

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Simulace látek na buněčných membránách**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **Bc. Markéta Paloncýová**

Studijní program: N1407 / Chemie

Studijní obor: 1404T001 / Fyzikální chemie

Forma studia: Prezenční

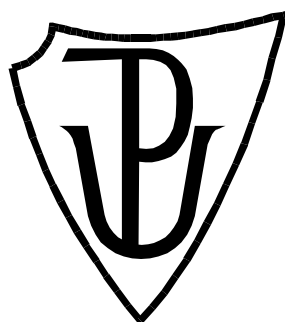
Vedoucí práce: **RNDr. Karel Berka, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 11. 5. 2012

**PALACKY UNIVERSITY OLOMOUC**

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry



**Simulation of small molecules on biological membranes**

**MASTER THESIS**

Author: **Bc. Markéta Paloncýová**

Study programme: N1407 / Chemistry

Study field: 1404T001 / Physical Chemistry Study form: Daily

Supervisor: **RNDr. Karel Berka, Ph.D.**

Date of submission: 5/11/2012

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 9. 5. 2012

Markéta Paloncýová

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Markéta Paloncýová
Název práce	Simulace látek na buněčných membránách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Klíčová slova	kumarin, membrána, molekulová dynamika, penetrace, profil volné energie, náboje
Počet stran	50
Počet příloh	2 + CD
Jazyk	Český
Abstrakt	<p>Molekulárně dynamické simulace molekul na modelech buněčných membrán jsou perspektivním způsobem studia jejich umístění v membránách a penetračních vlastností vůbec. V této práci jsme srovnali energetické profily substrátů cytochromů P450 (CYP) s jejich metabolity na modelech dvou buněčných membrán – dioleoylfosfatidylcholinu (DOPC) a palmitoylloleoylfosfatidylglycerolu (POPG). Substráty jsou v membránách obvykle umístěny hlouběji než příslušné metabolity. Rozdílné umístění molekul na membránách může ovlivňovat substrátovou specifitu CYP. Liší se také vlastnosti obou membrán. Středem POPG membrány molekuly obecně hůře prostupují. Tyto rozdíly se mohou odrážet v rozdílných penetračních vlastnostech látek přes různé typy membrán.</p> <p>Dále jsme analyzovali profil volné energie kumarinu na membráně DOPC a to pomocí několika nezávislých volných simulací (o celkové délce 3 <math>\mu</math>s) a také řízených simulací – jmenovitě umbrella sampling a metody z-constraint. Pomocí těchto dvou metod byly analyzovány dva sady startovních struktur – jeden získaný tažením molekuly do membrány (pulling) a druhý získaný volnou simulací. Startovní struktury získané pullingem vedou k deformacím membrány a vyšší hydrataci kumarinu. Profil volné energie tak obsahuje umělé minimum a energetická bariéra mezi prostředím vody a lipidů je výrazně snížena. Při použití startovních struktur z volné simulace k těmto artefaktům nedochází. Pokud jsou artefakty přítomné, tak je rychleji odstraňuje metoda z-constraint. Dále jsme analyzovali vliv volby sady parciálních nábojů. Závěrem je navržen co nejvýhodnější simulační protokol, který používá co nejvíce volné simulace (v případě potřeby následovaný pomalým pullingem), metodu z-constraint jako výhodnější formu řízených simulací a náboje RESP.</p>

## Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Bc. Markéta Paloncýová
Title	Simulation of small molecules on biological membranes
Type of thesis	Master
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	RNDr. Karel Berka, Ph.D.
The year of presentation	2012
Keywords	Coumarin, membrane, molecular dynamics, penetration, permeation, free energy profile
Number of pages	50
Number of appendices	2 + CD
Language	Czech
Abstract	
<p>Molecular dynamics simulations of small drug-like molecules on model cell membranes are of considerable interest, showing both penetration properties and membrane positioning. The free energy profiles of substrates of cytochromes P450 are compared to those of corresponding metabolites on two types of model cell membranes: dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and palmitoylloleoylphosphatidylglycerol (POPG). Substrates are usually located deeper in a membrane than corresponding metabolites. The difference in membrane positioning might affect the substrate specificity of cytochromes P450 as they vary in the access and egress channels positioning. The properties of both membranes also differ. The penetration of POPG membrane is energetically less favourable than in the case of DOPC. The differences in bilayer properties might be useful when aiming a drug to specific target – species, organ or organelle.</p> <p>The second part of the thesis analyzes the convergence of free energy profiles of coumarin on DOPC bilayer with several unbiased simulations (of total time of 3 <math>\mu</math>s) and with two types of biased simulations – umbrella sampling and z-constraint. Two sets of starting structures were also analyzed – one generated by pulling molecule into the membrane and one generated with unbiased simulation. Pulling leads to membrane deformation due to coumarin overhydration. An artificial minimum appears in free energy profile and the water/lipids barrier is significantly lowered. Using starting structures from unbiased simulation does not lead to such artifacts. Moreover, z-constraint simulation seems to eliminate artifacts more quickly. The selection of partial charges set was also analyzed. Finally the simulation protocol is proposed: Use as much of unbiased simulation as possible (a slow pulling might follow), use a z-constraint method and RESP partial charges.</p>	

Děkuji vedoucímu diplomové práce RNDr. Karlu Berkovi Ph.D. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce.

# Obsah

1. Teoretický úvod.....	1
1.1 Buněčné membrány.....	1
1.1.1 Lipidy.....	2
1.1.1.1 Struktura a druhy lipidů.....	2
1.1.1.2 Struktura lipidové dvojvrstvy.....	5
1.1.1.3 Biosyntéza lipidů.....	6
1.1.2 Složení buněčných membrán.....	6
1.1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti membrán.....	7
1.2 Metabolismus látek v těle.....	9
1.2.1 Absorpce.....	9
1.2.2 Distribuce.....	9
1.2.3 Metabolismus.....	10
1.2.3.1 Cytochromy P450.....	10
1.2.4 Exkrece, vylučování.....	11
1.3 Substráty.....	11
1.4 Počítačové simulace.....	12
1.4.1 Molekulová mechanika.....	12
1.4.1.1 Silové pole.....	12
1.4.1.2 Jednotlivé členy potenciální energie v MM <sup>36</sup> .....	13
1.4.2 Molekulová dynamika.....	15
1.4.3 Periodické okrajové podmínky.....	16
1.4.4 Studium chování látek na membránách simulačními technikami.....	16
2. Cíle práce.....	19
3. Metody.....	20
3.1 Membrány.....	20
3.2 Pozice molekul na membránách DOPC a POPG.....	20
3.3 Konvergence profilu volné energie kumarinu na lipidové dvojvrstvě.....	23
4. Výsledky.....	25
4.1 Membrány.....	25
4.2 Pozice molekul na membránách.....	26
4.2.1 DOPC.....	26
4.2.2 POPG.....	27
4.1 Konvergence profilu volné energie u kumarinu.....	32
4.1.1 Volná MD simulace.....	32
4.1.2 Řízené simulace.....	32
4.1.3 Konvergence profilu volné energie v řízených simulacích.....	35
4.1.4 Vliv volby parciálních nábojů.....	36
4.1.5 Srovnání s experimentálními daty.....	37
5. Diskuze.....	40
5.1 Membrány.....	40
5.2 Pozice molekul na membránách DOPC a POPG.....	40
5.3 Konvergence profilů volné energie u kumarinu.....	42
5.3.1 Ve volné simulaci zůstává kumarin převážně mezi regiony 2 a 3.....	42
5.3.2 Parametry profilů volné energie získané volnými i řízenými simulacemi souhlasí.....	42
5.3.3 Konvergence profilů volné energie.....	43

5.3.4 Parciální náboje.....	44
6. Závěr .....	45
7. Použité zdroje .....	46
8. Přílohy .....	I
8.1 Parametry simulací (mdp).....	I
8.1.1 Volná simulace.....	I
8.1.2 Pulling .....	II
8.1.3 Umbrella sampling .....	III
8.1.4 Z-constraint .....	IV
8.2 Článek.....	VI



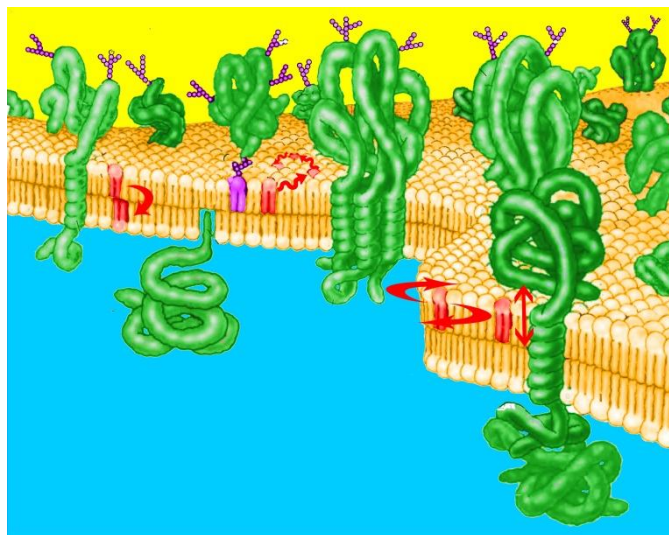
# 1. Teoretický úvod

Průchod biologicky aktivních látek membránami je jedním z klíčových dějů při vstřebávání těchto látek v těle. Při detailní znalosti, jak jednotlivé látky pronikají přes membrány, by bylo možné předvídat způsob jejich transportu přes tyto membrány, a tím i způsob jejich vstřebávání v organismu. Pasivní transport látek přes membrány je pak přímo závislý na permeačních vlastnostech dané membrány, zatímco aktivní transport se uskutečňuje pomocí membránových proteinů, případně prostřednictvím endocytózy.<sup>1</sup> Počítačové simulace nám umožňují studovat tyto děje dynamicky v atomárním rozlišení, čímž poskytují chybějící detaily, které je velmi obtížné, ne-li v současnosti nemožné, získat experimentálně.

## 1.1 Buněčné membrány

Membrány v lidském těle (a tělech organismů vůbec) slouží k oddělení prostředí s různým složením. Například oddělují vnitřní prostředí buňky od mezibuněčného prostoru nebo od vnitřních prostředí buněčných organel.<sup>2,3</sup> Membrány jsou vrstvy složené z proteinů a lipidů, přičemž hmotnostní zastoupení proteinů se pohybuje mezi 25 a 75 %.<sup>4</sup> Zbytek hmoty membrány tvoří lipidy nejčastěji uspořádané do tzv. lipidové dvojvrstvy (viz Obrázek 1).

Popis chování biologických membrán je možný na základě mozaikového modelu,<sup>5</sup> který nahradil předchozí sendvičový model.<sup>6</sup> Sendvičový model popisoval membránu jako vrstvu lipidů ohraničenou z obou stran proteiny. Mozaikový model popisuje membránu jako dvoudimenzionální tekutinu tvořenou lipidovou dvojvrstvou, v níž se vyskytují membránové proteiny (viz Obrázek 1).



Obrázek 1 *Mozaikový model (fluid mozaic model) popisuje buněčnou membránu (oranžová) jako lipidovou dvojvrstvou, v níž jsou zanořeny membránové proteiny (zelená). Lipidy i proteiny se mohou v dvojvrstvě laterálně pohybovat a rotovat, případně provádět další pohyby (červená). Na cytosolické straně membrány (žlutá) se vyskytují glykolipidy a glykoproteiny jako signální molekuly (fialová). Obrázek převzat<sup>7</sup> a upraven.*

Membránové proteiny mohou lipidovou dvojvrstvou buď procházet na druhou stranu (integrální),<sup>3</sup> nebo jsou v ní pouze částečně zanořené (periferní), nebo se také mohou vázat na membránu přes další protein. Lipidy a proteiny se mohou laterálně (v rámci jedné vrstvy membrány, tzv. leafletu) volně pohybovat, ovšem jsou v této pružné vrstvě poměrně silně drženy – obě monovrstvy membrány se tudíž v laterálním směru chovají jako poměrně samostatné jednomolekulové vrstvy tekutiny, v nichž je tok látek vzájemně do značné míry nezávislý.<sup>8</sup> Pohyb molekul lipidů je v rámci jedné monovrstvy poměrně rychlý (molekula lipidu oběhne membránu buňky za asi 1 s).<sup>6</sup> Energeticky velmi nevýhodný je přenos lipidů do druhé monovrstvy nebo opuštění membrány. Výsledné vlastnosti membrán jsou výrazně závislé na jejich složení, které je velmi variabilní, odlišné pro různé orgány, organely i jednotlivé strany membrán.

V následujících kapitolách se zaměříme na jednotlivé složky membrány a jejich specifické vlastnosti a funkce.

### 1.1.1 Lipidy

Lipidové dvojvrstvy jsou hlavním stavebním kamenem buněčných membrán. Lipidy mají v tělech organismů obecně tři úkoly: Jsou výhodnou zásobárnou energie, tvoří buněčné membrány a účastní se signálních a rozpoznávacích mechanismů v těle.<sup>9</sup> Lipidy jsou syntetizovány hlavně v endoplasmatickém retikulu, Golgiho aparátu a mitochondriích<sup>9</sup> a jsou poté distribuovány do ostatních membrán v těle.

Z molekulárního hlediska jsou lipidy amfifilní molekuly sestávající se z hydrofilní a hydrofobní části - polární „hlavy“ a nepolárního „ocasů“. Jako většina ostatních amfifilních molekul, i lipidy tvoří ve vodném prostředí agregáty různých tvarů, jako jsou micely, lipozomy nebo dvojvrstvy tak, aby byla minimalizována styčná plocha mezi vodou a hydrofobními částmi molekul. Tvar těchto agregátů závisí na poměru povrchu polární hlavy, objemu a délky nepolárního těla a na koncentraci amfifilní látky v roztoku. Vlivem nekovalentních interakcí preferují membránotvorné lipidy uspořádání do dvojvrstvy, která se posléze sama složí do vrstvy obklopující buňku či organelu - membrány. Některé lipidy jako např. cholesterol tvoří dvojvrstvy pouze ve směsích s ostatními lipidy.<sup>2</sup> Přestože uspořádání lipidů do lipidové dvojvrstvy výrazně sníží entropii systému, je toto uspořádání energeticky nejvýhodnější, jelikož se tím minimalizují interakce mezi vodním prostředím a hydrofobními částmi lipidů. Vytvoření okraje membrány je energeticky náročné, a tak jsou membrány schopné samoopravných procesů.<sup>4</sup> Případnou trhlinu ve svém povrchu dokáží zacelit a tím opět minimalizovat interakce mezi nepolárním jádrem membrány a vodním prostředím.

