s nejbližšími neekvivalentními částicemi.

¹Jsou možné i jiné tvary boxu.

Pro krátkodosahové interakce se používá další aproximace - zavedení tzv. *cutoff* vzdálenosti r_c , kdy se interakce na větších vzdálenostech než r_c zanedbávají. Je zřejmé, že tato aproximace není vhodná pro interakce dlouhého dosahu. Pro výpočet interakce dlouhého dosahu (elektrostatická interakce) se používá Ewaldova sumace. Podstatou této metody je rozložení celkového Coulombovského potenciálu na součet krátkodosahových interakcí, který konverguje v reálném prostoru, a součet interakcí dlouhého dosahu, konvergující ve Fourierově prostoru.

Vstupem simulace jsou počáteční souřadnice a rychlosti všech atomů systému a také parametry simulace. Mezi parametry simulace patří celková délka simulace, časový krok, interakční *cutoff*, termostat/barostat (odpovídají za kontrolu teploty/tlaku, viz níže) a jiné.

V závislosti na interakci systému s okolím se rozlišují tři typy statistických souborů: mikrokanonický, kanonický a grandkanonický [7]. Simulace lze provádět za podmínek odpovídajících těmto statistickým souborům. Simulace se pak označují písmeny odpovídajícími parametrům, které se v systému zachovávají (N pro počet částic, V pro objem, E energie, T teplota, P tlak atd.).

- Mikrokanonický soubor.

V tomto souboru si systém nevyměňuje ani energii, ani částice s okolím. Z Newtonových pohybových rovnic plyne zachování celkové energie systému. Periodické okrajové podmínky zaručují zachování celkového objemu. Simulace se za těchto podmínek označuje NVE.

- Kanonický soubor.

V tomto souboru dochází k výměně energie mezi systémem a okolím. Typickým příkladem je výměna tepelné nebo mechanické energie s 'lázní'. V závislosti na podmínkách rozlišujeme Helmholtzův kanonický soubor (NVT) a Gibbsův kanonický soubor (NPT). V Newtonových pohybových rovnicích se sice nevyskytují ani tlak, ani teplota, nicméně existují různé metody, jak hodnoty těchto parametrů udržovat během simulace konstantní. Níže jsou zmíněny některé z těchto metod.

1. Kontrola teploty

Teplota je bezprostředně spojená s kinetickou energií ekvipartičním teorémem²:

$$\frac{3}{2}Nk_B T = \left\langle \sum_i \frac{1}{2}mv_i^2 \right\rangle, \quad (2.26)$$

kde N je počet částic systému, k_B je Boltzmannova konstanta, T je teplota, m hmotnost a v_i je rychlost i -té částice.

To znamená, že v simulaci lze kontrolovat teplotu přes kontrolu kinetické energie částic. V rovnosti 2.26 vystupuje však průměrná hodnota kinetické energie, z čehož plyne, že během simulace teplota může fluktuovat kolem určené průměrné hodnoty.

²Ekipartiční teorém říká, že ve stavu tepelné rovnováhy je energie rovnoměrně rozdělena mezi jednotlivé stupně volnosti.

Jednou z možností, jak teplotu nastavit, je kontrolování rychlosti částic. Jednou z možností je, že s určitým časovým krokem se velikost rychlostí přeškáluje na hodnoty odpovídající Maxwell-Boltzmannovu rozdělení pro danou teplotu. Při zahrnutí stochastického členu tato metoda zaručuje splnění podmínek kanonického souboru. Příkladem je [15]. Jinou možností je zahrnout teplotu do pohybových rovnic jako další stupeň volnosti (využívá se přechod k Hamiltonovu nebo Lagrangeovu formalismu).

2. Kontrola tlaku

Při kontrole tlaku se postupuje analogicky jako při kontrole teploty, kontrolovanou veličinou je však v tomto případě objem V . Opět existuje několik různých přístupů, k nejběžněji používaným barostatům patří Parrinello-Rahmanův [27], Nosé-Hooveův [26] a Berendsenův barostat.

V simulaci typu NPT (izotermicko-izobarický soubor) se současně udržuje konstantní tlak a teplota, tj. v průběhu simulace dochází ke změnám objemu simulačního boxu i škálování rychlostí částic. V simulaci typu NVT zůstává objem konstantní a pouze se škálují rychlosti.

- Grandkanonický soubor

V tomto souboru dochází k výměně jak energie, tak částic s okolím. V simulaci je třeba zavést dodatečný algoritmus umožňující vkládání a odebírání částic.

2.6.2 Výstup simulace a jeho analýza

Výstupem provedené simulace jsou hodnoty souřadnic a rychlostí pro každou částici systému v každém časovém kroku. K dispozici jsou tedy také hodnoty kinetické a potenciální energie, případně dalších veličin v každém časovém kroku³.

Důležitým nástrojem analýzy výstupu simulace jsou tzv. konvergenční profily. Konvergenční profil určité fyzikální veličiny představuje graf její časové závislosti. Konvergenční profily pomáhají určit, zda jsou výsledky již ustálené, využívají se ke sledování ekvilibrace a stability podmínek během simulace. Na začátku simulace totiž systém většinou není ve svém optimálním stavu a k dosažení rovnovážného stavu je třeba určitý čas. Monitoring konvergenčních profilů se vztahuje především na kontrolu teploty, celkové energie atd. Poté lze přistoupit k samotnému zpracování výsledků simulace - vizualizaci a analýze dat.

- Vizualizace

Vizualizace je důležitou součástí analýzy výsledků. Specializovaný software umožňuje prohlédnout vývoj systému v čase a podívat se z různých úhlů pohledu na prostorové rozložení molekul.

- Analýza dat

V závislosti na typu simulace a jejích cílech lze provést různé druhy analýzy výstupních dat.

³Výstupní data se většinou ukládají s delší periodou než je časový krok vlastní simulace.

Široce rozšířenými jsou např. analýza hustotního profilu (angl. density profile), který udává prostorové rozložení hustoty částic kolmo na daný směr, nebo radiální distribuční funkce (RDF), která udává pravděpodobnost nalezení dvou částic ve vzdálenosti r . RDF vypočteme podle vztahu

$$g(r) = \frac{1}{4\pi r^2 N^2} \left\langle \sum_i \sum_{j \neq i} \delta(r - r_{ij}) \right\rangle \quad (2.27)$$

kde $1/4\pi r^2 N^2$ je normalizační faktor, N je počet částic a r_{ij} vzdálenost mezi dvojicí částic i a j . Lomené závorky označují průměrování přes čas pro danou trajektorii.

2.7 Použitá metodologie

2.7.1 Parametry provedených simulací

V rámci této práce byly provedeny následující simulace:

- Simulace leucinu ve vodě
- Simulace leucinu na rozhraní voda-vzduch
- Simulace leucinu ve vodě s monovrstvou DPPC na rozhraní voda-vzduch

Pro řešení Newtonových pohybových rovnic 2.6 byl zvolen leap-frog algoritmus [19] s časovým krokem 2 fs. Zápis výstupních dat (energie a souřadnice atomů) se prováděl s časovým krokem 2 ps. Byly použity periodické okrajové podmínky (PBC) s *cutoff* vzdáleností 1 nm pro krátkodosahové interakce. Pro výpočet elektrostatické interakce byla použita metoda SPME (smooth particle-mesh Ewald) [25]. Délka všech vazeb byla během simulace udržována konstantní pomocí metody LINCS [24]. Teplota byla pro simulovaný systém nastavena na 310 K a byla kontrolována pomocí Nosé-Hooverova termostatu [26] s časovou konstantou 1 ps. Simulace leucinu ve vodě, tj. simulace vnitřku roztoku, byla provedená v izobaricko-izotermickém (NPT) souboru, tlak (nastaven na 1.01 bar) byl kontrolován pomocí Parrinello-Rahmanova barostatu [27] s časovou konstantou 2 ps. Simulace systémů s rozhraním mezi kapalinou a plynnou fází byly provedeny v izochoricko-izotermickém (NVT) souboru.

2.7.2 Použitý software

- GROMACS 4.6.3

GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations) [31] je nekomerční softwarový balík určený pro molekulovou dynamiku. Byl původně vyvinut skupinou pod vedením G. Berendsena z oddělení biofyzikální chemie Groningenské univerzity. Primárně je zaměřen na simulaci proteinů, lipidů a aminokyselin, lze jej ale použít i pro simulace řady dalších systémů.

Důležitými typy GROMACS souborů jsou [32]:

- conf.gro

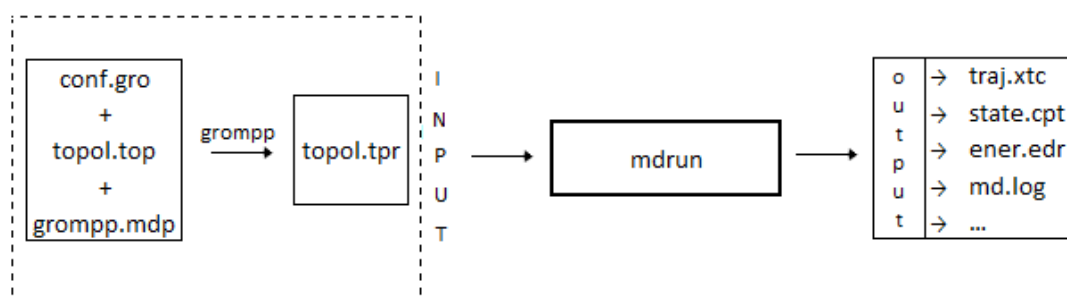
Konfigurační soubor, obsahuje souřadnice všech atomů systému a v případě PBC také popis simulačního boxu. Může obsahovat také rychlosti atomů.