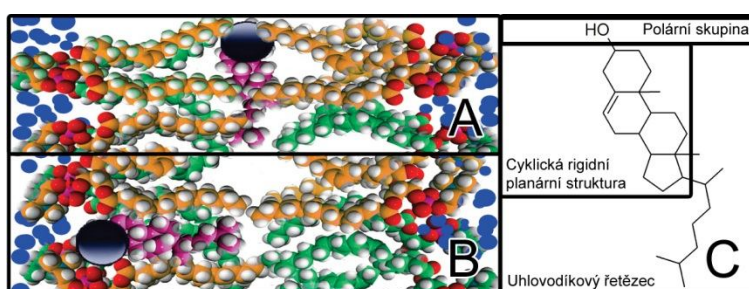
#### 1.1.1.1 Struktura a druhy lipidů

V tělech organismů se nachází několik tisíc druhů lipidů.<sup>3</sup> Malými změnami ve složení svých membrán jsou organismy schopné přizpůsobovat vlastnosti těchto membrán, a tím i zvyšovat šanci na své přežití. Nejvýznamněji zastoupenými lipidy v membránách jsou glycerofosfolipidy (viz Obrázek 2). V membráně se často vyskytují i steroly (v živočišných buňkách cholesterol a v rostlinných buňkách ergosterol nebo sitosterol)<sup>3</sup> a sfingolipidy.



zkratky a délka) např. nasycené kyseliny laurová (L, C12:0), myristová (M, C14:0), palmitová (P, C16:0), nebo stearová (S, C18:0) nebo mononenasycené olejové (O, C18:1), nebo vícenenasycené linolové (LO, C18:2). Délka acylového řetězce a jeho nasycenost jsou posléze klíčovými faktory pro určování mechanických vlastností membrány.

Sfingolipidy<sup>11</sup> jsou strukturně založené na sfingosinu.<sup>12</sup> Lipid tvořený acylovým řetězcem napojeným amidovou vazbou na sfingosin se nazývá ceramid (Obrázek 2). Ceramidové řetězce jsou obvykle nasycené nebo trans-nenasycené<sup>9</sup> a tvoří základ membrány vnější vrstvy pokožky stratum corneum.<sup>13</sup> Na polární část sfingosinu se mohou vázat další polární skupiny – fosfocholínovou skupinu obsahují sfingomyeliny,<sup>12</sup> glykolipidy se vyznačují sacharidovou skupinou – od jednoduchých cukerných zbytků až po rozvětvené oligosacharidy.<sup>12</sup> Glykosfingolipidy slouží na povrchu plasmatické membrány jako signální molekuly.



Obrázek 3 *Flip-flop cholesterolu v lipidové membráně.*<sup>10</sup> V membránách obsahujících vícenenasycené mastné kyseliny je často ve středu membrány orientován rovnoběžně s jejím povrchem (A), v membránách obsahujících převážně nasycené kyseliny je orientován rovnoběžně s ostatními lipidy (B). Struktura cholesterolu (C) ukazuje malou polární skupinu, rigidní strukturu sterolových kruhů a nepolární flexibilní uhlovodíkový řetězec.

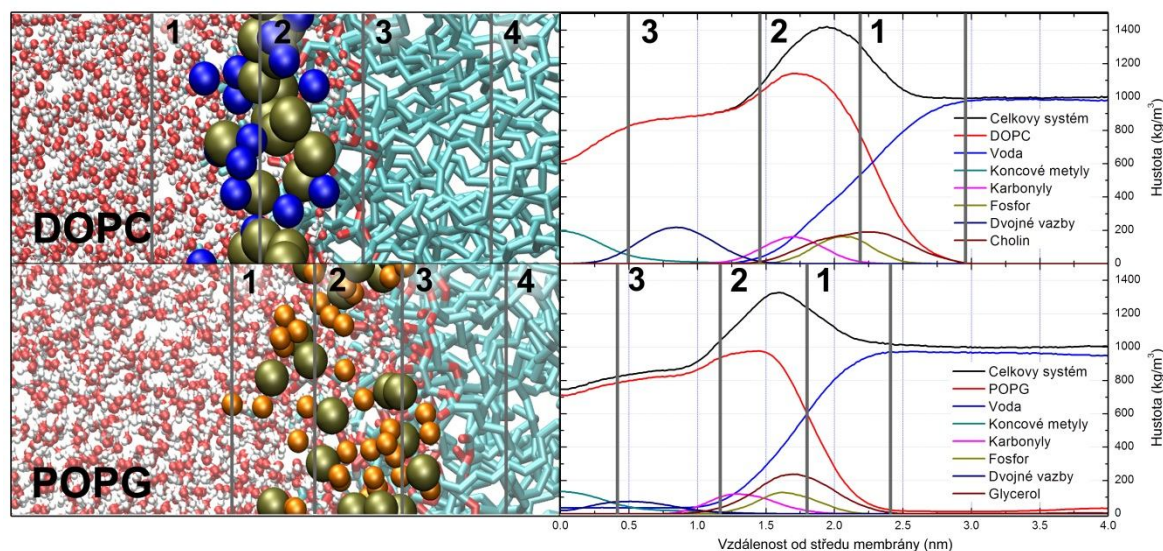
**Steroly** jsou mezi lipidy zvláštní kapitolou. V živočišných buňkách se vyskytuje cholesterol, který je takřka planární, složený ze čtyř uhlíkatých cyklů, postranních uhlovodíkových řetězců a hydroxylové skupiny (Obrázek 3).<sup>14</sup> Zatímco se ostatní lipidy v membráně orientují tak, aby byla jejich polární hlava v kontaktu s vodním prostředím a ostatními polárními hlavami, cholesterol může zaujímat dvě různé pozice. V membránách obsahujících nasycené řetězce mastných kyselin (např. dimyristoylfosfatidylcholin DMPC) je jeho polární část (hydroxylová skupina) orientována stejně jako ostatní lipidy, v membránách obsahujících vícenenasycené mastné kyseliny (PUFA) s malým obsahem mononenasycených mastných kyselin (např. palmitoylloleoylfosfatidylcholin POPC) leží cholesterol rovnoběžně s povrchem membrány v jejím středu mezi lipidovými vrstvami (viz Obrázek 3).<sup>10</sup> Střídání těchto dvou poloh se nazývá flip-flop a jeho frekvence je závislá na stupni nenasycenosti acylů mastných kyselin.<sup>15</sup> Zvyšování frekvence flip-flopu při zvyšování nenasycenosti lipidů je považováno za součást signálních mechanismů buňky.<sup>10</sup>

Jelikož je polární hlava sterolů v porovnání s nepolárním tělem velmi malá, netvoří samy o sobě lipidové dvojvrstvy. Cholesterol je dobře mísitelný s lipidy a tato mísitelnost závisí také na fázovém stavu (fluid state) membrány – zvyšuje se s nenasyceností acylových řetězců.<sup>9</sup>



### 1.1.1.2 Struktura lipidové dvojvrstvy

Lipidová membrána je velmi heterogenním prostředím. Pro popis struktury vlastností lipidových membrán se často používá model čtyř oblastí lipidové dvojvrstvy (four region model) zavedený Marrinkem a Berendsenem<sup>16</sup> (případně podobné modely Nealův<sup>17</sup> nebo Orsiho<sup>18</sup>). V této práci bude nadále používán Marrinkův model čtyř oblastí, který popisuje na základě fyzikálně-chemických vlastností a hustoty lipidů čtyři oblasti podél osy kolmé na membránu, postupujeme z vodného prostředí směrem ke středu membrány (viz Obrázek 4):



Obrázek 4 Struktura membrány DOPC (nahore) a POPG (dole) s ukázanými hranicemi jednotlivých oblastí podle modelu čtyř oblastí. Vlevo: Struktura modelu membrán, kyslíky jsou zobrazené červeně, vodíky bíle, lipidové uhlovodíkové řetězce světle modře, fosfory jsou olivové, dusíky tmavě modré a glycerolové uhlíky (na membráně POPG) oranžově. Vpravo: Hustotní profily jednotlivých skupin v membránách.

- 1) Oblast nízké hustoty polárních hlav (low head group density – region 1) je polární oblastí s podobnými podmínkami jako se nacházejí ve vodě. Končí tam, kde je hustota polárních hlav a vody přibližně stejná.
- 2) Oblast vysoké hustoty polárních hlav (high head group density – region 2) se rozkládá mezi regionem 1 a místem, kde hmotnostní zastoupení vody klesá pod 1 % a mizí voda jako oblast (jsou zde pouze samostatné molekuly vody). Polární molekuly zůstávají v tomto regionu, jelikož je zde drží silné elektrostatické interakce.<sup>19,20</sup>
- 3) Oblast vysoké hustoty acylových řetězců (high density of acyl chains – region 3) je hydrofobní a obsahuje dvojně vazby nenasycených řetězců.
- 4) Oblast nízké hustoty acylových řetězců (low density of acyl chains – region 4) se rozkládá ve středu membrány a skládá se hlavně z metylových koncových skupin. Celková hustota hmoty je zde nižší než v jiných oblastech membrány, tudíž je pohyb molekul obvykle rychlejší. Tyto dvě hydrofobní oblasti (oblast 3 a 4) tvoří hlavní bariéru pro přechod nízkomolekulárních molekul podobných typickým léčivům, které jsou obvykle rozpustné ve vodném prostředí.<sup>19,20</sup>

### 1.1.1.3 Biosyntéza lipidů

V buňce jsou lipidy syntetizovány převážně v endoplasmatickém retikulu,<sup>21</sup> ale celá řada dalších potřebných dějů probíhá v ostatních organelách (např. v mitochondriích probíhá dekarboxylace fosfatidylserinu na fosfatidyletanolamin). Lipidy se laterálně volně a rychle pohybují, avšak přenos lipidů přes cytosol mezi jednotlivými membránami již není tak jednoduchý. Rovnovážné transporty (jejichž výsledkem je směs lipidů se stejným složením jako výchozí membrána) mohou vycházet z tvorby liposomů, ovšem specifické složení každé membrány je dosaženo pomocí proteinů - transportérů.<sup>21</sup>

### 1.1.2 Složení buněčných membrán

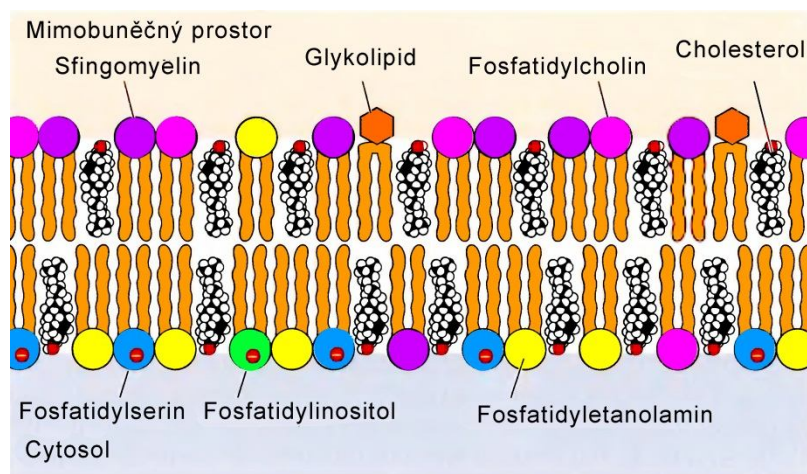
Přestože je složení biologických membrán velmi pestré, je možné je popisovat ve zjednodušené podobě. Při takovém popisu zanedbáme vliv délky a nasycenosti acylových zbytků lipidů a popíšeme složení membrán na základě lipidových typů – pouze podle složení polárních hlav.

Membrány savčích buněk se skládají hlavně ze čtyř typů glycerofosfolipidů – fosfatidylcholinu (PC, přibližně 50 % obsahu), fosfatidyletanolaminu (PE, 10 %), fosfatidylserinu (PS, 5 %), fosfatidylinositolu (PI, 1 %), dále pak sfingolipidů (SL, 10 %) a cholesterolu (Chol, 10 %)<sup>22</sup> (viz Tabulka 1). Toto složení se ovšem výrazně liší v závislosti na typu membrány a dokonce i na jednotlivých stranách membrány.

**Tabulka 1** – Hmotností zastoupení jednotlivých lipidů v membránách savčích buněk. Tabulka převzata z Ref. <sup>4</sup>

	Hmotnostní zastoupení lipidů (%)			
	Plasmatická membrána		Endoplasmatické retikulum	Mitochondrie
	Játra	Červené krvinky		
Cholesterol	17	23	6	3
Fosfatidyletanolamin	7	18	17	25
Fosfatidylserin	4	7	5	2
Fosfatidylcholin	24	17	40	39
Sfingomyelin	19	18	5	0
Glykolipidy	7	3	Stopové množství	Stopové množství
Ostatní	22	13	27	21

V plasmatické membráně je na cytosolické straně nadbytek glycerofosfolipidů s negativním nábojem (jako jsou fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol a kyselina fosfatidová) a na vnější straně membrány je nadbytek lipidů s cholinovou skupinou (fosfatidylcholinu, sfingomyelinu) a glykosfingolipidů (viz Obrázke 5). Jestliže je zastoupení jednotlivých lipidů na stranách membrány rozdílné, je tento rozdíl extrémní hlavně v případě glykolipidů, které tvoří asi 5 % vnější strany plasmatické membrány, ale na její cytosolické straně se prakticky nevyskytují. V případě membrány endoplasmatického retikula je její asymetrické složení také uvažováno,<sup>9</sup> ovšem objevují se i studie, které membránu ER považují za symetrickou.<sup>21,22</sup>



Obrázek 5 *Asymetrické složení plasmatické membrány. Na cytosolické straně membrány je přebytek lipidů s negativním nábojem, na vnější straně membrány je nadbytek sfingolipidů a lipidů s cholinovou skupinou. Obrázek převzat z Ref.<sup>7</sup>*

### 1.1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti membrán

Biologické membrány nejsou ve skutečnosti tvořeny jen lipidovou dvojvrstvou, ale směsí proteinů a lipidů. Výsledné vlastnosti membrán jsou tedy ovlivněny mnoha faktory. I kdybychom zanedbali vliv proteinů, stále je obtížné rozlišit a pojmenovat vliv jednotlivých lipidů. Lipidové membrány se vyznačují velmi variabilním fázovým chováním. Mohou zastávat fáze pevné (tzv. solid-like) i kapalné – uspořádané (liquid ordered) a neuspořádané (liquid disordered).<sup>9</sup> Teplota fázového přechodu mezi pevnou a kapalnou fází je jednou z důležitých vlastností membrán a je závislá na složení lipidů. Na směsné membráně se mohou jednotlivé fáze dokonce střídát např. ve formě tzv. lipidových raftů (lipid rafts).<sup>11</sup> Lipidové rafty jsou shluky lipidů se zvýšeným zastoupením cholesterolu, sfingomyelinu a lipidů s dlouhými nasycenými řetězci. Takové směsi lipidů jsou lokálně v kapalně uspořádané fázi<sup>11</sup> a tímto uspořádáním a dalšími vlastnostmi (např. tloušťkou) poskytují vhodné podmínky membránovým proteinům.

Fázové chování je primárně ovlivněno složením acylových řetězců v lipidech. Za fyziologických teplot jsou pevné fáze tvořeny hlavně sfingomyelinu a jinými lipidy s dlouhými nasycenými řetězci, jejichž směsi mají vysokou teplotu fázového přechodu. Naopak kapalné fáze jsou většinou tvořeny lipidy s kratšími nenasycenými řetězci – typicky glycerofosfolipidy. Cis-dvojná vazba způsobují, že je energeticky náročnější uspořádat lipidové řetězce do pravidelné mřížky, ohyby v řetězci mastné kyseliny snižují hustotu membrány a zvyšují plochu povrchu potřebnou pro jeden lipid (tzv. area per lipid).<sup>23</sup> Uspořádané kapalné fáze se tvoří obvykle ve směsích se steroly. Vyznačují se sice výraznou pravidelností, ale zároveň se lipidy v této fázi rychle a volně pohybují. Neuspořádané kapalné fáze se také často tvoří ve směsích cholesterolu a fosfatidylcholinů a vyskytují se v membránách společně s uspořádanými kapalnými fázemi. Díky tomu, že vlastnosti membrány jsou při daných podmínkách závislé na jejím složení, jsou malé organismy schopné adaptace na různé teploty, neboť např. při nižších teplotách začnou syntetizovat lipidy s dvojnými vazbami, a tak si udrží své membrány stále elastické a funkční.<sup>4</sup>

Významný vliv na fyzikálně chemické vlastnosti membrán má cholesterol. Přestože je považován za jednoho z původců srdečních a koronárních onemocnění, je pro tělo nezbytný, neboť ovlivňuje fluiditu membrán. Hraje velmi významnou úlohu při separování fází v membránách a tvorbě lipidových raftů, čímž zřejmě ovlivňuje i funkce membránových proteinů. Cholesterol má vyšší afinitu k nasyceným a dlouhým řetězcům, čímž pomáhá tyto lipidy shlukovat a tak tvořit lipidové rafty.<sup>11</sup> Přítomnost cholesterolu také zvyšuje rigiditu několika prvních uhlíkových atomů v acylovém zbytku lipidů,<sup>22</sup> a tím snižuje elasticitu membrány a zvyšuje její celkovou stabilitu.<sup>24</sup> Fázová změna v čistě fosfolipidové membráně je obvykle ostrá, ovšem při přidání cholesterolu se vlastnosti membrány mění pozvolněji a membrána si uchovává některé vlastnosti obou fází.<sup>11</sup>



## 1.2 Metabolismus látek v těle

Látky tělu cizí (tzv. xenobiotika) jsou v tělech organismů metabolizovány různými více či méně složitými drahami. Pro popis jednotlivých fází tohoto koloběhu je možné použít model ADME – rozdělení jednotlivých dějů na Absorpci, Distribuci, Metabolismus a Exkreci.

### 1.2.1 Absorpce

Absorpci látek se myslí děje mezi přijetím látky a jejich vstřebáním do krevního řečiště. Do lidského těla se mohou xenobiotika dostat různými cestami – orálně (ústí: tablety, kapky), topicky (kůži: masti), injekčně, inhalačně atp.

- Orální podávání je pro příjemce látky nejjednodušší, podávaná látka ovšem přechází přes několik biologických bariér. K vyjádření, které látky mohou projít přes tyto bariéry se používá Lipinského pravidlo pěti.<sup>25,26</sup> To říká, že orálně podávaný lék nemá více než 5 donorů vodíkových vazeb, nemá více než 10 akceptorů vodíkových vazeb, má menší molární hmotnost než 500 Da a logP ( $P$  – partiční koeficient na rozhraní oktanol/voda) není větší než 5.<sup>26</sup> Látky přijímané orálně musí být uzpůsobené prostředí v zažívacím traktu (tj. v zažívacím traktu se začnou metabolizovat žádoucím způsobem nebo alespoň vydrží nezměněné).
- Topické podání látky je také pro uživatele výhodné a pohodlné, je vhodné i pro pacienty, kteří nemohou orálně přijímat léky (v bezvědomí, zvracející, nemožnost vstřebávání skrze zažívací trakt, apod.). Účinné látky zde neprocházejí zažívacím traktem, nedochází u nich tedy k degradaci vlivem gastrointestinálního prostředí.<sup>27</sup> Látky ovšem musí překonat kožní bariéru – obzvláště důležité a obtížné je překonání její svrchní vrstvy stratum corneum, která slouží jako hlavní ochrana těla před látkami z vnějšího prostředí.<sup>28</sup> Ačkoliv může být obtížné stanovit skutečně podanou dávku léku, je možné využívat pokožky jako rezervoáru léků s krátkým metabolickým poločasem.<sup>27</sup>
- Látky podávané injekčně vstupují přímo do krevního řečiště (intravenózně) nebo do svalů (intramuskulárně) či pod kůži (subkutánně).
- Ostatní formy podávání léků zahrnují obvykle aplikaci přímo v místě působení (oční kapky, inhalační spreje ...).

Tyto různé způsoby podávání látek se liší nejenom svou formou, ale také následným způsobem a rychlostí koloběhu v těle.

### 1.2.2 Distribuce

Jakmile se xenobiotika dostanou do krevního řečiště, jsou krví dopravovány do míst jejich metabolické přeměny – do vhodného orgánu, buňky a její organely. Látky v této fázi zpracování překonávají různé přirozené bariéry – buněčné membrány, hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier), apod.,<sup>29</sup> teprve po jejich překonání se obvykle dostanou ke skutečnému místu jejich účinku, nebo metabolické přeměny. Přes buněčné membrány látky

přecházejí buď pasivní permeací (bez nutnosti dodání energie), nebo aktivním transportem (obvykle za pomoci membránových proteinů).

### 1.2.3 Metabolismus

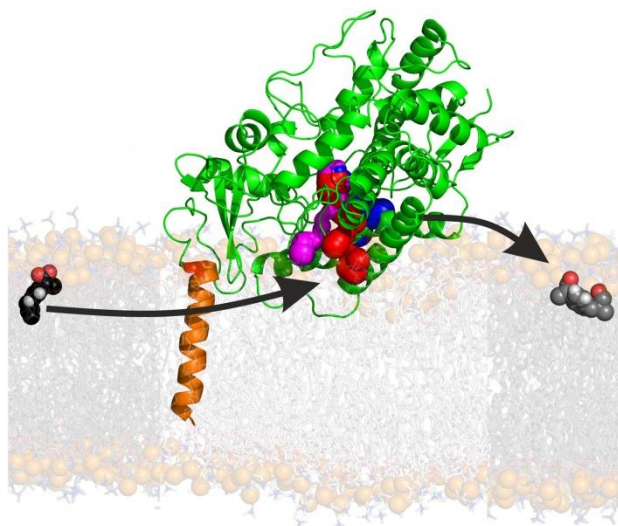
Přeměna látek na jiné začíná v některých případech ihned poté, co látky vstoupí do těla (např. cukry se začínají rozkládat již v ústní dutině). Centrem metabolismu mnoha nízkomolekulárních látek jsou játra. Z enzymů, které se metabolismu účastní je důležité se zmínit především o jaterních cytochromech P450 (CYP). Vzniklé metabolity pak mívají jiné chemické vlastnosti a biologické účinky než původní látky, některé svou metabolickou přeměnou ztrácí na účinnosti, jiné metabolity jsou naopak účinnější než původní látky (např. otrava metanolem je ve skutečnosti otrava jeho metabolitem – formaldehydem).

#### 1.2.3.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemové proteiny, které se vyskytují pravděpodobně ve všech živých organismech na zemi.<sup>30</sup> Přestože se CYP vyskytují mezi všemi říšemi v mnoha různých typech, mají všechny tyto enzymy podobnou strukturu. Navzájem se výrazně liší sekvencí, ovšem jejich sekundární a terciární struktura je velmi konzervovaná (Obrázek 6). Jejich název je odvozen z absorpčního spektra, ve kterém má Soretův pás CYP maximum absorbance při 450 nm.<sup>30</sup> V lidském organismu se předpokládá přítomnost asi 60 druhů CYP,<sup>30</sup> které jsou zodpovědné za většinu metabolismu nízkomolekulárních látek. Nalézají se v různých tkáních, od jater a ledvin, jakožto hlavních center metabolismu xenobiotik, až po srdce, plíce či mozek. Savčí jaterní CYP jsou zanořené do membrány svým N-terminálním koncem,<sup>31</sup> který slouží jako membránová kotva. Převážně se vyskytují na cytosolické straně membrány endoplasmatického retikula nebo v mitochondriích.<sup>30</sup> Při porovnávání různých krystalových struktur stejných CYP či jejich pozorování v molekulární dynamice se v jejich struktuře objevují vstupní a výstupní tunely vedoucí k aktivnímu místu zanořenému hluboko ve struktuře CYP. Těmito tunely do enzymu vstupuje substrát a vystupuje metabolit.<sup>32</sup>

Současnou hypotézou je, že poloha vstupů do těchto tunelů v membráně může ledacos napovědět o substrátech daného CYP,<sup>31</sup> jelikož je možné identifikovat rovnovážné pozice látek v membránách a ty poté porovnat se vstupními a výstupními místy z tunelů.

Pro studium metabolismu látek je tudíž zásadní znalost plasmatické membrány, kterou látka překonává při vstupu do buňky a membrán jejích vnitřních organel důležitých pro metabolismus – endoplasmatického retikula a mitochondrií. Tyto tři membrány obsahují významné zastoupení fosfatidylcholinů a fosfatidyletanolaminu, dále cholesterol, sfingomyelin (obzvláště v plasmatické membráně) a fosfatidylserin (viz Tabulka 1).



Obrázek 6 *Cytochrom P450 2C9 a jeho sekundární struktura (zeleně) je uchycen membránovou kotvou (oranžově) do membrány DOPC (šedě). Ibuprofen (černý) je umístěn v membráně hlouběji než 3-hydroxyibuprofen (šedý), což odpovídá polohám vstupních a výstupních tunelů (červená, fialová, modrá). Fosfory DOPC jsou vyznačeny jako oranžové koule, voda není pro přehlednost znázorněna. Obrázek pochází z připravované publikace.*

#### 1.2.4 Exkrece, vylučování

Pro zachování rovnováhy látek v organismu je nutné, aby byly látky i jejich metabolity z těla vylučovány. Tento děj je závislý hlavně na funkci ledvin, jelikož většina látek je vylučována močí.

### 1.3 Substráty

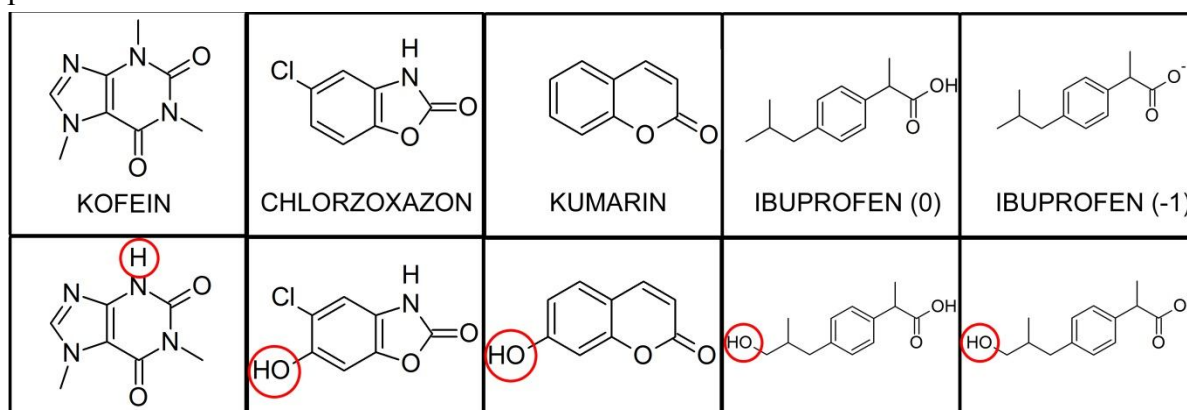
Pro otestování hypotézy o souvislosti polohy vstupů do tunelů CYP a rovnovážné polohy substrátů byly vybrány typické substráty jednotlivých cytochromů P450. Studovány byly molekuly kofeinu (substrát CYP1A2),<sup>30</sup> chlorzoxazonu (CYP2E1), kumarinu (CYP2A6) a ibuprofenu (CYP2C9) a jejich metabolity paraxantin, 6-hydroxychlorzoxazon, 7-hydroxykumarin a 3-hydroxyibuprofen (Obrázek 7).