- topol.top

Topologie systému, tj. soubor, který obsahuje definice typů jednotlivých atomů, definice vazeb mezi nimi a popis jejich vzájemných interakcí (volba interakčního potenciálu a jeho parametrů). Při práci s větším systémem je přehlednější ukládat data pro jednotlivé molekuly zvlášť do .itp souborů, které potom lze "vnořit" do celkové topologie (souboru topol.top).

- grompp.mdp
Soubor řídící simulaci. Obsahuje parametry jako časový krok simulace, její celkovou délku, interakční *cutoff*, podmínky simulace (kontrola teploty, tlaku..) atd.

Zkombinováním výše uvedených souborů pomocí programu grompp⁴ získáme soubor topol.tpr - vstupní soubor pro vlastní simulaci, která se spustí příkazem mdrun. Jejím výstupem je několik souborů (traj.xtc, state.cpt, ener.edr atd.), které obsahují souřadnice, příp. rychlosti, složky energie a další veličiny pro jednotlivé časové kroky simulace. Výše popsaná struktura výpočtu je shrnuta ve schématu 2.1.



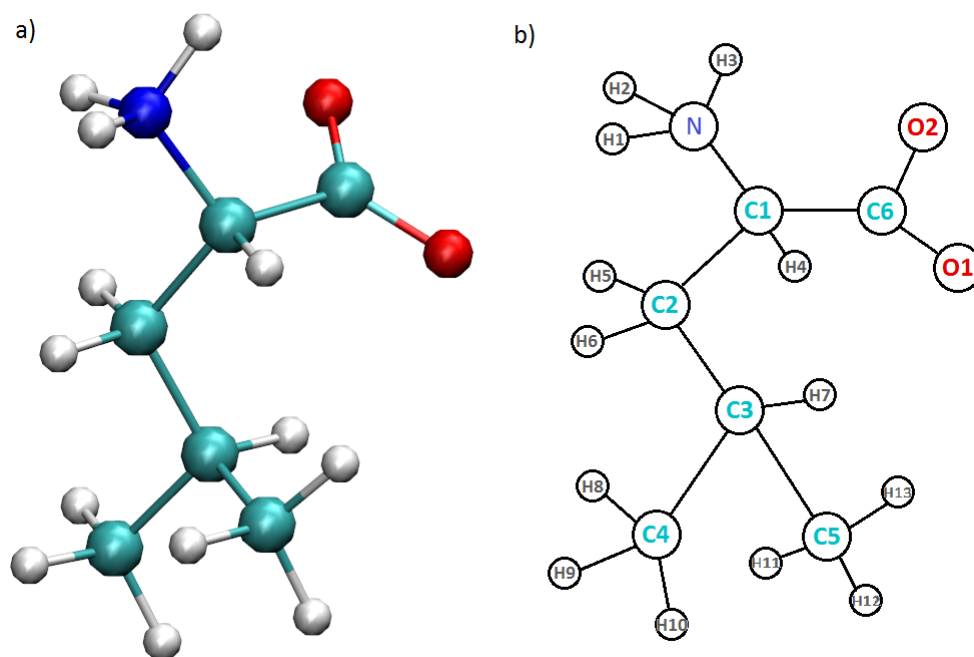
Obrázek 2.1: Schéma souborů GROMACSu

- GAUSSIAN
Komerční software pro výpočet struktury a vlastností molekul [33].
- VMD 1.9.1, Molden
Programy pro vizualizaci molekul a molekulových systémů, [34].
- Xmgrace
Program pro tvorbu grafů.
- Antechamber
Součást sady programů Amber, umožňuje výpočet atomových náboju metodou RESP [30].

⁴Gromacs pre-processor

3. Simulace Leu ve vodě a na rozhraní voda-vzduch

3.1 Topologie molekuly leucinu



Obrázek 3.1: a) Prostorové uspořádání molekuly Leu ve zwitterionové formě, b) schéma molekuly Leu s číslováním atomů

Leucin (Leu) je aminokyselina s rozvětveným alifatickým postranním řetězcem, viz obr. 3.1 a. Skládá se z 22 atomů, jejichž typ a pořadové číslo jsou zobrazeny na obr. 3.1 b. Karboxylová skupina $-\text{COOH}$ je schopna odštěpení protonu, aminoskupina $-\text{NH}_2$ je schopna proton přijmout. Ustálení rovnováhy mezi neutrální a iontovou formou obou skupin závisí na pH prostředí a disociační konstantě příslušné skupiny, viz tab. 3.1. V rámci této práce byly provedeny simulace Leu ve vodě za fyziologického pH, pracovali jsme proto s zwitterionovou formou leucinu (viz kap. 1.1).

Sumární vzorec:	$C_6H_{13}NO_2$
Molární hmotnost:	$131,18 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Disociační konstanty:	$pK_{\text{COOH}} : 2,33, pK_{\text{NH}_2} : 9,74$
Rozpustnost:	$22,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (při $T = 20^\circ\text{C}$)

Tabulka 3.1: Chemické vlastnosti Leu

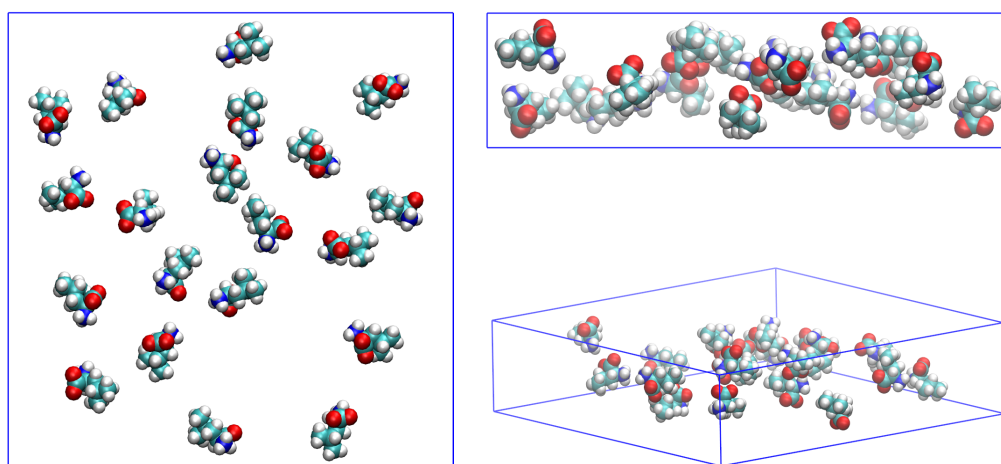
Pro popis interakcí molekuly Leu ve zwitterionové formě byla použita parametrizace silového pole OPLS [28] [29]. Optimalizace geometrie molekuly byla provedena v Gaussianu 09 metodou B3LYP/cc-pvDZ se zahrnutím implicitního solventu pomocí metody PCM (Polarizable Continuum Model). Výpočet nábojů byl proveden v Antechamberu metodou RESP [30], výsledné hodnoty parciálních nábojů na atomech jsou shrnuty v tabulce 3.2.

atom	C1	C2	C3	C4	C5	C6
náboj	0,112687	-0,238823	0,36819	-0,388952	-0,388952	0,618125
atom	O1	O2	N	H1	H2	H3
náboj	-0,612573	-0,612573	-0,518038	0,306364	0,306364	0,306364
atom	H4	H5	H6	H7	H8	H9
náboj	0,072395	0,056286	0,056286	0,042735	0,085686	0,085686
atom	H10	H11	H12	H13		
náboj	0,085686	0,085686	0,085686	0,085686		

Tabulka 3.2: Parciální náboje na jednotlivých atomech molekuly Leu

3.2 Příprava počáteční konfigurace pro simulaci vnitřku a povrchu roztoku Leu

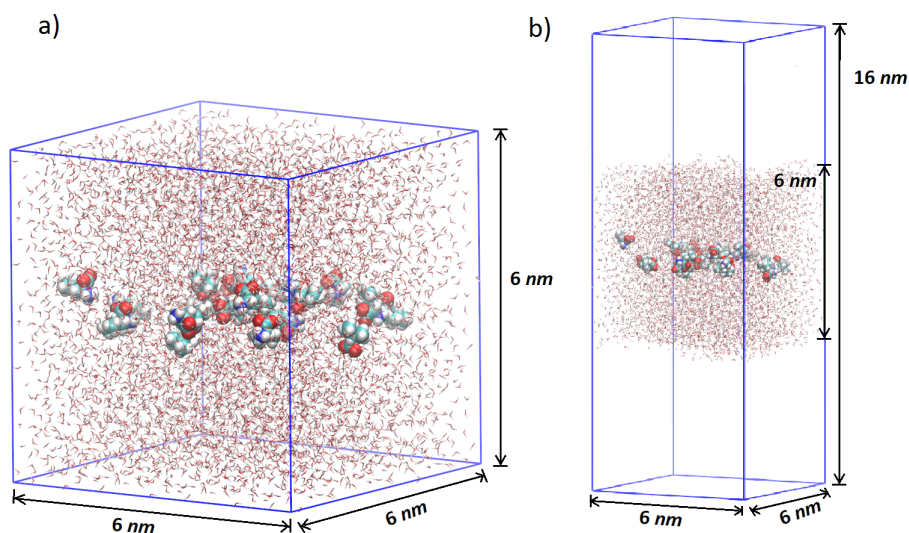
Vytvořili jsme simulační box o velikosti $6 \times 6 \times 1,5 \text{ nm}^3$, do kterého jsme náhodně rozmístili 20 molekul Leu. Pro zabránění blízkého kontaktu mezi molekulami jsme ručně doladili konfiguraci molekul pomocí VMD, viz obr. 3.2.