Kofein (1,3,7-trimethyl-1H-purin-2,6(3H,7H)-dion) je stimulační alkaloid. Vyskytuje se v semenech, listech a plodech některých rostlin, jako je kávovník či čajovník, nebo kolové oříšky. Také je přítomen v ostatních rostlinách, kde působí jako přirozený paralyzující pesticid. Známé jsou jeho účinky na centrální nervový systém, oddaluje ospalost a zvyšuje pozornost. Předávkování kofeinem se projevuje mnoha příznaky, počínaje nervozitou, přes svalový třes, až po zrychlené bušení srdce. V lidském těle je metabolizován demethylací na CYP1A2 na paraxantin, theobromin anebo theofylin.

Chlorzoxazon (5-chloro-3H-benzooxazol-2-on) je používán jako svalový relaxant k léčbě křečí a s nimi souvisejících bolestí. Při těchto potížích pomáhá tak, že tlumí reflexy v míše, na svaly má tedy pravděpodobně pouze nepřímé účinky. Má také celkové sedativní účinky, případně může působit nevolnost. V těle je metabolizován na CYP2E1 na 6-hydroxychlorzoxazon.

Kumarin (1,2-benzopyron) je strukturním základem některých protisrážlivých léků (např. warfarinu) nebo antispasmodik (hymecromonu). Vyskytuje se např. ve vanilkové trávě, skořicovníku čínském či svízeli vonném. Do lidského těla se dostává se stravou nebo také kožní absorpcí z parfémů. Je metabolizován (mimo jiné) na CYP2A6 na 7-hydroxykumarin.<sup>33</sup>

Ibuprofen ((RS)-2-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová kyselina) je známá nesteroidní protizánětlivá látka s antipyretickými a analgetickými účinky. Může ovšem také způsobovat nevolnost, zažívací potíže či zvyšovat hladinu jaterních enzymů. V našich podmínkách je hojně využíván převážně pro své analgetické účinky. V lidském těle je metabolizován na CYP2C9 na 3-hydroxyibuprofen. Jak ibuprofen, tak jeho metabolit se mohou vyskytovat v nabitě i nenabitě formě, ve fyziologických podmínkách převažuje nabitá podoba.



Obrázek 7 Struktury jednotlivých substrátů (nahore) a jejich metabolitů (dole).

## 1.4 Počítačové simulace

Počítačové simulace molekulárních systémů nám umožňují přímo nahlížet do biologických dějů na atomární úrovni. Při počítačových simulacích pohybů atomů a molekul využíváme obvykle znalostí klasické, případně i kvantové mechaniky. Kompletní informaci o pohybu a vzájemných interakcích atomů jsme teoreticky schopni získat pouze pomocí kvantové mechaniky, která je ovšem natolik výpočetně náročná, že jí můžeme popisovat pouze malé a „lehké“ systémy (systémy obsahující pouze lehčí atomy). Proto pro popis pohybu atomů ve větších systémech používáme klasickou mechaniku a tzv. molekulovou mechaniku.

### 1.4.1 Molekulová mechanika

Molekulová mechanika (MM) popisuje potenciální energii atomů v systému jako funkci polohy těchto atomů. Při znalosti rovnovážné geometrie a vazebných a nevazebných parametrů (viz dále silové pole), můžeme spočítat potenciální energii dotyčného uspořádání.

#### 1.4.1.1 Silové pole

Silové pole, ve kterém pracuje molekulová mechanika, je souhrn parametrů pro výpočet potenciální energie, které lze rozdělit na vazebné (silové konstanty vazeb, vazebných úhlů a dihedralních úhlů) a nevazebné parametry (Lennard – Jonesův potenciál pro popis disperzních a repulzních interakcí) a parciální náboje pro výpočet elektrostatické interakce).

Pro výpočet pomocí MM je třeba znát konstanty silového pole pro každý simulovaný atom v systému. Tyto konstanty jsou zadávány v tzv. topologii - souborem konstant silového pole pro danou molekulu. Všechny molekuly jedné látky se stejnou topologií mají v potom systému stejné vlastnosti (s výjimkou polarizovatelných silových polí, které okolí molekuly zohledňují). I přes toto zjednodušení stále zůstává velké množství konstant, které je třeba stanovit. Z topologie každé molekuly je možné vyčíst její rovnovážnou geometrii a informace o vazbách vyskytujících se v ní. Pro popis nevazebných interakcí je potřeba znát mimo jiné parametry pro Lennard-Jonesovy potenciály, které by ovšem bylo třeba stanovit pro každou možnou interakci mezi dvěma atomy v systému. Z tohoto důvodu zavádíme tzv. atomové typy (atom types). Atomovým typem se myslí atom s určitými vlastnostmi – stupeň degenerace, nejbližší okolí apod. Např. skupina CH<sub>2</sub> v alkanech bude mít stejné parametry v butanu i pentanu, přestože by se pečlivými kvantově-chemickými výpočty pravděpodobně došlo k mírně rozdílným výsledkům. Tento rozdíl je ovšem tak malý, že vydané úsilí na zjištění přesnějších parametrů nemá většinou adekvátní důsledky, a tak jsou Lennard-Jonesovy interakce popisovány obecněji, jako např. „interakce mezi skupinou CH<sub>2</sub> v alkanech a nitrilovým dusíkem.“

Kromě využití atomových typů, umožňují silová pole některá další zjednodušení. Existují taková silová pole, která berou v úvahu všechny atomy v molekulách (all atom – AA). Tato silová pole detailně popisují všechny interakce v molekulách, jsou ovšem výpočetně nejnáročnější. Mírným zjednodušením jsou potom silová pole sdružených atomů (united atoms – UA), která nejčastěji sjednocují uhlíky s jejich nepolárními vodíky a ty poté popisují jako „větší a těžší“ pseudoatomy. Tato pole jsou obzvláště vhodná pro simulace lipidů, které obsahují dlouhé nepolární uhlovodíkové řetězce. Dalším zjednodušením jsou potom silová pole hrubozrná (coarse grained – CG), která sdružují větší skupiny atomů v jednu větší částici (tzv. „bead“), např. v silovém poli MARTINI se sdružují dvojice až čtveřice těžkých atomů do jedné „bead“ částice. Také se používá menší počet typů částic, např. v původním silovém poli MARTINI pro simulace lipidových dvojvrstev<sup>34</sup> byly definovány pouze čtyři typy částic: Polární (nenabitě skupiny), nepolární (smíšeně polární a apolární skupiny), apolární (hydrofobní skupiny) a nabitě částice. Poté byly přidány další podskupiny zahrnující vlivy vodíkových vazeb a umožňující tak i simulaci proteinů.<sup>35</sup>

#### 1.4.1.2 Jednotlivé členy potenciální energie v MM<sup>36</sup>

Potenciální energie vypočítaná pomocí molekulové mechaniky se skládá z jednotlivých výpočetně oddělitelných složek. Tyto složky jsou poté popisovány pomocí jednoduchých mechanických modelů. Například vazby jsou v molekulové mechanice chápány jako pružiny – harmonické oscilátory. Pro výpočet příspěvku potenciální energie  $V$  z pozice atomů (tj. vzdálenosti atomů) potřebujeme znát silovou konstantu pružiny a rovnovážnou délku vazby (Rovnice 1).

$$V_b(\mathbf{r}_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (\mathbf{r}_{ij} - \mathbf{r}_{ij}^0)^2, \quad (1)$$

kde  $k_{ij}$  je silová konstanta vazby,  $r_{ij}^0$  je rovnovážná vzdálenost atomů a  $r_{ij}$  je aktuální vzdálenost atomů.

Vazebné úhly jsou také reprezentovány harmonickým oscilátorem, pro výpočet jejich příspěvku k potenciální energii je nutná znalost rovnovážného vazebného úhlu a silové úhlové konstanty (Rovnice 2):

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^{\theta} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2, \quad (2)$$

kde  $k_{ijk}$  je silová konstanta úhlu,  $\theta_{ijk}$  a  $\theta_{ijk}^0$  jsou aktuální a rovnovážný úhel vazby.

Dihedrání úhly můžeme rozdělit na dvě skupiny – nepravé dihedrání úhly a torzní úhly. Nepravé dihedrání úhly je opět možné popisovat harmonickým potenciálem (Rovnice 3):

$$V_{id}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2} k_{\xi}^{\theta} (\xi_{ijkl} - \xi_{ijkl}^0)^2, \quad (3)$$

kde  $k_{\xi}$  je silová konstanta úhlu,  $\xi_{ijkl}$  a  $\xi_{ijkl}^0$  jsou aktuální a rovnovážný úhel vazby. Torzní dihedrání úhly potřebují ke svému popisu další parametr, kterým je multiplicita – tedy množství možných ekvivalentních poloh v rámci  $360^\circ$  (Rovnice 4).

$$V_a(\phi_{ijkl}) = k_{\phi} (1 + \cos(n\phi - \phi_s)), \quad (4)$$

kde  $k_{\phi}$  je silová konstanta úhlu,  $n$  je multiplicita úhlu,  $\phi$  a  $\phi_s$  jsou úhel a rovnovážný dihedrání úhel.

Nekovalentní interakce (repulze, disperze a elektrostatické interakce) jsou reprezentovány Lennardovým–Jonesovým potenciálem a Coulombickým potenciálem. Lennardův–Jonesův potenciál obsahuje jak repulzní, tak disperzní člen (Rovnice 5)

$$V_{LJ}(r_{ij}) = \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6}, \quad (5)$$

ve kterém parametry  $C_{ij}$  závisí na typech interagujících atomů,  $r_{ij}$  je vzdálenost těchto dvou atomů.

Coulombický potenciál lze získat z Coulombova zákona (Rovnice 6)

$$V_c(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}, \quad (6)$$

kde  $q_i$  a  $q_j$  jsou parciální náboje na daných atomech,  $r_{ij}$  je jejich vzdálenost a  $\epsilon_r$  a  $\epsilon_0$  jsou relativní permitivita a permitivita vakua.

V členech vazebných interakcí se neprojevuje momentální okolí molekuly, v konstantách vystupujících ve členech nekovalentních interakcí se odráží i toto okolí – repulzní a disperzní síly mezi jednotlivými atomy, případně elektronegativita okolí promítnutá do podoby parciálního náboje apod.

Při výpočtu vazebných interakcí se uvažují pouze molekuly spojené danou interakcí – sousední atomy v molekule v případě vazeb, vzdálenější sousedé pro úhly a čtyři sousední atomy v případě dihedrání úhlů. Tyto atomy jsou posléze vyloučeny z výpočtu

vzájemných nekovalentních interakcí (např. jsou-li dva atomy spojené vazbou, jsou jejich vzájemné elektrostatické interakce již promítnuté do jejich vazebné silové konstanty). Při výpočtu energie nekovalentních interakcí je možné použít dalších zjednodušení vycházejících z jejich krátkého dosahu. V případě rychle vyhasínajícího Lennardova-Jonesova potenciálu se obvykle uvažují nekovalentní interakce do vzdálenosti 1 nm, jelikož výpočet vzdálenějších interakcí příliš nevylepší přesnost výpočtu, ale neúměrně zvýší časovou náročnost výpočtu. Síla coulombických interakcí v prostoru klesá pomaleji, proto jsou od stanovené vzdálenosti počítány pomocí upravené metody Ewaldovy sumace (PME).

Stanovování parametrů silového pole je proces takřka alchymický. Některé konstanty, jako např. silové konstanty vazeb či úhlů, mohou být stanovovány pomocí kvantově-chemických výpočtů, ovšem veškeré konstanty musí být posléze upravovány tak, aby byly vlastnosti výsledných modelů shodné s experimentálními daty. Konstanty nutné pro výpočet Lennardova-Jonesova potenciálu jsou pevnou součástí silového pole a určují v podstatě „velikost“ atomu daného typu. Je nutno podotknout, že určení parametrů silového pole a parciálních nábojů je klíčové pro průběh simulace, a proto se jím ještě budeme zabývat.

### 1.4.2 Molekulová dynamika

Molekulová dynamika spolupracuje s molekulovou mechanikou tak, že z gradientu potenciální energie  $V$  vypočítá sílu působící na každý atom. Tato síla  $F_i$  se pomocí Newtonových zákonů převede na zrychlení a ovlivní tak rychlost daného atomu (Rovnice 7).

$$-\frac{\partial V}{\partial r_i} = F_i = \frac{d^2 r_i}{dt^2} m_i, \quad (7)$$

kde  $r$  je poloha atomů,  $t$  je příslušný čas a  $m_i$  je hmotnost atomu.

Při počítačových simulacích není možné počítat zcela spojitou trajektorii, která by odpovídala reálnému systému. Proto nastavujeme vhodnou délku simulačního kroku, ve kterém považujeme podmínky v systému za konstantní. Jinými slovy, síly působící na každý atom vyhodnotíme pouze jednou za určitou dobu, mezi dvěma kroky předpokládáme, že se síly působící na atom nemění. V simulačním programu GROMACS se postupuje tzv. „leap-frog“ algoritmem, kdy se střídavě vyhodnocují rychlosti a polohy (Rovnice 8 a 9).

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m} F(t) \quad (8)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t v(t + \frac{1}{2}\Delta t), \quad (9)$$

kde  $v(t)$  je rychlost atomů v daném čase  $t$ .

Celý MM a MD výpočet je opakován v každém simulačním kroku – v každém kroku je počítán gradient potenciální energie na každém atomu, poté jeho rychlost a směr pohybu a výsledná poloha. Délka simulačního kroku musí odpovídat nejrychlejším dějům, které mají vliv na danou simulaci. V případě simulací AA nebo UA jsou nejrychlejším dějem vibrace vazeb, proto bývá délka simulačního kroku obvykle 1 nebo 2 fs. V případě simulací CG již

není možné sledovat vibrace vazeb, simulační krok může být tudíž adekvátně prodloužen v závislosti na hrubosti použitého pole.

### 1.4.3 Periodické okrajové podmínky

Simulování systému podobné velikosti, s jakou se běžně setkáváme v laboratořích, by bylo výpočetně nedosažitelné. I kdybychom měli malou 20ml kádinku s vodou, měli bychom v ní cca 1 mol molekul, cca 3 mol atomů. Popis takového systému výpočetně možný – jak z hlediska množství částic, tak z hlediska zanesených chyb.<sup>37</sup> Pokud ovšem vytvoříme izolovaný systém několika desítek tisíc atomů, tak nebude dobře reprezentovat makroskopický systém, jelikož interakce s povrchem tohoto systému budou příliš významné (stačí porovnat např. změnu vlastností nanočástic určité látky vůči chování téže látky v makroskopickém měřítku). Proto se používá princip periodických okrajových podmínek (periodic boundary condition, PBC). Při použití PBC máme malý systém, který ovšem není uzavřený pevnou zábranou, ani nesousedí s vakuem, ale ve všech směrech je v jeho okolí umístěn totožný systém. Výpočet pohybu atomů se provádí pouze pro atomy v simulačním boxu, atomy v sousedních boxech se pohybují stejně. Pro výpočet jejich interakcí se sousedními atomy jsou ovšem uvažovány i odrazy atomů v sousedícím simulačním boxu.

### 1.4.4 Studium chování látek na membránách simulačními technikami

Chování látek na buněčných membránách je možné popisovat pomocí partičních a difúzních koeficientů, které lze získat i simulačními technikami. Partiční koeficienty je teoreticky možné získat dlouhou volnou simulací, která ukáže relativní zastoupení látky v dané hloubce membrány. Partiční koeficienty v jednotlivých hloubkách membrány  $K(z)$  je posléze možné převést na profil volné energie  $\Delta G(z)$  podél osy kolmé na membránu (normály) pomocí Boltzmannova vztahu (Rovnice 10):

$$\Delta G(z) = -RT \ln K(z), \quad (10)$$

kde  $R$  je molární plynová konstanta a  $T$  termodynamická teplota.

Pro svou jednoduchost je pro termodynamický popis chování látek na membránách používán profil volné energie – srozumitelně poskytuje dostatek informací – energetické bariéry i pravděpodobnost výskytu v určitém stavu. Pro stanovení celého profilu volné energie je nutné mít dostatek dat ze všech jeho oblastí, jelikož rozdíl energií mezi dvěma místy je závislý na podílu pravděpodobností výskytu látky v daných místech. Jelikož je velká část látek používaných jako léky mírně polární a membrána je velmi heterogenním prostředím s velkými rozdíly v polaritě (od čistě vodného prostředí přes polární hlavy lipidů až k nepolárnímu jádru membrány), trvalo by velmi dlouho, než by byla všechna možná místa ve stavovém prostoru navštívena látkou ve volné simulaci. Polární molekuly by se pravděpodobně zastavily v oblasti polárních hlav a do hydrofobního středu membrány by samovolně nemusely proniknout, nebo by se naopak zadržely pouze v membráně. Proto je výhodné využít řízené simulace (biased simulation), které umožňují důkladně prozkoumat všechny pozice látek v membráně a z takto získaných dat posléze získat profil volné energie, případně další informace jako např. difúzní koeficienty. Ve chvíli, kdy je znám profil volné energie a difúzní koeficienty v různých hloubkách membrány, je možné vyhodnotit tzv. odpor



membrány (membrane resistance,  $R$ ), který kvantitativně určí průchodnost nebo neprůchodnost membrány danou látkou (Rovnice 11).<sup>38</sup>

$$R = 1/P = \int_{z_1}^{z_2} R(z) dz = \int_{z_1}^{z_2} \frac{\exp(\frac{\Delta G(z)}{kT})}{D(z)} dz \quad (11)$$

kde  $P$  je permeabilita membrány a  $D(z)$  je transversální difúzní koeficient.

Za posledních 20 let se na poli řízených simulací učinil výrazný pokrok. Byly vyvinuty rozličné metody získávání profilu volné energie různých dějů, např. umbrella sampling,<sup>39,40</sup> metoda z-constraint,<sup>16,18,38,41–44</sup> metadynamika,<sup>45,46</sup> „adaptive biasing force“,<sup>47,48</sup> vkládání částic<sup>38</sup> a další.<sup>49,50</sup>

Jak metoda umbrella sampling, tak z-constraint využívají toho, že ovlivňují vzdálenost mezi dvěma systémy – v našem případě mezi zkoumanou molekulou substrátu či metabolitu a membránou. Oba typy simulací vycházejí z výchozí vzdálenosti mezi molekulou a středem membrány. Metoda umbrella sampling vytvoří kolem této vzdálenosti harmonický potenciál. Zkoumaná molekula se může pohybovat, ovšem čím více se vzdálí od původní pozice (bráno dle osy kolmé na membránu, v rovině membrány se pohybuje zcela volně), tím větší síla na ni bude působit (síla působící na molekulu je úměrná druhé mocnině vychýlení z původní polohy). Molekula se tudíž v průběhu simulace posunuje do pozice s nižší energií, ovšem pouze tak daleko, aby energetický zisk z nové pozice byl stejný jako potenciál aplikovaný na molekulu v dané vzdálenosti od původní polohy. Volná energie v daném místě je poté vypočítána ze vztahu (Rovnice 12)

$$\Delta G(z) = -RT \ln P(z) + U(z), \quad (12)$$

kde  $P(z)$  a  $U(z)$  jsou distribuce ligandu a potenciál umbrelly.

Při použití simulace z-constraint je molekula ligandu zafixována v počáteční vzdálenosti od středu membrány a je měřena síla potřebná k udržení ligandu v této vzdálenosti. Volná energie je posléze počítána jako (Rovnice 13):

$$\Delta G(z) = -\int_{outside}^z \langle \vec{F}(z') \rangle_t dz', \quad (13)$$

kde  $\langle F \rangle$  je střední hodnota použité síly.

Tyto simulace byly v posledních desetiletích použity ke studiu mnoha nízkomolekulárních látek na membránách. Marrink a Berendsen<sup>16</sup> (1994) se zabývali profilem volné energie vody na membráně, který studovali třemi různými způsoby, každým po dobu 120 ps. Nejprve vyhodnocovali volnou simulaci vody a membrány, ale zjistili, že volná simulace nevede k žádaným výsledkům, jelikož průnik vody membránou je proces sice přirozený, ale poměrně vzácný. Dále studovali volnou energii pomocí vkládání částic do membrány (kdy je sledována energie potřebná k vložení částice na dané místo) a také pomocí metody z-constraint. Ta byla používána i dále, v následné studii<sup>38</sup> (1996), kdy byly studovány molekuly vody, amoniaku a kyslíku a několik Lennard – Jonesovských částic. Simulace byly

tentokrát prodlouženy na 200 ps. V této době byly stovky ps považovány za dostatečný čas pro dosažení konvergovaných výsledků, jelikož ty souhlasily i s experimentálními daty. Simulace metodou z-constraint byly následně používány i pro větší molekuly a také byly prodloužovány až do 200 ns pro každé simulační okno, které použil Orsi s Essexem při studiu  $\beta$ -blokátorů.<sup>18</sup>

Simulace se prodlužovaly i v případě použití metody umbrella sampling, a tak se napříč použitými metodami (jak v případě metody z-constraint, tak při použití umbrella samplingu) začaly ukazovat systematické chyby, které při kratších simulačních časech nebyly zřetelné. Boggara a Krishnamoorti<sup>41</sup> zjistili při studiu nabitě a neutrální formy ibuprofenu a aspirinu na dipalmitoylfosfatidylcholinové dvojvrstvě (DPPC), že tyto léky – a hlavně jejich nabitě formy – způsobují při simulaci metodou z-constraint deformace membrány. K podobným závěrům došel MacCallum,<sup>51</sup> který studoval boční řetězce aminokyselin na dioleoylfosfatidylcholinové dvojvrstvě (DOPC) pomocí umbrella samplingu. Pro každé simulační okno použil simulaci dlouhou alespoň 30 ns a při simulacích pozoroval deformace membrány, které nazval „vodní defekty“ (water defects). Tyto defekty byly nedávno blíže analyzovány Nealem,<sup>17</sup> který zjistil, že tyto systematické chyby byly až do té doby výrazně podceňovány a pro jejich odstranění je třeba řádově prodloužit simulace oproti tomu, na co byla membránová komunita do té doby zvyklá. Tím se řízené simulace prodloužily z původních 120 ps na stovky ns pro jedno simulační okno.

Deformace membrány a tím pádem i systematické chyby při výpočtu profilu volné energie pravděpodobně pocházejí z nerovnovážných stavů systému na začátku simulace, a proto by se bylo vhodné zaměřit i na způsob generování těchto startovních struktur. Neale<sup>17</sup> používal ve své studii metodu inflategro,<sup>52</sup> při které je membrána roztažena, vloží se molekula a poté se membrána opět stáhne a zrelaxuje. Boggara a Krishnamoorti<sup>41</sup> vkládali molekuly ručně pomocí programu VMD<sup>53</sup> a ostatní používali nepřehledné množství metod, jako např. růst molekuly v simulaci z nulové velikosti,<sup>18</sup> tažení molekuly do membrány,<sup>31</sup> struktury z volné simulace<sup>54</sup> nebo třeba určovali reakční koordinátu pomocí metadynamiky.<sup>45</sup> Teprve nedávno jsme publikovali systematickou studii zabývající se vlivem startovních struktur a volby řízených simulací na výsledný energetický profil.<sup>55</sup> (viz Příloha 8.2)

## 2. Cíle práce

Cílem této práce je srovnání chování biologicky aktivních látek na různých modelech buněčných membrán s chováním jejich metabolitů na těchto membránách. Systematicky jsou studovány substráty cytochromů P450 s významnými biologickými účinky (kofein, chlorzoxazon, kumarin a ibuprofen) a jejich metabolity. Je analyzován profil volné energie při průchodu látek lipidovými dvojvrstvami (DOPC, POPG) použitými jako modely biologických membrán a dále se práce zabývá rovnovážnými pozicemi zkoumaných látek v těchto membránách.

Pro systematické studium konvergence profilu volné energie látky na membráně byl použit systém obsahující DOPC membránu a molekulu kumarinu. Byl analyzován vliv startovních struktur získaných volnou simulací a tažením molekuly do membrány silou (tzv. pulling) a byly srovnány dvě metody výpočtu profilu volné energie – umbrella sampling a z-constraint.

## 3. Metody

### 3.1 Membrány

Modely membrán byly staženy ze serveru Lipidbook.<sup>56</sup> Dvojvrstva složená z dioleoylfosfatidylcholinu (DOPC) byla připravená a ekvilibrovaná Siu et al.,<sup>57</sup> Dvojvrstva složená z palmitoylfosfatidylglycerolu (POPG) byla připravená dle Kukol et al.<sup>58</sup> Obě membrány obsahovaly 128 molekul lipidů, 64 v každé vrstvě. Membrány byly orientovány kolmo k ose z a systém byl stabilizován 10ns simulací s molekulami vody a NaCl tak, aby byla dosažena fyziologická koncentrace soli 0,154 M ve vodě, k membráně POPG bylo přidáno ještě 128 Na<sup>+</sup> iontů pro dosažení elektroneutality.

Pro všechny MD simulace v této práci byl použit programový balík GROMACS 4.0.7<sup>59</sup> a silové pole Berger,<sup>60</sup> které bylo vyvinuté speciálně pro lipidy. Toto silové pole snižuje počet simulovaných atomů tím, že používá tzv. sdružené atomy (united atoms – UA), které sdružují uhlíky s jejich nepolárními vodíky. Toto zjednodušení pravděpodobně ovlivňuje určování difúzních koeficientů, které se při použití UA zdají vyšší než při využití polí se všemi atomy.<sup>61</sup> Použitý simulační krok byl dlouhý 2 fs, periodické okrajové podmínky byly zavedeny ve všech směrech, pro výpočet elektrostatických interakcí byla využita Ewaldova sumace (particle-mesh Ewald, PME)<sup>62</sup> a van der Waalsovy interakce obsažené v Lennardově-Jonesově potenciálu byly uvažovány do 1 nm. Pro modelování vazeb byl použit algoritmus LINCS,<sup>63</sup> V-rescale termostat<sup>64</sup> při teplotě 310 K a Berendsenův anisotropický barostat<sup>65</sup> s tlakem 1 bar.

### 3.2 Pozice molekul na membránách DOPC a POPG

Struktury a topologie substrátů a metabolitů byly vytvořeny pomocí serveru PRODRG2Beta<sup>66</sup> v silovém poli GROMOS 53a6.<sup>67</sup> Parciální náboje byly přepočítány pomocí metody RESP (restrained electrostatic potential). Elektrostatický potenciál (ESP) a parciální náboje byly vypočítány metodou B3LYP/cc-pVDZ na strukturách geometricky optimalizovaných stejnou metodou v programu Gaussian 03.<sup>68</sup> Samotný výpočet RESP<sup>69</sup> byl poté proveden pomocí programu Antechamber ze softwarového balíku AMBER 11.<sup>70</sup>

Molekuly substrátů a metabolitů byly vloženy na kraj simulačního boxu společně s 0,6nm vrstvou vody, následně proběhla 0,5ns volná simulace pro ustálení přidávaných molekul vody (molekuly vody byly přidány do pravidelné krystalové mřížky). Přesné složení jednotlivých simulačních boxů je v tabulce (Tabulka 2). Startovní struktury pro řízené simulace byly poté vytvořeny dvěma následujícími způsoby: Těžiště zkoumané molekuly bylo taženo (metoda dále nazývaná jako pulling – UP) směrem k těžišti membrány a z této simulace byly vybrány struktury s rozdílnými vzdálenostmi molekuly a membrány po  $0,1 \pm 0,02$  nm. Z takto vybraných struktur v dané vzdálenosti byla dále vybrána struktura s nejnižší potenciální energií. Dalším způsobem získávání startovních struktur byla volná simulace, kdy se molekula nechala volně pohybovat po simulačním boxu (metoda UF). Startovní struktury pro řízené simulace byly posléze separovány stejným způsobem jako u pulling simulací. V mnoha případech byly oba přístupy zkombinovány – byla provedena

volná 20ns simulace a z ní (z pozice molekuly nejbližší středu membrány) byl poté proveden pulling (Tabulka 3).

Vybrané struktury pro každou molekulu byly poté použity pro následnou simulaci umbrella sampling (Rovnice 12). Ze sil aplikovaných na molekulu (přeneseně z distribuce výskytu molekuly) byl posléze vypočítán profil volné energie metodou analýzy vážených histogramů (weighted histogram analysis method WHAM)<sup>39</sup> v programu g\_wham<sup>71</sup> z programového balíku GROMACS.