Obrázek 3.2: Počáteční konfigurace 20 molekul Leu v boxu $6 \times 6 \times 1,5 \text{ nm}^3$. Vlevo - pohled shora, vpravo nahoře - pohled ze strany, vpravo dole - pohled diagonálně

3.2.1 Simulace vnitřku roztoku.

Simulační box jsme zvětšili na velikost $6 \times 6 \times 6 \text{ nm}^3$ a molekuly Leu jsme solvatovali vodou (počet molekul vody: 6987, model vody TIP3P [23]). Simulační box (viz obr. 3.3 a) replikujeme ve všech třech dimenzích, tj. používáme periodické okrajové podmínky (PBC). Tím dostáváme počáteční konfiguraci pro simulování vnitřku roztoku. Koncentrace vytvořeného roztoku je $20,8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, je tedy pod hodnotou rozpustnosti leucinu ve vodě (viz tabulka 3.1)



Obrázek 3.3: Počáteční konfigurace: a) vnitřek roztoku, b) rozhraní voda-vzduch.

3.2.2 Simulace povrchu roztoku.

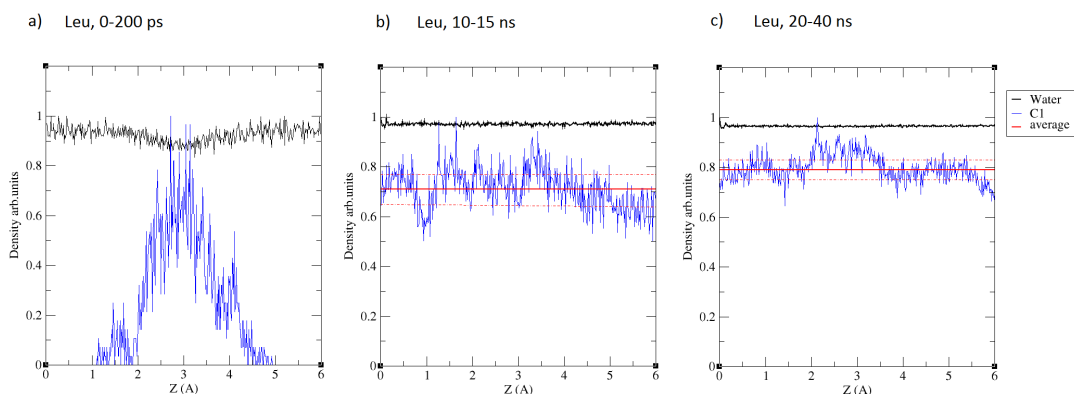
Konfiguraci připravenou v předchozím bodě, tj. simulační box o velikosti $6 \times 6 \times 6 \text{ nm}^3$, vyplněný vodou a obsahující 20 molekul Leu, zkoncentrovaných ve vrstvě ve středu boxu, jsme zvětšili ve směru osy Z na výslednou velikost $6 \times 6 \times 16 \text{ nm}^3$. Nadále používáme 3D periodické okrajové podmínky. Zvětšením výšky simulačního boxu v systému vzniklo rozhraní kapalina - plynná fáze, čímž lze simulovat povrch roztoku. Počáteční konfigurace systému je znázorněna na obr. 3.3 b.

3.3 Výsledky simulací

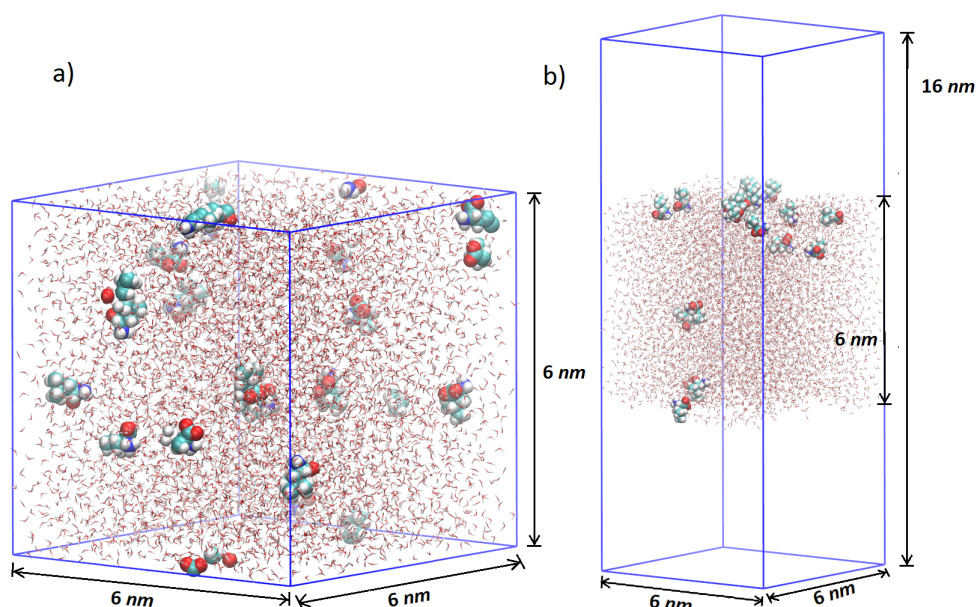
3.3.1 Simulace vnitřku roztoku

Délka simulace vnitřku roztoku byla 40 ns. Výchozí konfigurace systému (viz 3.3 a) je nehomogenní ve směru Z, má maximální koncentraci Leu ve středu simulačního boxu a nulovou ve zbylém objemu simulačního boxu. Hned po začátku simulace proto můžeme pozorovat proces ustalování rovnováhy pomocí difuze. Vizually pozorovaná difuze ve směru osy Z je zachycená v grafech hustotních profilů atomu C1 leucinu na obr. 3.4 (hodnoty hustoty byly normovány vydělením maximální hodnotou). Z grafů hustotních profilů lze usoudit, že cca po 15 ns se ustaluje

dynamická rovnováha systému s konstantní (ve střední hodnotě) hustotou Leu v objemu roztoku (viz grafy 3.4 b, c). Grafy analogické 3.4 c získáme i pro směry X a Y (zde neuvádíme). Z vizuální analýzy pozorujeme, že žádný směr ve vodě není preferován a natočení molekuly Leu je stochastické. I po ustálení rovnováhy pozorujeme lokální fluktuace hustoty Leu v roztoku, které mohou být způsobeny tvorbou klastrů molekul Leu. Výsledná konfigurace systému je zobrazena na obr. 3.5 a.



Obrázek 3.4: Hustotní profily Leu a vody: a) 0-200 ps, b) 10-15 ns, c) 20-40 ns (černá barva odpovídá vodě, modrá - C1 Leu)



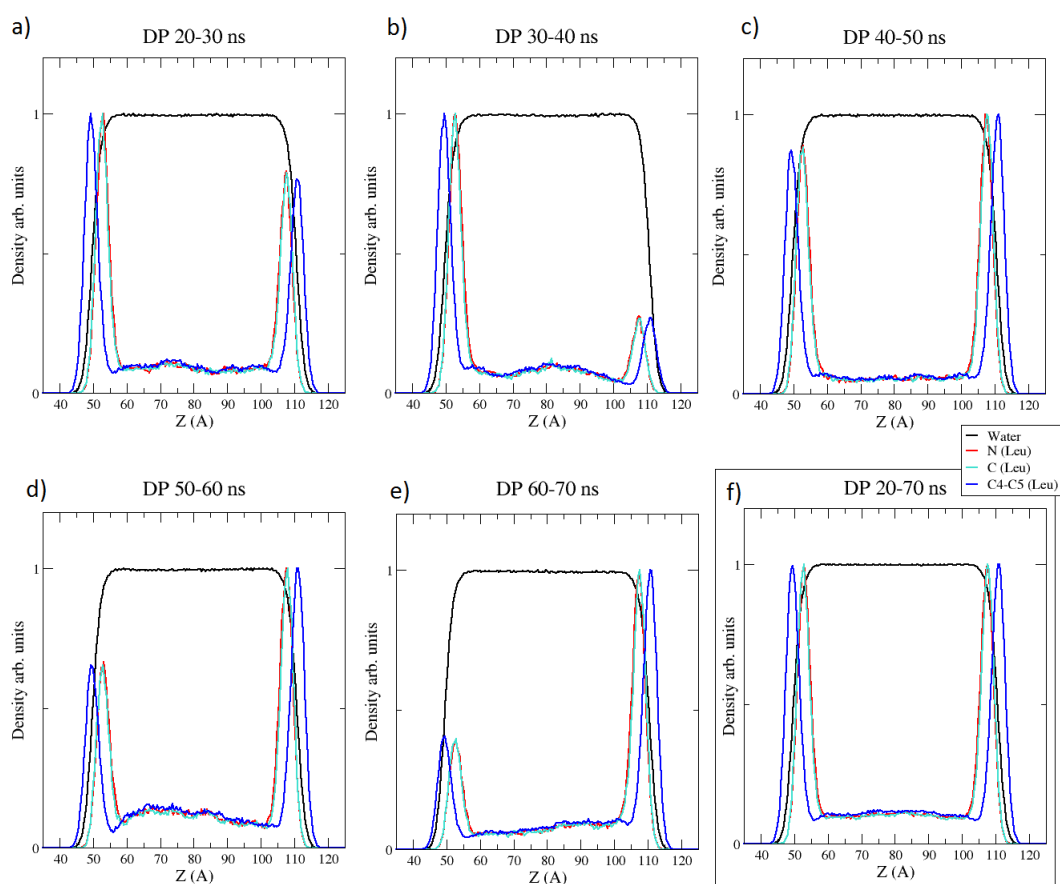
Obrázek 3.5: Výsledné konfigurace: a) vnitřek roztoku, 40 ns b) vrstva roztoku s rozhraním roztok - plynná fáze, 70 ns.