**Tabulka 2** – Složení jednotlivých simulačních boxů. Každý simulační box obsahuje 128 molekul lipidů (DOPC nebo POPG), jednu molekulu účinné látky a zobrazené množství molekul vody a iontů Na<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup>.

Účinná látka	DOPC			POPG		
	Molekuly vody	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Molekuly vody	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
Kofein	5186	19	19	4404	144	16
Chlorzoxazon	5187	19	19	4405	144	16
Kumarin	5188	19	19	4405	144	16
Ibuprofen (-1)	6521	24	23	7919	155	26
Ibuprofen (0)	6284	22	22	8131	155	27
Paraxantin	6286	22	22	8134	155	27
6-hydroxychlorzoxazon	6290	22	22	8133	155	27
7-hydroxykumarin	6286	22	22	8133	155	27
3-hydroxyibuprofen (-1)	6528	24	23	8412	157	28
3-hydroxyibuprofen (0)	6528	23	23	8410	156	28

**Tabulka 3** – Použité simulační protokoly pro jednotlivé látky. Penetrace při volné simulaci ukazuje minimální vzdálenost těžiště molekuly od středu membrány při 20ns volné simulaci; UP označuje oblast, pro kterou byly použity startovní struktury z pullingu, pro ostatní oblasti byly použity struktury z volné simulace; prodloužená simulace ukazuje, ve které oblasti membrány bylo nutné simulace umbrella sampling prodloužit.

Látka	DOPC				POPG			
	Penetrace při volné simulaci	UP	Prodloužená simulace	Délka prodloužení	Penetrace při volné simulaci	UP	Prodloužená simulace	Délka prodloužení
	(nm)	(nm)	(nm)	(ns)	(nm)	(nm)	(nm)	(ns)
Substráty								
Kofein	1,0	0-1,0			1,0	0-3,0	0,1 – 1,5	20
Chlorzoxazon	0,5	0-4,0	1,0 – 2,5	20	0,2	0-3,0	0,5 – 1,5	20
Kumarin	0	0-4,0			0,6	0-3,0	0,6 – 1,5	20
Ibuprofen (-1)	2,0	0-4,0	1,0 – 2,5	20	2,3	0-3,5	0 – 1,0	20
Ibuprofen (0)	2,3	0-2,3			0,3	0-0,2		
Metabolity								
Paraxantin	1,2	0-1,1	1,5 – 2,5	20	1,2	0-1,2		
6-hydroxy-chlorzoxazon	1,5	0-1,4			1,4	0-1,3		
7-hydroxy-kumarin	1,9	0-1,8	1,0 – 2,5	20	1,5	0-1,5	1,0 – 2,0	20
3-hydroxy-ibuprofen (-1)	2,1		1,0 – 2,5	20	1,7	0-1,6	0,5 – 2,0	20
3-hydroxy-ibuprofen (0)	1,7				0,9	0-0,8		

### 3.3 Konvergence profilu volné energie kumarinu na lipidové dvojvrstvě

Struktura a topologie kumarinu byla získána stejně jako v případě ostatních molekul pomocí serveru PRODRG2Beta<sup>66</sup> v silovém poli GROMOS 53a6.<sup>67</sup> Jelikož parciální náboje přiřazené atomům serverem PRODRG se ukazují jako nepřesné, vedoucí k nerealistickému rozdělení látek na rozhraní vody a cyklohexanu,<sup>72</sup> byly vytvořeny a srovnány tři sety parciálních nábojů: (a) set parciálních nábojů generovaný serverem PRODRG, (b) set nábojů generovaný pomocí Mullikenovy populační analýzy a (c) set nábojů získaný metodou RESP. Mullikenova populační analýza byla provedena metodou HF/6-31G\*, jedná se o stejnou metodu, která byla použita k vytvoření nábojového setu silového pole Berger.<sup>60</sup> Elektrostatický potenciál (ESP) a z něj RESP parciální náboje byly vypočítány metodou B3LYP/cc-pVDZ na strukturách geometricky optimalizovaných stejnou metodou v programu Gaussian 03.<sup>68</sup> Samotný výpočet RESP<sup>69</sup> byl poté proveden pomocí programu Antechamber ze softwarového balíku AMBER 11.<sup>70</sup> Náboje na kumarinu použité v této práci byly vypočítány metodou RESP, kromě těch, které jsou výslovně uvedeny jako PRODRG nebo Mullikenovy.

Pro porovnání různých způsobů získávání profilu volné energie byl z předchozích systémů vybrán systém kumarin-DOPC. Po 0,5ns volné simulaci bylo provedeno (a) 5 nezávislých volných simulací o celkové délce 3  $\mu\text{s}$ , (b) tažení kumarinu do membrány silou a (c) krátká 20ns volná simulace. V případě tažení kumarinu bylo jeho těžiště taženo do středu lipidové dvojvrstvy rychlostí  $1 \text{ nm}\cdot\text{ns}^{-1}$  se silovou konstantou  $10\,000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$  ( $2390 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ ) – na molekulu je aplikován harmonický potenciál, jehož poloha se posouvá danou rychlostí. Startovní struktury z pullingu i volné simulace byly získány stejným způsobem jako v případě substrátů a metabolitů a byly použity pro následné řízené simulace umbrella sampling (Rovnice 12) a z-constraint (Rovnice 13).

Simulace umbrella sampling používaly silovou konstantu  $2\,000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$  ( $477,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ ). Simulace se startovními strukturami z pullingu jsou dále nazývány zkratkami constraint-pulling (CP) nebo umbrella-pulling (UP), simulace se startovními strukturami z volné simulace jsou dále nazývány constraint-free (CF) a umbrella-free (UF). Jak umbrella-sampling, tak z-constraint simulace byly simulovány po dobu 30 ns (pro každé simulační okno), poté byla prodloužena simulační okna ve vzdálenostech 1,0 - 2,5 nm od středu membrány na 50 ns v případě umbrelly a 100 ns v případě constraintu. Celkově bylo takto shromážděno a vyhodnoceno 6,9  $\mu\text{s}$  řízených simulací.

Profil volné energie byl z metody umbrella sampling (Rovnice 12) získán pomocí analýzy vážených histogramů (weighted histogram analysis method WHAM)<sup>39</sup> v programu g\_wham<sup>71</sup> z programového balíku GROMACS. Profil volné energie z metody z-constraint byl získán z analýzy střední hodnoty síly aplikované na molekulu (Rovnice 13)

Pozice s minimem volné energie byla stanovena jako referenční stav ( $\Delta G = 0$  kcal/mol) a souřadnice jsou nadále uváděny ve vzdálenostech od středu membrány podél osy z.

Pro srovnání s experimentálními daty byly získány také profily volné energie kumarinových derivátů 7-acetoxy-4-metylkumarinu a 7-acetoxykumarinu při průchodu membránou dimyristoylfosfatidylcholinu (DMPC). Struktura DMPC byla získána ze stránek Tielemana<sup>73</sup> a obsahovala 128 molekul DMPC a 3655 molekul vody. Dvacet molekul vody bylo nahrazeno 10 ionty  $\text{Na}^+$  a 10 ionty  $\text{Cl}^-$ . Membrána byla poté ekvilibrována 200ns volnou simulací. 7-acetoxy-4-metylkumarin byl položen na povrch boxu a byla provedena 20ns volná simulace. V jejím průběhu pronikla molekula do vzdálenosti 1,8 nm od středu membrány a odtud byla dále tažena 4ns simulací se silovou konstantou  $500 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$  ( $119,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ ) rychlostí  $1 \text{ nm}\cdot\text{ns}^{-1}$ . Tato slabá silová konstanta byla zvolena proto, že molekula nepronikla dostatečně hluboko do membrány. Volná simulace a pulling byly použity pro vygenerování startovních struktur (stejným způsobem jako v předchozích případech) pro 10ns constraint simulace. Simulace v oblasti minima volné energie (0,8 - 1,7 nm) byly prodlouženy na 15 ns.

Pro získání profilu volné energie 7-acetoxykumarinu byl použit stejný simulační protokol jako pro 7-acetoxy-4-metylkumarin, pouze volná simulace trvala 60 ns a molekula dosáhla maximální hloubky 0,5 nm od středu membrány. Poté byla tažena dále do membrány rychlostí  $1 \text{ nm}\cdot\text{ns}^{-1}$  se silovou konstantou  $2\,000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$  ( $477,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ ). Byla použita vyšší silová konstanta než v předchozím případě, jelikož molekula vnikla samovolně hlouběji do membrány. Profil volné energie byl získán z 10ns z-constraint simulace, oblast 1,0 – 2,0 nm byla prodloužena na 15 ns a také byly přidány další simulační okna (takže vzdálenost simulačních oken v této oblasti byla 0,05 nm).



## 4. Výsledky

### 4.1 Membrány

Pro simulace látek na buněčných membránách byly použity jednosložkové dvojvrstvy glycerofosfolipidů: dioleoylfosfatidylcholinu (DOPC) a palmitoyloleoylfosfatidylglycerolu (POPG). Fosfatidylcholiny jsou nejzastoupenějšími lipidy v lidských buněčných membránách, POPG byl použit jako model záporně nabitě membrány, které se vyskytují převážně na cytosolické straně plasmatické membrány (a pravděpodobně i endoplasmatického retikula).

Membrána DOPC je obsahuje dva lipidové řetězce s nenasycenými vazbami (18 C). Tloušťka membránového modelu použitého v simulacích je 4,4 nm (vzdálenost mezi maximy výskytu cholinových skupin – viz Obrázek 4), plocha povrchu membrány náležící jednomu lipidu je 0,64 nm<sup>2</sup>. Dvojně vazby nenasycených řetězců se vyskytují okolo 0,85 nm, karbonyly (a s nimi i začátek hydrofilní části membrány) se vyskytují ve vzdálenosti 1,69 nm od středu membrány. Další polohy důležitých skupin se nacházejí v tabulce (Tabulka 4).

Membrána POPG obsahuje jeden nenasycený uhlovodíkový řetězec (18:1), druhý řetězec je kratší (16:0) a nasycený. Tloušťka membrány dosahuje 3,4 nm, plocha povrchu membrány náležící jednomu lipidu je 0,72 nm<sup>2</sup>. Dvojně vazby se vyskytují okolo 0,52 nm, karbonyly v 1,28 nm.

**Tabulka 4** - Polohy maxima hustoty jednotlivých částí lipidových membrán DOPC a POPG a plocha zabraná jedním lipidem na povrchu membrány.

Skupina	Pozice maxima hustoty (nm)	
	DOPC	POPG
Lipidy	1,72	1,45
Dvojně vazby	0,85	0,52
Polární hlavy (cholin, glycerol)	2,21	1,73
Fosfor	2,08	1,63
Karbonyly	1,69	1,28
Koncové metyly	0,00	0,00
Celkový systém	1,95	1,59
Region 1	2,9 – 2,2	2,4 – 1,8
Region 2	2,2 – 1,45	1,8 – 1,2
Region 3	1,45 – 0,5	1,2 – 0,4
Region 4	0,5 – 0	0,4 - 0
	Plocha (nm <sup>2</sup> )	
Plocha povrchu/lipid	0,64	0,73

## 4.2 Pozice molekul na membránách

### 4.2.1 DOPC

Rovnovážná poloha substrátů na DOPC leží obvykle v regionu 3, polární skupiny substrátů jsou v kontaktu s polárními hlavami. Pro studium pozice substrátů byl použit set simulací metodou umbrella sampling. Ze získaných profilů volné energie byly analyzovány pozice energetického minima a energetické bariéry – penetrační bariéra  $\Delta G^{\text{pen}}$  a bariéra mezi vodou a lipidy  $\Delta G^{\text{wat}}$ :

- Energetické minimum molekuly **kofeinu** se vyskytuje v 1,35 nm ( $\Delta G^{\text{pen}} = 4,5$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 6,3$  kcal/mol). Molekula kofeinu byla studována metodou UF/UP (UP 0 - 1,0 nm) a výsledky ukazují po 10ns simulace stabilní hodnoty. Molekula kofeinu v pozici energetického minima leží pod polárními hlavami rovnoběžně s povrchem membrány. V průběhu 20ns volné simulace pronikla do 1,0 nm.
- Simulace **chlorzoxazonu** (1,29 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 9,6$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 4,0$  kcal/mol) vycházela z původní metody UP, byla prodloužena na 20 ns v oblasti 1,0 – 2,4 nm. Molekula chlorzoxazonu je natočená rovnoběžně s lipidy, s kyslíky v kontaktu s polárními skupinami, v průběhu volné simulace pronikla do 0,5 nm.
- Pro molekulu **kumarinu** (1,33 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 3,0$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 6,7$  kcal/mol) byla použita metoda UF. Kumarin leží pod polárními hlavami, se kterými jsou v kontaktu jeho atomy kyslíku, ve volné simulaci prošel kumarin opakovaně na druhou stranu membrány.
- Molekula **ibuprofenu** v nabitě podobě (1,35 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 11,2$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 6,6$  kcal/mol) je velmi polární, a proto byla její simulace prodloužena na 20 ns, v průběhu volné simulace pronikla do 2,0 nm. Molekula ibuprofenu v nenabitě podobě (1,03 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 4,1$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 7,9$  kcal/mol) dosáhla konvergence rychle a 10ns simulace se jevila jako dostatečná, v průběhu volné simulace pronikla do 2,3 nm. Jak nabitý, tak nenabitý ibuprofen jsou orientovány svými atomy kyslíku směrem ven z membrány.

Rovnovážné pozice metabolitů na DOPC leží v regionech 2 – 3: \_

- Profil volné energie molekuly **paraxantinu** (2,07 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 7,5$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 4,9$  kcal/mol) se chová výrazně odlišně (v porovnání s ostatními molekulami) – v průběhu simulace nabývá na důležitosti energetické minimum vzdálenější od středu membrány. Simulace oblasti výskytu obou energetických minim (1,5 – 2,5 nm) byla proto prodloužena na 20 ns. Paraxantin se poté nachází v oblasti polárních hlav. Ve volné simulaci proniká nejlouběji do 1,2 nm.
- Profil volné energie **6-hydroxychlorzoxazonu** se jeví po 10 ns zkonvergovaně (1,55 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 8,0$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 7,4$  kcal/mol) a molekula leží těsně pod polárními hlavami s kyslíky směrem k polárnímu prostředí, ve volné simulaci proniká do 1,5 nm.