3.3.2 Simulace povrchu roztoku

Dále jsme provedli simulaci povrchu roztoku (počáteční konfigurace systému viz obr. 3.3 b. Délka simulace byla 70 ns. Na začátku simulace pozorujeme difuzi

molekul Leu stejně jako v předchozí simulaci vnitřku roztoku. Již během prvních stovek pikosekund však dochází k adsorpci molekul Leu na povrchu kapaliny (tj. Leu jeví povrchovou aktivitu).

Ustabilování rovnováhy jsme sledovali pomocí hustotních profilů¹ vybraných atomů Leu: N (aminoskupina NH_3^+), C6 (karboxylová skupina COO^-), C4 a C5 (koncové CH_3 skupiny). Pomocí časově rozlišených grafů hustotních profilů (s délkou časového okna 10 ns) jsme zjistili, že k ustálení dynamické rovnováhy mezi povrchem a vnitřkem dochází cca po 20 ns (viz obr. 3.6). Na grafech a-e na obr.3.6 je však vidět střídání maximálních hodnot hustoty atomů Leu na různých površích, což svědčí o tom, že i během rovnovážné simulace dochází k velkým fluktuacím počtu molekul Leu na obou površích (viz také obr.3.5 b).

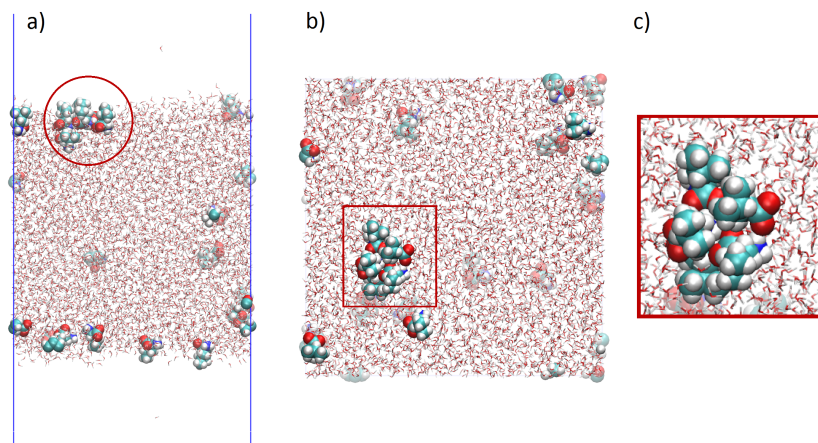


Obrázek 3.6: Grafy hustotních profilů Leu na rozhraní voda-vzduch, 20-70 ns (červená barva odpovídá N Leu, tyrkysová - C Leu, modrá - koncovým uhlíkům C4/C5 Leu)

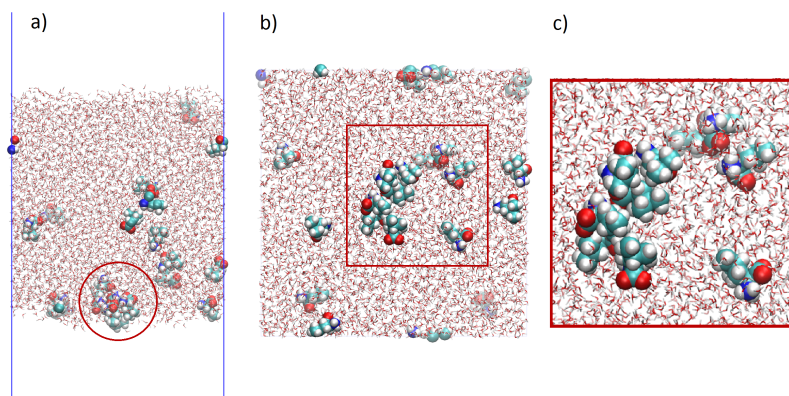
Graf 3.6 f představuje hustotní profily zprůměrované přes celou produkční část simulace. Z obr.3.6 je vidět, že největší koncentrace Leu je na obou površích vrstvy roztoku. Maxima hustoty funkčních skupin NH_3^+ a COO^- jsou posunuta směrem dovnitř roztoku v porovnání s uhlíky C4/C5, jejichž maxima se nachází na vnějším okraji rozhraní. Z toho usuzujeme, že molekuly Leu jsou na povrchu roztoku orientovány podle očekávání tak, aby jejich hydrofilní část byla ponořena ve vodě a hydrofobní část směřovala do plynné fáze.

¹hodnoty hustoty byly normovány stejným způsobem jako v předchozí simulaci

Z vizuální analýzy dále pozorujeme, že molekuly Leu, adsorbované na povrch roztoku, mají tendenci tvořit klastry (viz. obr. 3.7 a obr. 3.8). Jedná se o přechodné shluky molekul, které se vytvářejí a rozpadají během simulace. Doba života klastrů je mnohem kratší než doba mezi jejich vytvořením. Vizuální analýzou tvorby klastrů jsme zjistili, že nejdelší dobu života (kolem 50 ps) mají klastry 4 až 5 molekul Leu. Tyto klastry se často rozpadají na menší klastry dvou až tří molekul, které setrvávají v blízké vzdálenosti od sebe, ale jsou méně stabilní a vyměňují si navzájem molekuly. Tyto klastry jsou zároveň nejpočetnější. Průměrná doba života klastru 2-3 molekul je kolem 25 ps. Výskyt klastrů s rostoucí velikostí (tj. počtem molekul tvořících daný klaster) exponenciálně klesá. Největší pozorovaný klaster obsahoval 6 molekul Leu. Z pozorovaných struktur klastrů můžeme usoudit, že na vzniku klastrů se podílejí jak elektrostatické interakce mezi hydrofilními částmi Leu, tak disperzní (Van der Waalsovská) interakce mezi hydrofobními částmi molekul. Bylo by zajímavé provést podrobnější analýzu a porovnat tvorby klastrů na povrchu a uvnitř roztoku, svou náročností tato analýza ale přesahuje rámec této práce. Naše předběžné výsledky nicméně naznačují, že na povrchu roztoku dochází ke vzniku klastrů snáze než uvnitř kapaliny.



Obrázek 3.7: Leu na rozhraní voda-vzduch: a) pohled z boku, b) pohled shora, c) zvětšený klaster



Obrázek 3.8: Leu na rozhraní voda-vzduch: a) pohled z boku, b) pohled zdola, c) zvětšený klaster

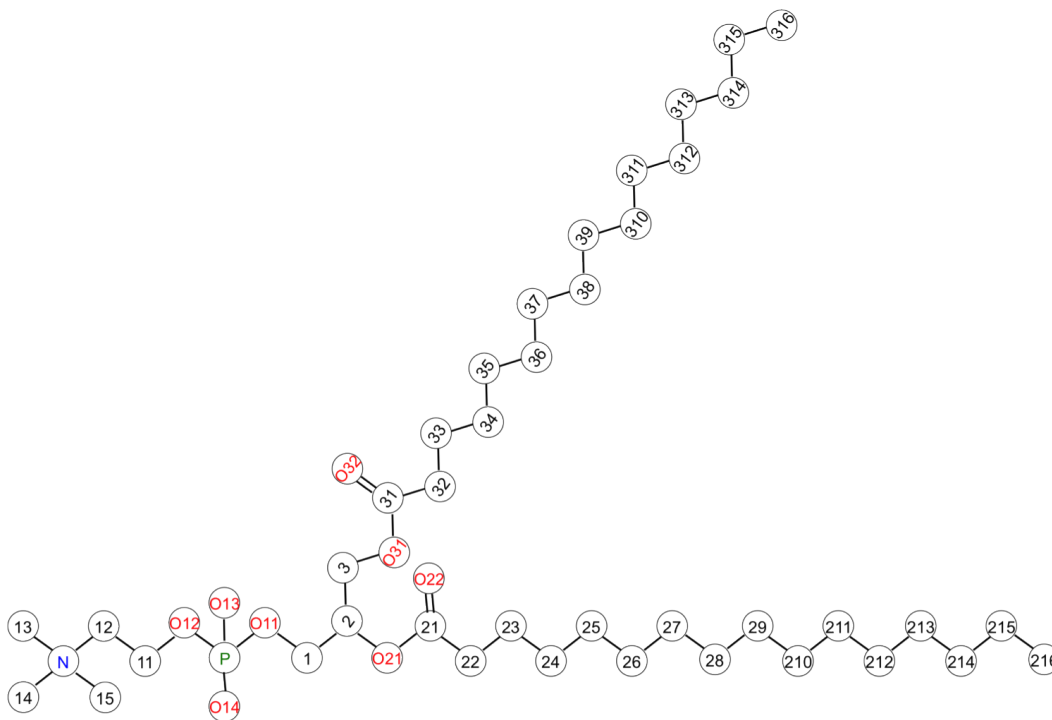
4. Interakce Leu s monovrstvou DPPC na rozhraní voda-vzduch

4.1 Topologie molekuly DPPC

DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) je fosfolipid s polární částí ve formě zwitterionu (NH_4^+ , PO_4^-) a dvěma nasycenými hydrofobními řetězci, které délkou (C16) odpovídají kyselině palmitové, viz obr. 4.1 (obrázek byl převzat z práce E. Griffith [5] se svolením autorky).

Sumární vzorec:	$C_{40}H_{80}NO_8P$.
Molární hmotnost:	$734.039 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Tabulka 4.1: Chemické vlastnosti DPPC



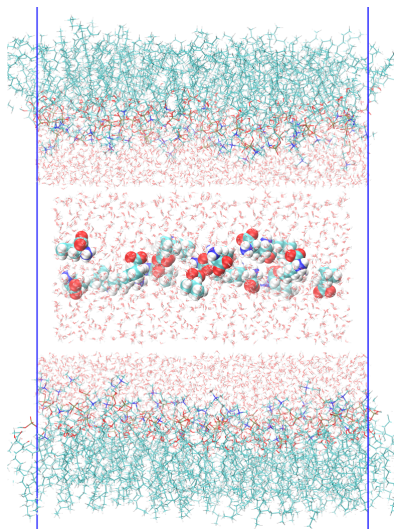
Obrázek 4.1: Schéma molekuly DPPC (atomy vodíku vynechány pro přehlednost)

Topologie DPPC byla získána z již existující simulace DPPC [16]. Pro popis DPPC jsme použili parametry převzaté ze silového pole SLipids [21] [22].

4.2 Příprava počáteční konfigurace

K vytvoření počáteční konfigurace simulovaného systému jsme použili předem připravenou konfiguraci DPPC monovrstvy (střední plocha na molekulu 70 \AA) na povrchu vrstvy vody (model TIP3P [23]). Celkový počet molekul DPPC: 64 v každé monovrstvě.

Systém jsme rozdělili vodorovným řezem (v rovině XY) ve středu vrstvy ($Z=0$) na dvě stejné poloviny. Jejich posunutím podél osy Z vznikla mezera, do níž jsme vložili solvatovaný systém 20 Leu (počáteční konfigurace obr. 4.2) o velikosti $6 \times 6 \times 3 \text{ nm}^3$. Vzniklá konfigurace je zobrazena na obr. 4.2. Celkový počet molekul vody: 7045. Koncentrace leucinu v roztoku je $20,67 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

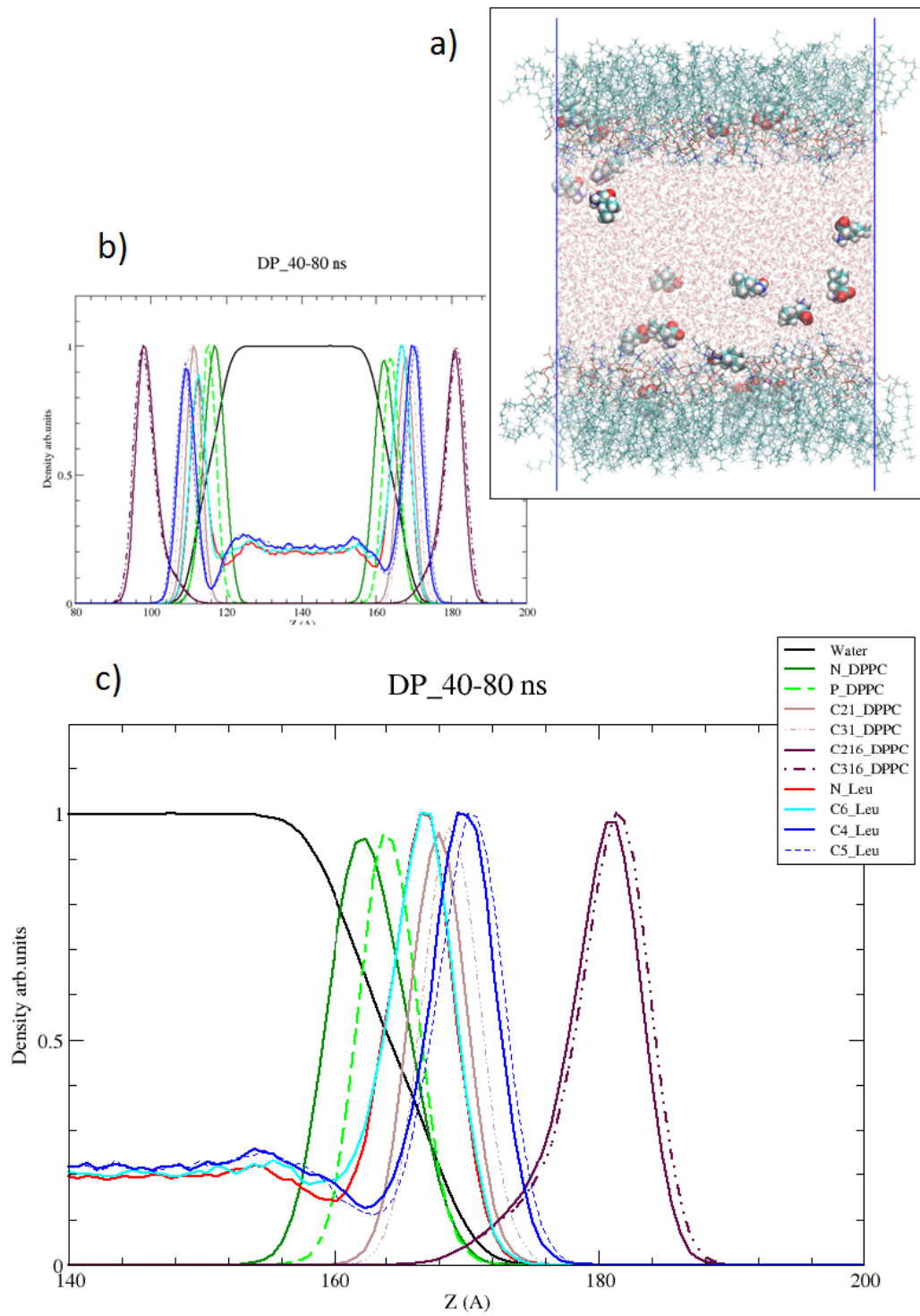


Obrázek 4.2: Počáteční konfigurace systému Leu - DPPC

4.3 Výsledky simulací

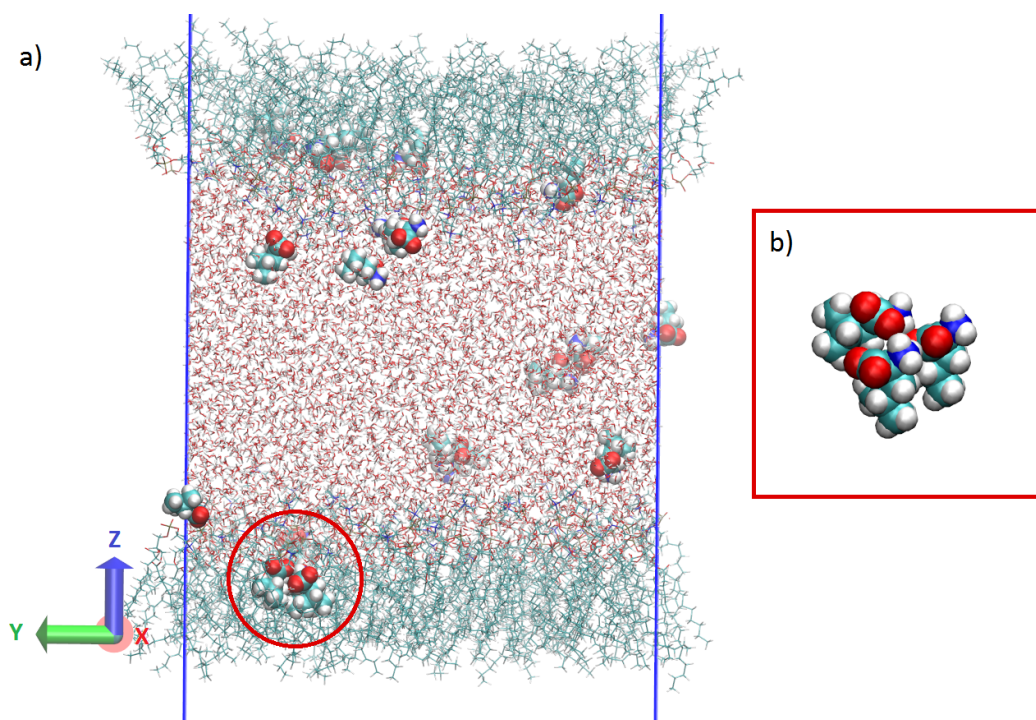
Délka simulace vrstvy roztoku Leu s DPPC monovrstvou na povrchu byla 80 ns. Průběh simulace je znázorněn na obr. 4.8. Ihned po začátku simulace molekuly Leu difundují ve vodním prostředí a během prvních stovek pikosekund některé z nich dosahují fosfolipidové monovrstvy. Pozorujeme následné vnořování Leu do DPPC monovrstvy.

O ustálení rovnováhy systému usuzujeme z časově rozlišených hustotních profilů, které byly vypočteny s délkou časového okna 10 ns. Na základě těchto dat jsme usoudili, že dynamická rovnováha mezi Leu v objemu roztoku a Leu adsorbovaným na rozhraní roztok-DPPC, příp. vnořeným dovnitř DPPC monovrstvy, nastává po 40 ns. Na obr. 4.3 jsou zobrazeny hustotní profily pro vybrané atomy (viz legenda) v intervalu od 40 do 80 ns spolu s typickým 'snímkem' systému v průběhu simulace. Na obr. 4.3 b jsou vyneseny grafy hustotních profilů pro celý systém, na obr. 4.3 c je zvětšená oblast jednoho z povrchů. Z grafu 4.3 c lze vyčíst, jak se molekuly Leu natáčí a jak hluboko penetrují do DPPC monovrstvy. Hydrofilní část Leu je reprezentovaná dusíkem N a uhlíkem C6, hydrofobní část uhlíky C4 a C5. Je vidět, že hydrofilní část Leu leží v průměru mezi fosfátovou skupinou (v grafu zastoupena atomem P) a karbonylovými skupinami DPPC (v grafu atomy C21/C31), a to blíže ke karbonylům. To svědčí o interakci mezi zwitterionovou hydrofilní částí Leu a polární částí DPPC. Hydrofobní část Leu (uhlíky C4 a C5 z koncových CH_3 skupin) je natočena od vody směrem k C216 a C316 a nachází se v nepolární části DPPC monovrstvy v oblasti atomů C23/C33. Dále vidíme, že uvnitř roztoku jsou nenulové hodnoty koncentrace Leu, odpovídající rovnovážnému rozdělení Leu mezi roztokem a DPPC filmem.