- Simulace **7-hydroxykumarinu** (1,82 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 8,0$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 3,1$  kcal/mol) byla prodloužena v oblasti výskytu energetického minima (1,0 – 2,5 nm), molekula leží v oblasti polárních hlav s kyslíky směrem k vodnému prostředí, ve volné simulaci dosáhne 1,9 nm.
- **3-hydroxyibuprofen** v nabitě formě (1,45 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 15,2$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 4,0$  kcal/mol) bylo také nutné prodloužit na 20 ns, ve volné simulaci dosáhne 2,1 nm, v nenabitě podobě (1,29 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 6,9$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 4,6$  kcal/mol) postačila 10ns simulace, ve volné simulaci doputuje do 1,7 nm. Obě formy 3-hydroxyibuprofenu leží pod polárními hlavami se všemi třemi kyslíky otočenými k polárnímu prostředí.

#### 4.2.2 POPG

Substráty na membráně POPG leží v regionech 2 a 3:

- Molekula **kofeinu** má velkou penetrační bariéru (1,67 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 12,1$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 3,7$  kcal/mol) a drží se v oblasti polárních hlav. Ve volné 20ns simulaci pronikla do 1,0 nm.
- Simulace molekuly **chlorzoxazonu** (1,31 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 3,8$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 1,5$  kcal/mol) byla prodloužena na 20 ns a molekula je orientována chlorem do středu membrány, volně pronikla do 0,2 nm.
- Molekula **kumarinu** (1,57 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 3,0$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 0,6$  kcal/mol) také vyžadovala delší simulační čas (20 ns), po 10 ns se v simulaci objevilo další energetické minimum, ve volné simulaci vnikla do 0,6 nm. Molekula se orientuje svými kyslíky do oblastí polárních hlav.
- Molekula nabitého **ibuprofenu** má stejně jako molekula kofeinu vysokou penetrační bariéru (1,37 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 12,0$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 2,5$  kcal/mol), volně pronikla do 2,3 nm. Simulace těchto molekul byly proto prodlouženy na 20 ns. Molekula nenabitého ibuprofenu vykazuje po 10 ns simulací stabilní výsledky (1,03 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 5,1$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 3,6$  kcal/mol), ve volné simulaci pronikla do 0,3 nm. Molekuly ibuprofenu jsou orientovány svými kyslíky k polárním skupinám.

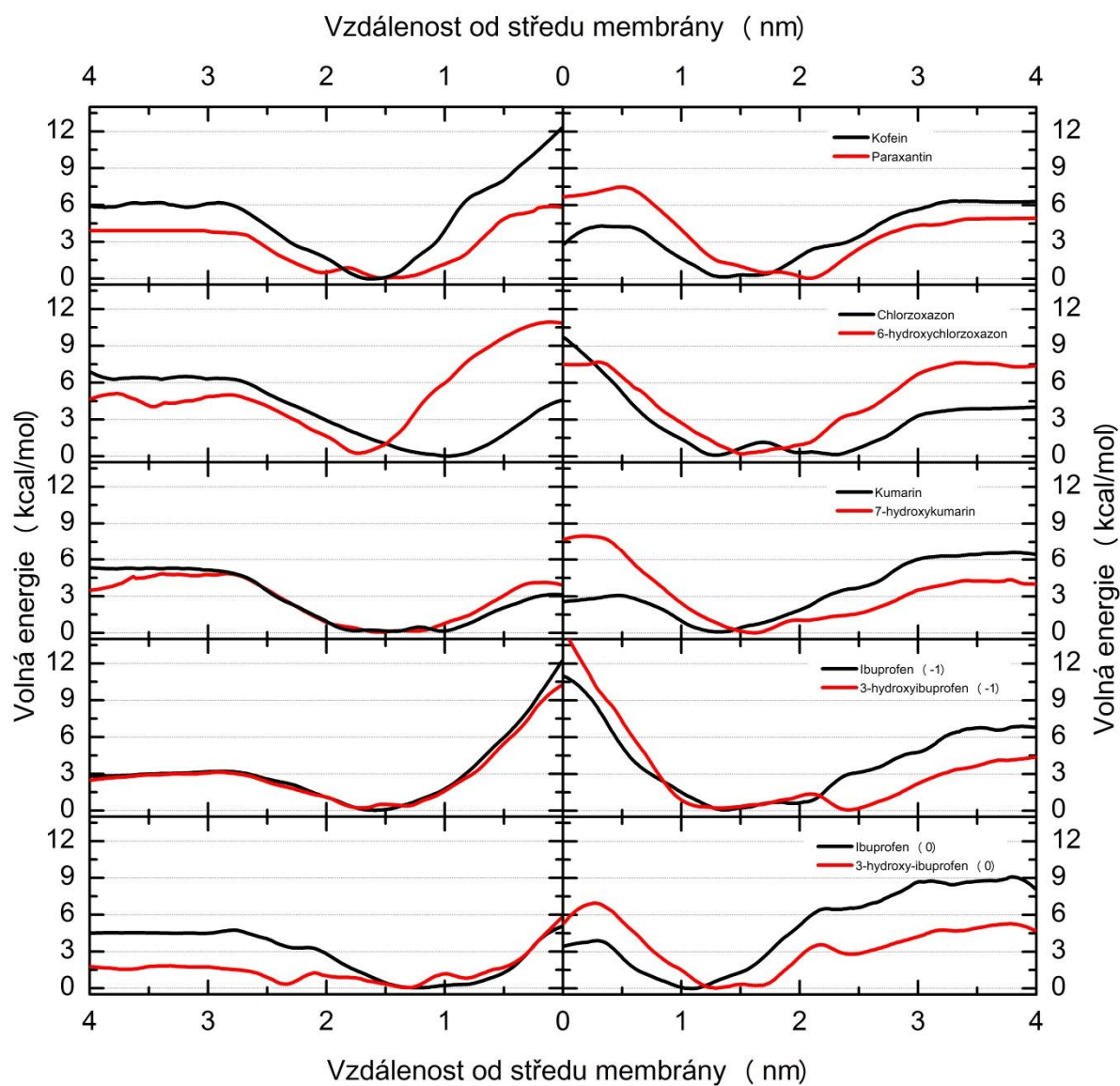
Metabolity se na membráně POPG koncentrují v regionu 2:

- Profil volné energie molekuly **paraxantinu** (1,63 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 6,3$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 2,4$  kcal/mol) vykazuje poměrně stabilní energetické bariéry, avšak po 10 ns simulace dochází stále k posunu pozice energetického minima. Ve volné simulaci proniká do 1,2 nm. Molekula je umístěna pod polárními hlavami lipidů.
- **6-hydroxychlorzoxazon** má stabilní pozici minima (1,73 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 11,0$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 4,2$  kcal/mol), avšak měnící se výšky obou energetických bariér. Je umístěn v oblasti polárních hlav, chlorem ve vodném prostředí, volně proniká do 1,4 nm.

- **7-hydroxykumarin** (1,73 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 5,5$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 3,1$  kcal/mol) vykazuje relativně stabilní hodnoty, je orientován kyslíky k polárnímu prostředí, ve volné simulaci proniká do 1,5 nm.
- Simulace nabitého **3-hydroxyibuprofenu** (1,33 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 12,0$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 2,7$  kcal/mol) bylo nutné prodloužit, jelikož vytvořil dvě energetická minima a je umístěn karboxylovou skupinou v polárních hlavách. Ve volné simulaci dosahuje 1,7 nm. Nenabitý 3-hydroxyibuprofen (1,33 nm,  $\Delta G^{\text{pen}} = 5,5$  kcal/mol,  $\Delta G^{\text{wat}} = 1,7$  kcal/mol) vykazuje poměrně stabilní hodnoty a je umístěn v polárních hlavách rovnoběžně s povrchem membrány, volně proniká do 0,9 nm.

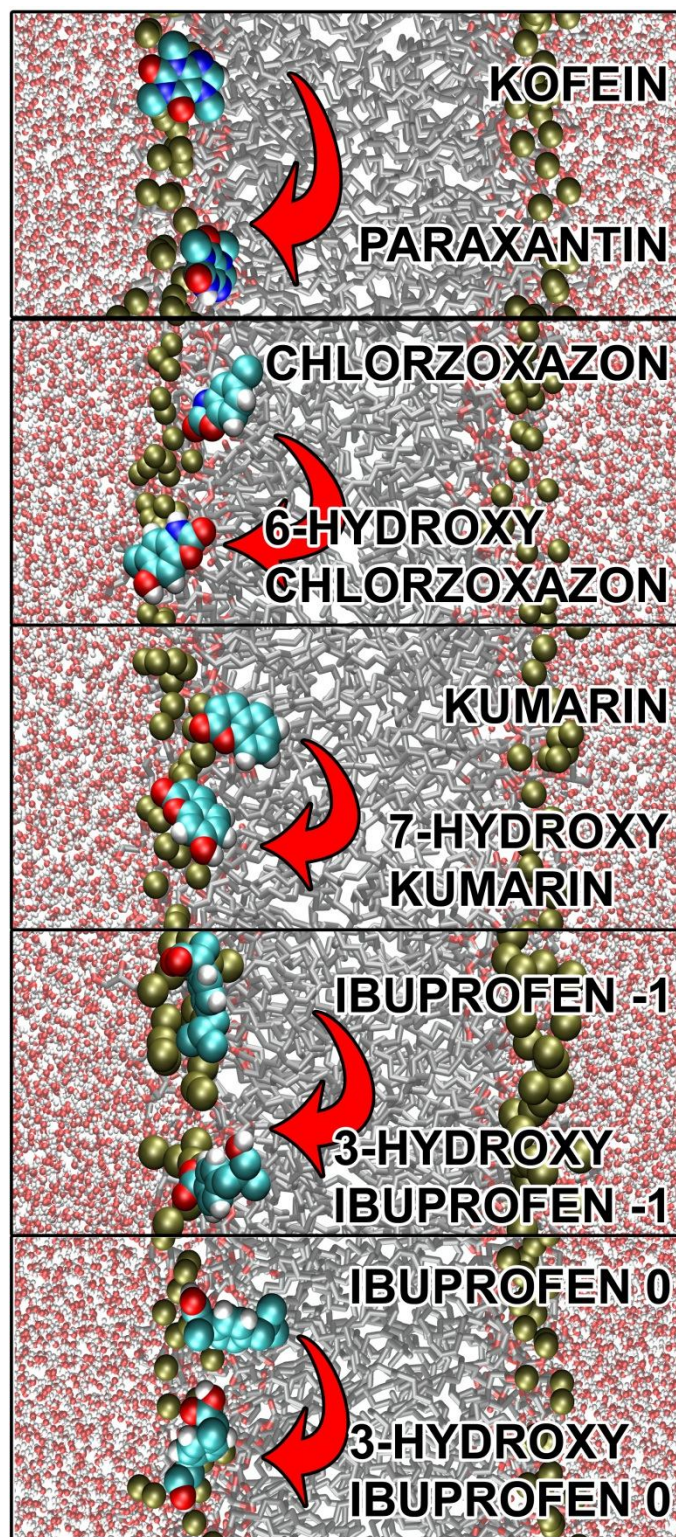
**Tabulka 5** – výsledné pozice energetického minima, relativní pozice (v procentech vzdálenosti fosfátů) a energetické bariéry

	Dipól	$\Delta G^{\text{hyd}}$	DOPC				POPG			
			Pozice minima	Relativní pozice	$\Delta G^{\text{pen}}$	$\Delta G^{\text{wat}}$	Pozice minima	Relativní pozice	$\Delta G^{\text{pen}}$	$\Delta G^{\text{wat}}$
			nm	%	kcal/mol		nm	%	kcal/mol	
Kofein	2,25	-8,8	1,35	0,65	4,5	6,3	1,67	1,02	12,2	6,2
Chlorzoxazon	2,40	-8,4	1,29	0,62	9,6	4,0	1,05	0,64	4,4	7,1
Kumarin	4,95	-6	1,33	0,64	3,0	6,7	1,05	0,64	3,1	5,5
Ibuprofen (-1)	14,6 2	-11,3	1,35	0,65	11,2	6,6	1,57	0,96	11,9	3,2
Ibuprofen (0)	2,78	-5	1,03	0,50	4,1	7,9	1,25	0,77	4,9	4,9
Paraxantin	3,85	-11,2	2,07	1,00	7,5	4,9	1,63	1,00	6,3	3,9
6-hydroxy-chlorzoxazon	1,50	-11,5	1,55	0,75	8,0	7,4	1,73	1,06	11,0	5,4
7-hydroxy-kumarin	6,57	-10,5	1,82	0,88	8,0	3,1	1,53	0,94	4,1	5,0
3-hydroxy-ibuprofen (-1)	12,8 8	-17,5	1,45	0,70	15,2	4,0	1,37	0,84	10,2	3,2
3-hydroxy-ibuprofen (0)	1,33	-11,2	1,29	0,62	6,9	4,6	1,33	0,82	5,5	1,9



Obrázek 8 Profily volné energie molekul na membráně POPG (vlevo) a DOPC (vpravo). Na membráně DOPC jsou substráty (černé) umístěné hlouběji než jejich metabolity (červené). Na membráně POPG není tento rozdíl již tolik patrný.