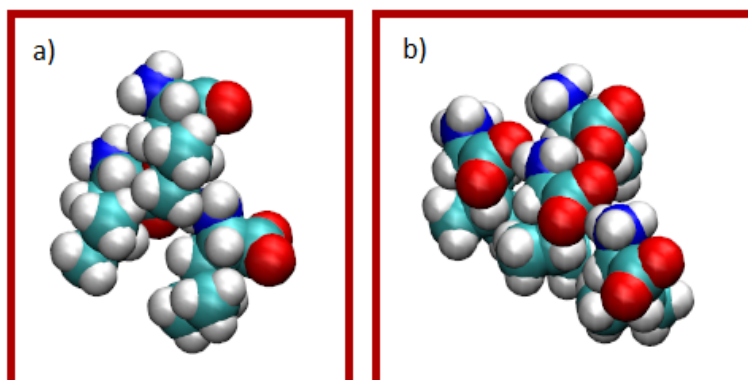


Obrázek 4.3: Systém Leu - DPPC: a) konfigurace systému, 80 ns, b)-c) Hustotní profil Leu - DPPC 40-80 ns.

Z vizuální analýzy průběhu simulace jsme zjistili, že molekuly Leu mají tendenci tvořit klastry. K tvorbě klastrů dochází jak uvnitř roztoku, tak na rozhraní voda - DPPC, viz obr. 4.4. Nejvíce zastoupené jsou dimery Leu, které však nejsou stabilní a rychle se rozpadají (jedná se o desítky pikosekund). Klastry tvořené třemi molekulami Leu přetrvávají delší dobu, během simulace byla zaznamenána doba života takového trimeru až 250 ps. Největší pozorované klastry byly tvořeny čtyřmi molekulami Leu, viz obr. 4.5 (pro přehlednost není zobrazena voda a DPPC monovrstva). Na rozdíl od dimerů, které vznikaly jak uvnitř roztoku, tak na rozhraní s DPPC, klastry tvořené třemi a čtyřmi molekulami Leu měly tendenci se tvořit především na rozhraní voda - DPPC a pronikat mezi molekuly DPPC.

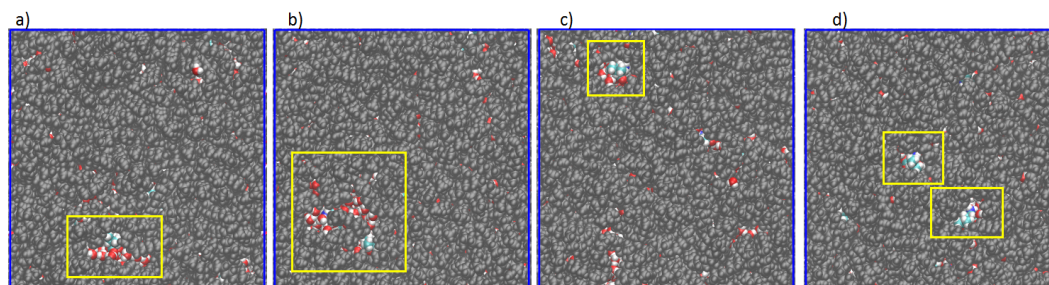


Obrázek 4.4: a) Klastrování Leu na rozhraní voda- DPPC, b) zvětšený klastr (voda a DPPC monovrstva není pro přehlednost zobrazená)



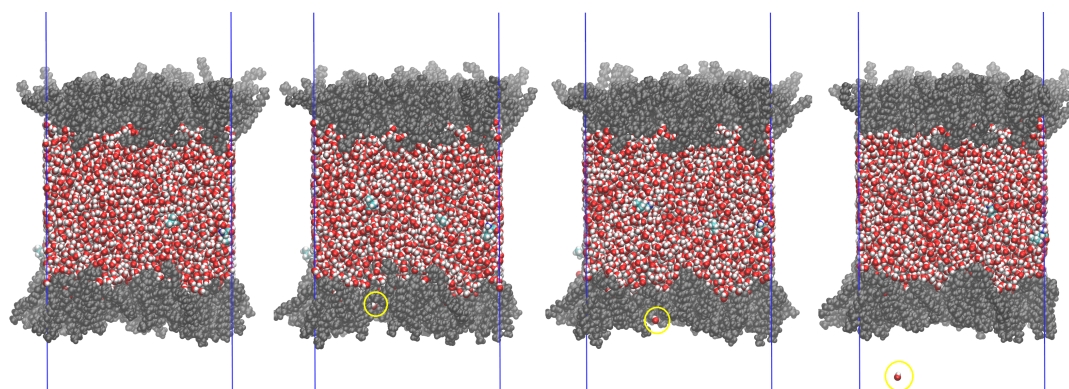
Obrázek 4.5: Klastry ze čtyř molekul Leu na rozhraní voda- DPPC

Během simulace pozorujeme, jak se díky pronikání molekul Leu mezi molekuly DPPC v monovrstvě objevují drobné póry. Několik takových případů je zobrazeno na obr. 4.6. V blízkém okolí Leu dochází k rozestupu molekul DPPC, při pohledu shora je viditelný povrch vody pod DPPC filmem.

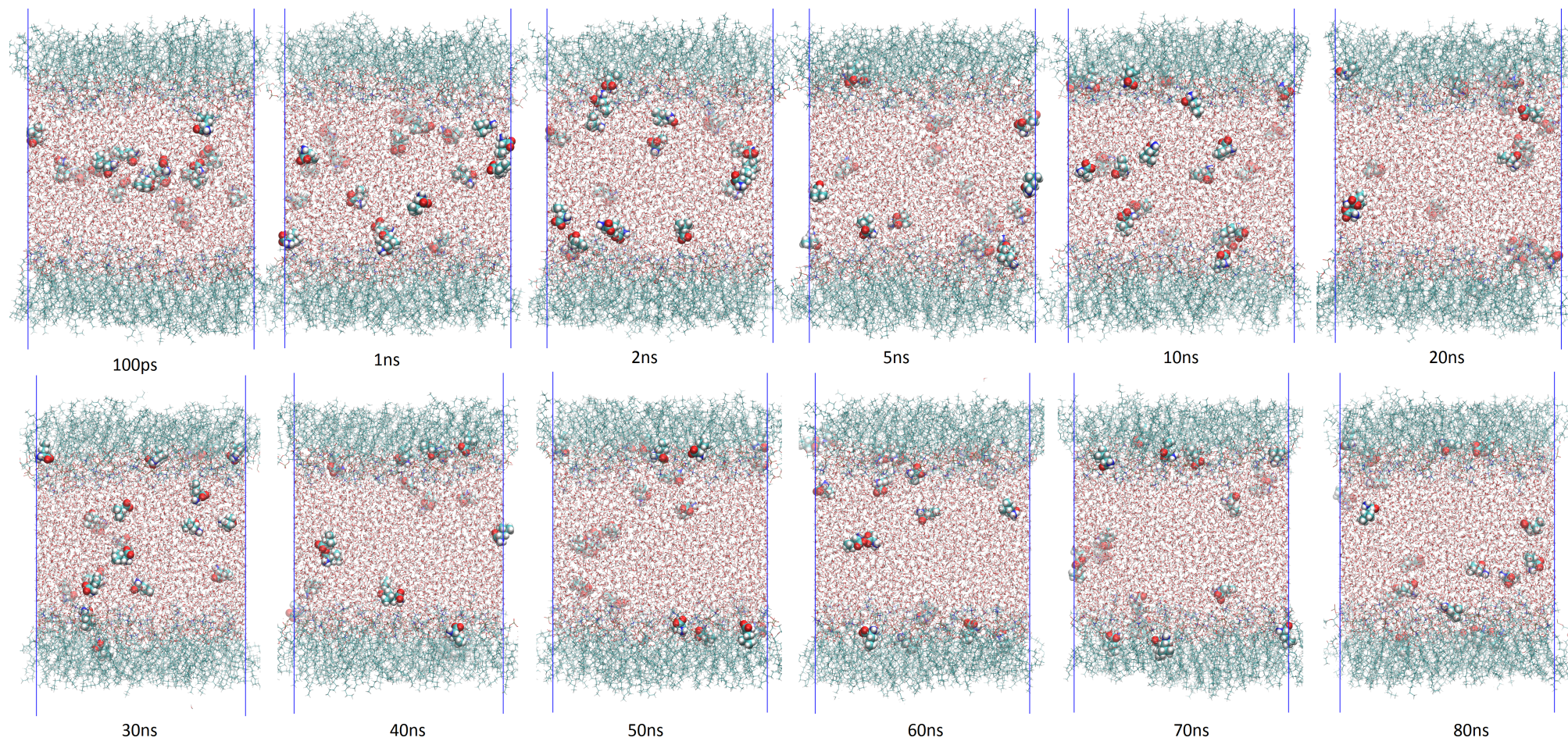


Obrázek 4.6: Monovrstva DPPC na povrchu roztoku Leu, pohled shora.

Během simulace jsme také pozorovali dva případy vypaření molekuly vody. Průběh procesu vypařování je zobrazen na obr. 4.7. Předpokládali jsme, že k vypaření molekuly vody mohlo dojít v důsledku vzniku póru v DPPC monovrstvě v okolí Leu, při detailnějším zkoumání ale bylo zjištěno, že uvolnění molekuly vody bylo v obou pozorovaných případech zcela náhodné a nebylo ovlivněno přítomností Leu.



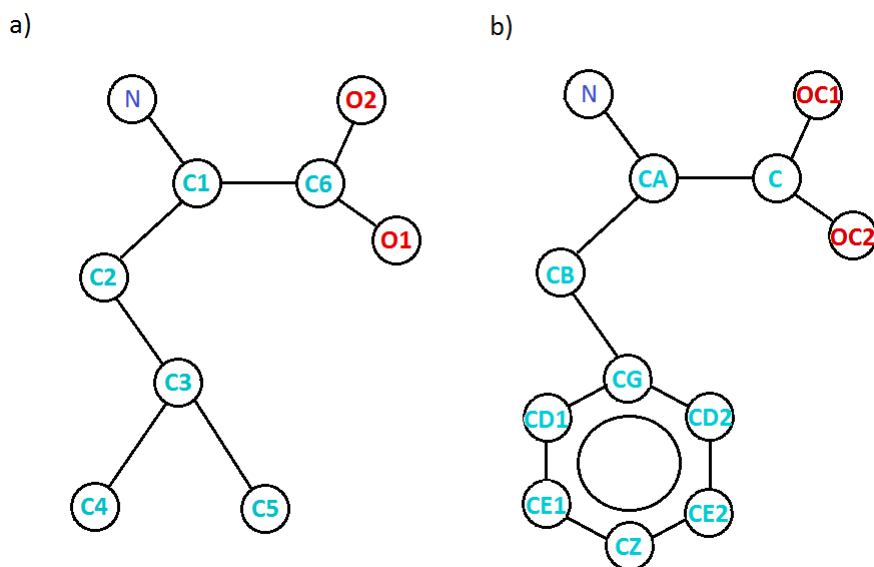
Obrázek 4.7: Vypařování molekuly vody.



Obrázek 4.8: Průběh simulace Leu - DPPC

5. Porovnání výsledků pro Leu a Phe

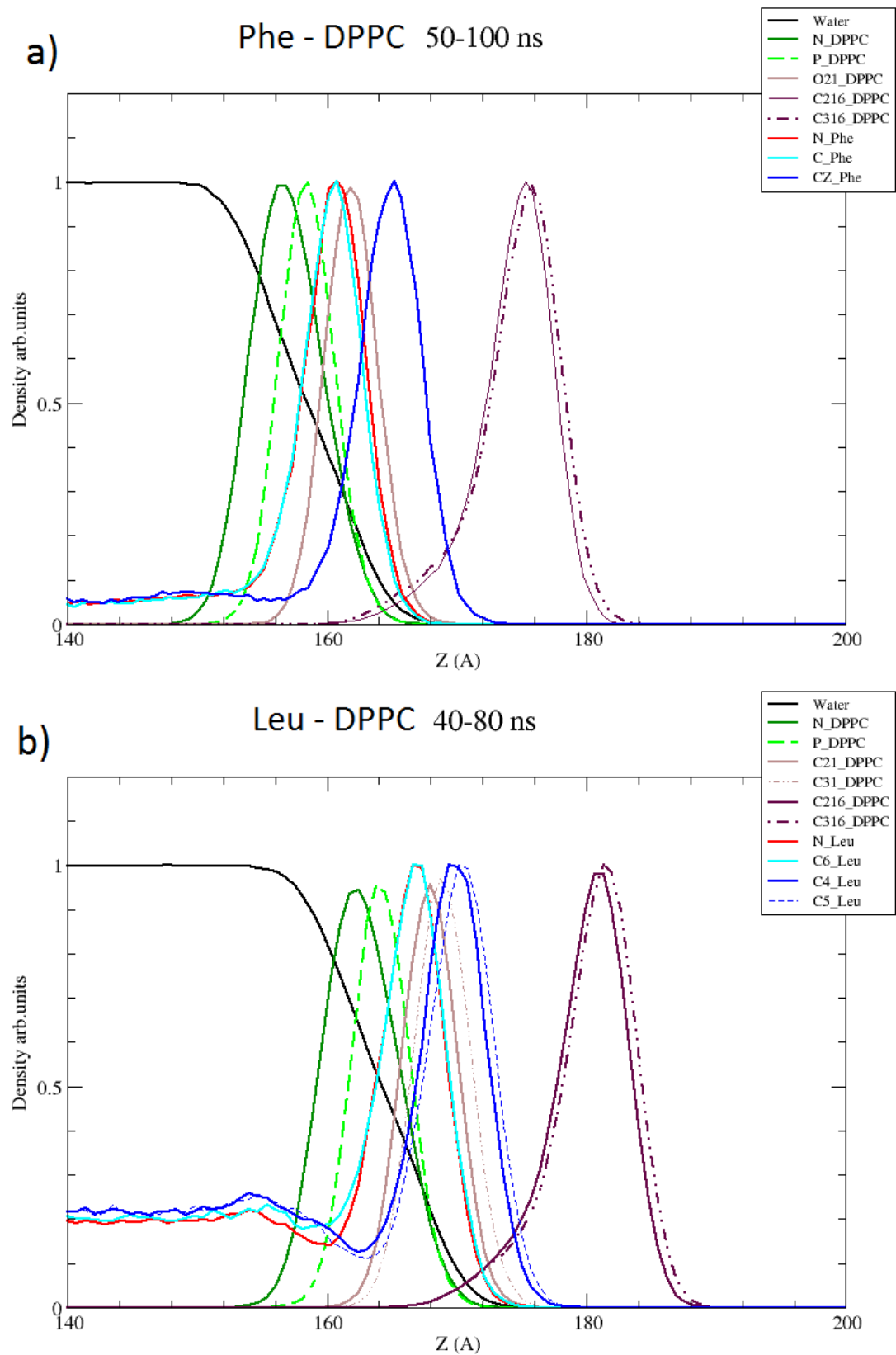
Simulace phenylalaninu ve vodě s monovrstvou DPPC na rozhraní voda-vzduch v práci E. Griffith [5] byla provedena za stejných podmínek jako simulace s leucinem v této práci (viz kap. 2.6.3). To nám umožňuje provést přímé porovnání výsledků obou simulací.



Obrázek 5.1: a) Schéma molekuly Leu ve zwitterionové formě s číslováním atomů, b) Schéma molekuly Phe ve zwitterionové formě s číslováním atomů (atomy vodíku jsou vynechány pro přehlednost)

Na obr. 5.1 b je uvedené použité číslování atomů obou aminokyselin, Leu a Phe, ve zwitterionové formě.

Na obr. 5.2 jsou zobrazeny hustotní profily podél osy Z kolmé na rozhraní voda -DPPC pro vybrané atomy Phe (obr. 5.2 a) a Leu (5.2 b). Hustotní profily ze simulace s molekulami Phe byly převzaty z práce E.Griffith [5] se svolením autorky. Hodnoty hustoty byly normalizovány vydělením její maximální hodnotou (zvlášť pro každý atom). Z grafů hustotních profilů je vidět, že obě molekuly, Phe i Leu, mají podobné chování. Karboxylová skupina (v grafu je reprezentovaná atomem C) a aminoskupina (v grafu atom N) Phe se v průměru nacházejí mezi fosfátovou skupinou DPPC (v grafu - P) a kyslíkem O21, analogickou polohu hydrofilních funkčních skupin jsme pozorovali také u molekul Leu. Ani aromatická skupina Phe (v grafu je zastoupena uhlíkem CZ benzenového kruhu), ani hydrofobní část Leu (uhlíky C4/C5 z koncových skupin) neprokazují významnou penetraci na úroveň koncových skupin DPPC (v grafu - C216 a C316). Maxima příslušných hustotních profilů se nachází v nepolární části DPPC filmu (maximum hustotních profilů uhlíků C4/C5 Leu odpovídá pozici uhlíků C23/C33 uhlovodíkových řetězců DPPC, maximum hustotního profilu uhlíku CZ Phe pozici uhlíků C24/C34). Nenulové hodnoty hustotního profilu Leu/Phe na obr.5.2 ve střední části vodní vrstvy odpovídají nenulové koncentraci Leu/ Phe uvnitř roztoku.



Obrázek 5.2: Hustotní profily: a) Phe - DPPC, 50-100 ns, b) Leu - DPPC, 40-80 ns

Porovnáním poměrů maxima hustoty y_{max} (uvnitř DPPC filmu) ku hodnotě hustoty uvnitř roztoku y_r pro molekuly Phe a Leu, jsme zjistili, že poměr hustoty molekul uvnitř DPPC filmu ku hustotě uvnitř roztoku je cca 4-krát větší u Phe, z čehož plyne, že molekuly Phe mají větší tendenci k penetraci do DPPC monovrstvy (Pro molekuly Phe je $y_{max}^{Phe} : y_r^{Phe} \approx 20 : 1$, pro molekuly Leu: $y_{max}^{Leu} : y_r^{Leu} \approx 5 : 1$).

Tendence tvořit klastry byla pozorována u obou molekul, Phe i Leu. Pozorované klastry Phe měly podobnou strukturu jako klastry pozorované v simulaci s Leu. Proto se lze domnívat, že vyšší penetrace Phe do monovrstvy DPPC není způsobena tvorbou klastrů, jak se původně předpokládalo. Mohla by ale případně hrát roli rozdílná struktura klastrů vzhledem k rozdílné hydrofobní části Phe a Leu. Odpověď na tuto otázku bude vyžadovat podrobnou analýzu velikosti, doby života a struktury klastrů Phe a Leu, která je však mimo možnosti této práce.

Závěr

V rámci této práce jsme provedli MD simulace leucinu ve vodném roztoku, na jeho povrchu (tj. na rozhraní voda-vzduch) a ve vodném roztoku s monovrstvou DPPC na povrchu. Na základě těchto simulací jsme dospěli k následujícím závěrům:

- Molekuly Leu jeví povrchovou aktivitu.
- Orientace molekul Leu uvnitř roztoku je náhodná, při adsorbování na povrch roztoku (na rozhraní s plynnou fází) se molekuly Leu natáčí hydrofobní částí směrem do plynné fáze a hydrofilní částí směrem do vody.
- Molekuly Leu mají tendenci tvořit klastry, přičemž na povrchu roztoku k tomu dochází snadněji než uvnitř roztoku.
- Klastry se vytvářejí a opět se rozpadají během simulace, tj. na časové škále nanosekund. Nejpočetnější je výskyt dimerů a trimerů, ty mají ale mnohem kratší (v řádu desítek pikosekund) dobu života než klastry tvořené čtyřmi a více molekulami (doba života klastrů řádově dosahuje i stovek pikosekund).
- Vznik klastrů je dán jak disperzní interakcí mezi hydrofobními částmi molekul, tak i elektrostatickou interakcí mezi hydrofilními částmi molekul.
- Molekuly Leu pronikají do DPPC monovrstvy. V průměru pozorujeme výskyt hydrofilní části Leu mezi fosfátovou a karbonylovou skupinou DPPC a hydrofobní části mezi uhlovodíkovými řetězci DPPC v oblasti atomů C23/C33.
- Penetrace molekul Leu do DPPC monovrstvy způsobuje tvorbu drobných pórů v DPPC monovrstvě.

Porovnáním provedených simulací s obdobnými simulacemi pro fenylalanin v práci E. Griffith [5] jsme zjistili, že obě aminokyseliny jeví podobné chování. U obou aminokyselin dochází ke tvorbě klastrů podobné velikosti. Lokalizace polární i nepolární části molekul Phe a Leu na rozhraní voda-DPPC monovrstva je srovnatelná, molekuly Phe však mají v porovnání s Leu větší tendenci k penetraci do DPPC monovrstvy na úkor solvatace uvnitř roztoku.

Bylo by zajímavé provést podrobnou analýzu tvorby klastrů Leu a Phe. Prodloužení celkové délky simulací a zvětšení simulovaných systémů by mohlo ukázat, jestli se pozorované tendence zachovávají, případně jestli se na delším časovém úseku projevují další, prozatím nepozorované, efekty, například tvorba větších klastrů. Takové simulace a podrobná analýza struktury klastrů Leu a Phe, případně dalších aminokyselin, by se daly využít v pokračování výzkumu interakcí aminokyselin s fosfolipidovými membránami.

V práci na tomto projektu se plánuje dále pokračovat. Provedení experimentů s DPPC monovrstvou na roztoku leucinu je naplánováno v laboratoři prof. V. Vaidy na University of Colorado v Boulderu na podzim 2014. Bude pak možné provést přímé porovnání výsledků simulací s experimenty.

Seznam použité literatury

- [1] JUNGWIRTH, P. *Klasická a kvantová molekulová dynamika*. Studijní materiál. <http://marge.uochb.cas.cz/jungwirt/>
- [2] HINCHLIFFE, A., *Molecular Modelling for Beginners*. John Wiley & Sons, Manchester, 2003.
- [3] ROESELVÁ, M., *Metody molekulové dynamiky a Monte Carlo*. Studijní materiál. <http://marge.uochb.cas.cz/roesel/>
- [4] SLÁČIK, S., *Charakterizace strukturních parametrů rozhraní mezi Langmuirovou monovrstvou mastných kyselin a povrchem vody na základě molekulových simulací*. Bakalářská práce, MFF UK, Praha, 2011.
- [5] GRIFFITH, E. C., *Chemical and Physical Changes Unique in and on Water: Implications for Life and Its Origins*. PhD Thesis University of Colorado, Boulder, 2014.
- [6] SKÁLA, L., *Kvantová teorie molekul*. Karolinum, Praha, 1995. ISBN 80-7184-007-6.
- [7] CALLEN, H. B., *Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1985.
- [8] ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., WILSON, J., HUNT, T., *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition, 2008, ISBN 978-0-8153-4r05.
- [9] JAKUBKE, Ch.D., ESHKAJT, Ch., *Aminokyseloty, peptidy, belki*. Překlád z německého. Mir, Moskva, 1985.
- [10] VACÍK, J., BARTHOVÁ, J., PACÁK, J., STRAUCH, B., SVOBODOVÁ, M., ZEMÁNEK, F., *Přehled středoškolské chemie*. 2.vydání. SPN, Praha, 1999, ISBN 80-7235-108-7.
- [11] GRIFFITH, E.C., VAIDA, V. *Ionization State of L-Phenylalanine at the Air-Water Interface*. J.Am.Chem.Soc., 2013, 135, 710-716.
- [12] MARSHALL, K.E., et al., *Hydrophobic, Aromatic, and Electrostatic Interactions Play a Central Role in Amyloid Fibril Formation and Stability*. Biochemistry, 2011, 50(12): p.2061-2071.
- [13] TAMAMIS, P., et al., *Self-Assembly of Phenylalanine Oligopeptides: Insights from Experiments and Simulations*. Biophysical Journal, 2009, 96(12): p.5020-5029.
- [14] TIELEMAN, D.P., MARRINK, S.J., BERENDSEN, H.J.C., *A Computer Perspective of Membranes: Molecular Dynamics Studies of Lipid Bilayer Systems*. Biochimica et Biophysica Acta 1331, 1997, 235-270.
- [15] BUSSI, G., DONADIO, D., PARRINELLO, M. *Canonical Sampling Through Velocity Rescaling*. J. Chem. Phys., 2007, 126:014101.

- [16] CWIKLIK, L., *nepublikované výsledky*
- [17] PLESNAR, E., SUBCZYNSKI, W.K., PASENKIEWICZ-GIERULA, M., *Saturation with Cholesterol Increases Vertical Order and Smooths the Surface of the Phosphatidylcholine Bilayer: A Molecular Simulation Study*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818, 2012, 520-529.
- [18] KAZNESSIS, Y.N., KIM, S., LARSON, R.G., *Simulations of Zwitterionic and Anionic Phospholipid Monolayers*. *Biophysical Journal* 82, 2002, 1731-1742.
- [19] HOCKNEY, R.W., GOEL, S.P., EASTWOOD, J. *Quit High Resolution Computer Models of a Plasma*. *J. Comp. Phys.*, 1974, 14:148-158.
- [20] VERLET, L., *Computer Experiments on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules*. *Phys. Rev.*, 1967, 14: 148-158.
- [21] JÄMBECK, J.P.M and LYUBARTSEV, A.P., *Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(10): p. 3164-3179.
- [22] JÄMBECK, J.P.M and LYUBARTSEV, A.P., *An Extension and Further Validation of an All-Atomistic Force Field for Biological Membranes*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2012, 8(8): p. 2938-2948.
- [23] JORGENSEN, W.L., et al., *Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water*. *The Journal of Chemical Physics*, 1983, 79(2): p. 926-935.
- [24] HESS, B., et al., *LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations*. *Journal of Computational Chemistry*, 1997, 18(12): p. 1463-1472.
- [25] DARDEN, T., YORK, D., and PEDERSEN, L. *Particle mesh Ewald: An $N \log(N)$ method for Ewald Sums in Large Systems*. *J. Chem. Phys.*, 1993, 98: 10089-10092.
- [26] HOOVER, W.G., *Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions*. *Physical Review A*, 1985, 31(3): p.1695-1697.
- [27] PARRINELLO, M., RAHMAN, A., *Polymorphic Transitions in Single Crystals: A New Molecular Dynamics Method*, *J. Appl. Phys.*, 1981, 52: 7182-7190.
- [28] JORGENSEN, W.L., MAXWELL, D.S. and TIRADO-RIVES, J., *Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118(45): 11225-11236.
- [29] KAMINSKI, G.A., FRIESNER, R.A., TIRADO-RIVES, J. and JORGENSEN, W.L., *Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides*. *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105(28): 6474-6487.

- [30] BAYLY, Ch. I., CIELPAK, P., CORNELL, W. D., KOLLMAN, P. A., *A Well-behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: the RESP model*. J. Phys. Chem. 97, 1993, 10269-10280.
- [31] HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E. *GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation*. J. Chem. Theory Comput., 2008, 4, 435-447.
- [32] VAN DER SPOEL, D., LINDAHL, E., HESS, B., and the GROMACS development team, *GROMACS User Manual version 4.6.3*. www.gromacs.org (2013)
- [33] *Gaussian 09, Revision D.01*, FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A., Jr.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, M. J.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. GAUSSIAN, Inc., Wallingford CT, 2009. www.gaussian.com
- [34] HUMPHREY, W., DALKE, A., SCHULTEN, K., *VMD - Visual Molecular Dynamics*. J. Molec. Graphics, 1996, 14.1, 33-38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>

Seznam použitých zkratek

B-O	Born-Oppenheimerova aproximace
DFT	Teorie hustotního funkcionálu (angl. Density Functional Theory)
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
GROMACS	GRoningen Machine for Chemical Simulations
LDA	Lokální hustotní potenciál (angl. Local Density Approximation)
Leu	Leucin
L-J	Lennard-Jonesův potenciál
MD	Molekulová dynamika
OPLS	(Optimized Potentials for Liquid Simulations) force field
PBC	Periodické okrajové podmínky (angl. Periodic Boundary Conditions)
PCM	Polarizable Continuum Model
PES	Hyperplocha potenciální energie (angl. Potential Energy Surface)
Phe	Fenylalanin
RDF	Radiální distribuční funkce
RESP	Restrained ElectroStatic Potential
SPME	Smooth Particle-Mesh Ewald
VMD	Visual Molecular Dynamics