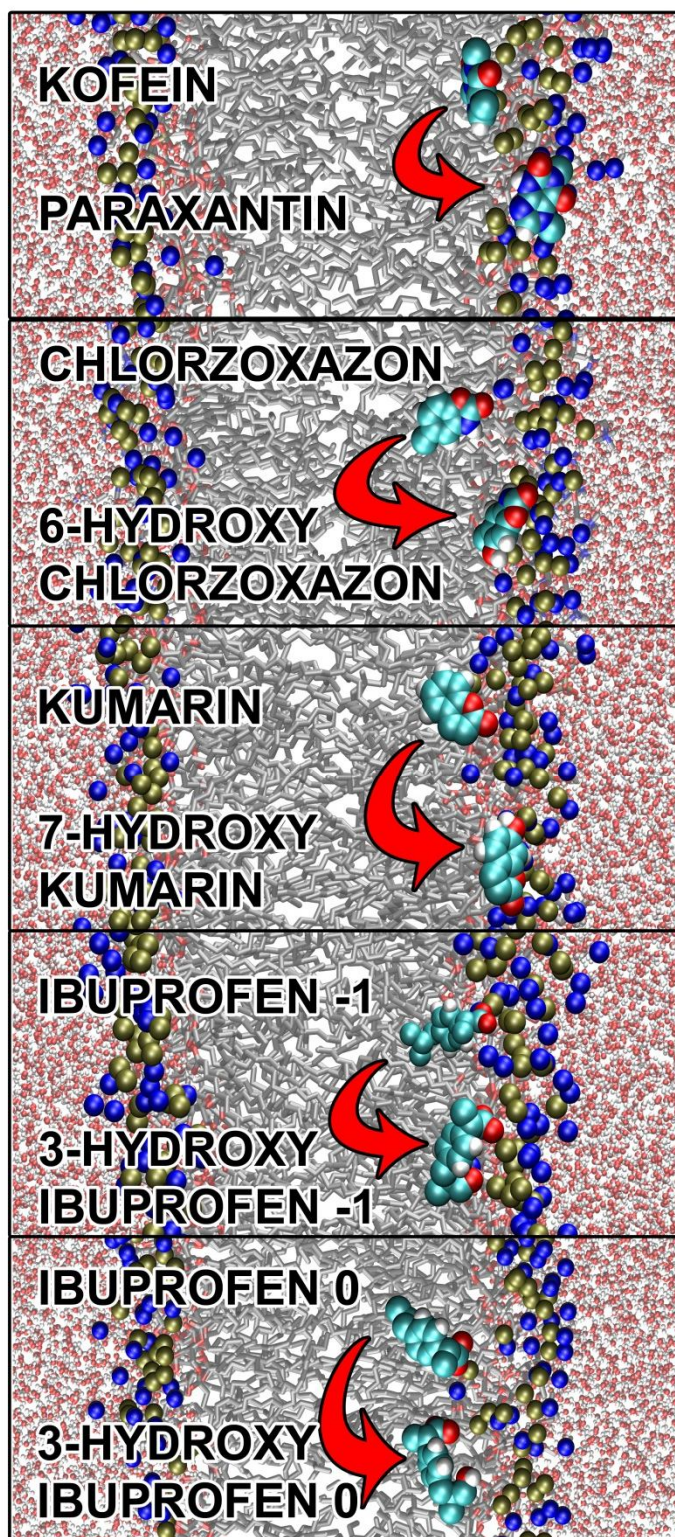




Obrázek 9

Postavení substrátů a jejich metabolitů na membráně POPG. Molekuly jsou orientovány svými polárními skupinami k polárním hlavám lipidů.





Obrázek 10

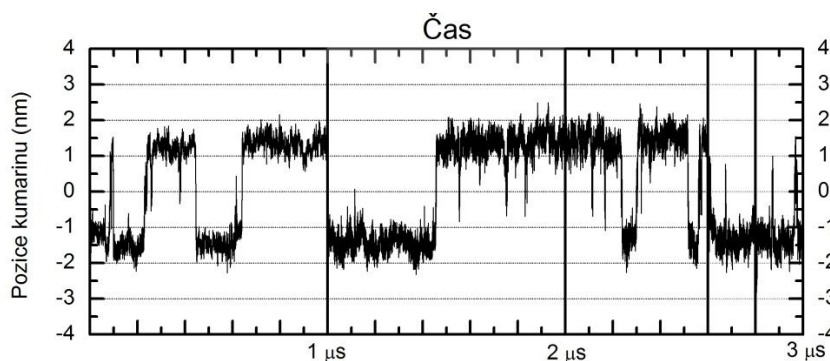
Postavení substrátů a metabolitů na membráně DOPC. Metabolity jsou v membráně blíže polárním hlavám a jsou orientovány svou delší osou rovnoběžně s povrchem membrány.

## 4.1 Konvergence profilu volné energie u kumarinu

Při analýze pozic molekul na membránách DOPC a POPG bylo možné pozorovat časový vývoj profilů volné energie (data nezobrazena). Pro další práci byla provedena analýza konvergence profilu volné energie kumarinu na DOPC v závislosti na volbě startovních struktur a volbě metody řízení simulace. Konvergence profilu volné energie byla publikována v ref. 55.

### 4.1.1 Volná MD simulace

Bylo provedeno pět nezávislých volných simulací kumarinu v okolí membrány DOPC s celkovým simulačním časem 3  $\mu$ s. Tyto simulace ukazují, že kumarin přirozeně zůstává na rozhraní regionů 2 a 3 – maximum výskytu kumarinu se nacházelo v  $1,4 \pm 0,1$  nm (Obrázek 11 a 12). Jakmile ovšem kumarin vstoupil do membrány (v průběhu prvních max. 10 ns), neopustil prostředí membrány po celou zbývající dobu simulace (Obrázek 11). Vyskytoval se v obou vrstvách membrány, středem membrány penetroval spontánně. Bylo pozorováno dvanáct úspěšných (a deset neúspěšných) přechodů přes střed membrány. Přechod přes střed membrány je jev poměrně vzácný, vyskytující se řádově jednou za stovky ns. Samotný přechod je ovšem velmi rychlý – trvá řádově jednotky ps až ns. Z volné simulace bylo při bližším přiblížení možné vyčíst i metastabilní stav uprostřed membrány, kde se kumarin (při úspěšném nebo neúspěšném přechodu) zastavil na jednotky ns. Z průměrné hustoty výskytu kumarinu byla spočítána penetrační bariéra 2,1 kcal/mol, bariéra mezi vodou a lipidy nemohla být spočítána, jelikož se kumarin ve vodném prostředí prakticky nezdržoval.

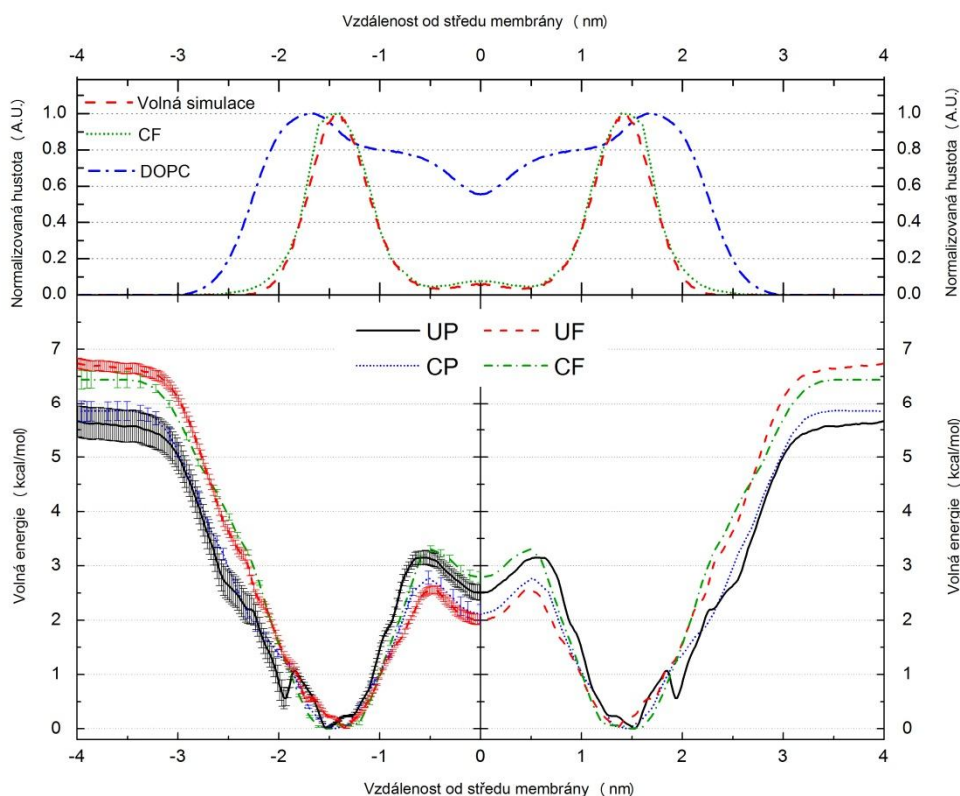


Obrázek 11 Časový průběh volné simulace kumarinu s 12 úspěšnými a 10 neúspěšnými přechody. Svislé čáry ukazují začátky jednotlivých simulací.

### 4.1.2 Řízené simulace

Profily volné energie získané řízenými simulacemi (UP, UF, CP a CF) mají některé shodné znaky (Obrázek 12). Když se kumarin dostává z vody do vnějších částí membrány (regiony 1 a 2), volná energie klesá. Na rozhraní regionů 2 a 3 leží minimum volné energie. Při dalším postupování hlouběji do membrány volná energie roste a ve středu membrány je druhé energetické minimum. Hlavní energetické minimum se nachází v 1,35 – 1,53 nm (s oblastí dosažitelnou tepelným pohybem při 310 K v rozmezí 1,05 - 1,95 nm; tepelným pohybem se myslí oblast v rámci energetické bariéry RT, při 310 K tedy 0,616 kcal/mol) a lokální energetické minimum se nachází uprostřed membrány. Velmi podobný průběh pak vykazují všechny profily volné energie získané všemi čtyřmi metodami.





Obrázek 12

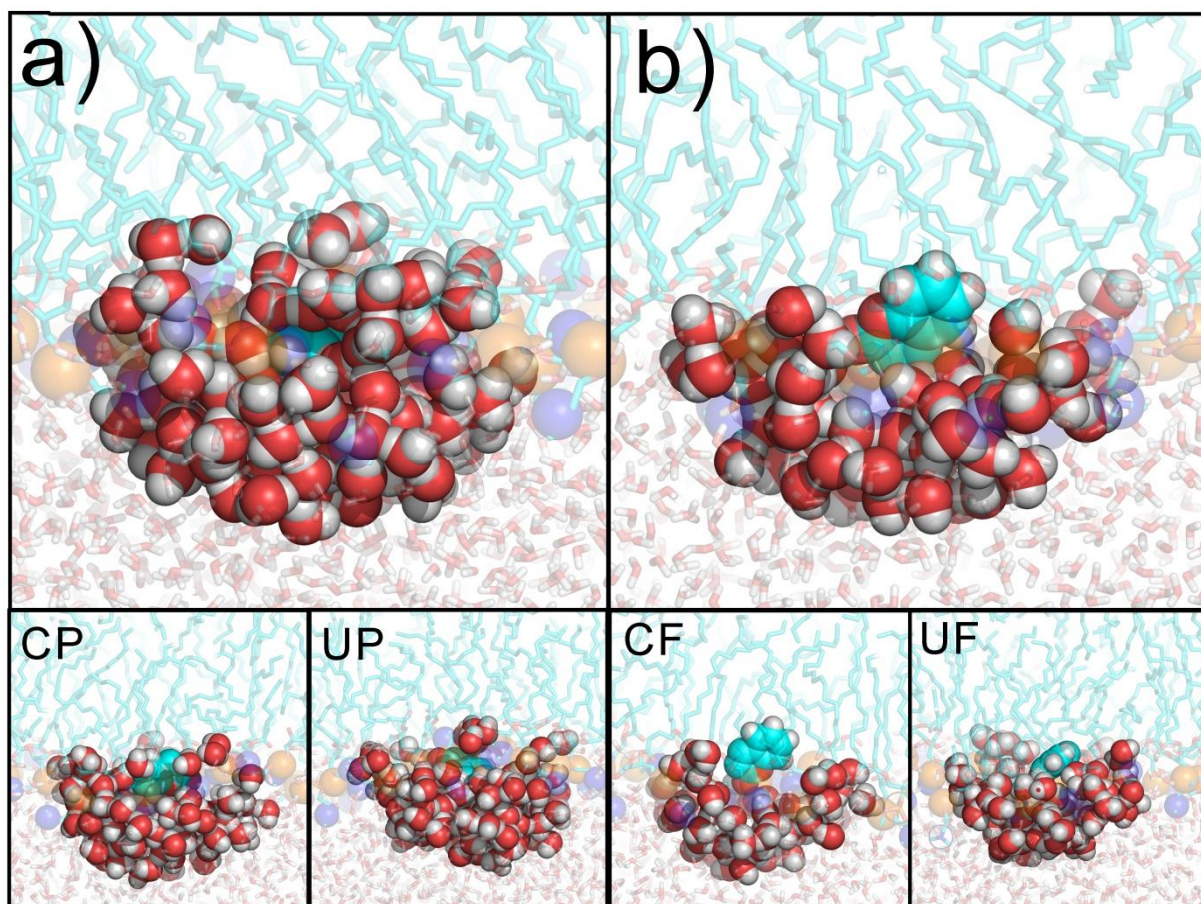
Nahoře: Hustotní profil membrány DOPC (modrá) a hustoty výskytu kumarinu z  $3\mu\text{s}$  volné simulace (červená) a vypočítané z konečné profilu volné energie získaného metodou CF (zelená). Obě hustoty výskytu kumarinu navzájem dobře odpovídají.

Dole: Konečné profily volné energie získané všemi čtyřmi metodami. Profily byly vypočteny pro jednu vrstvu membrány a symetrizovány pro druhou vrstvu. UP a UF jsou simulace pomocí metody umbrella sampling se startovními strukturami z pullingu (UP) a volné simulace (UF). CP a CF jsou simulace z-constraint se startovními strukturami z pulling simulace (CP) a volné simulace (CF).

Z profilů volné energie byly získány také energetické bariéry (Obrázek 12). Penetrační bariéry  $\Delta G^{\text{pen}}$  získané pomocí všech čtyř metod spadaly do poměrně úzké oblasti 2,6 – 3,3 kcal/mol. Bariéry mezi vodou a lipidy spadaly do oblasti 5,7 – 6,7 kcal/mol, nižší hodnoty ukazovaly profily začínající se startovními strukturami z pullingu (UP, CP), vyšší hodnoty vykazovaly profily začínající se strukturami z volné simulace ( $\Delta G^{\text{wat}}$  pro metody UP, CP, UF a CF byly  $5,7 \pm 0,3$ ,  $5,9 \pm 0,2$ ,  $6,7 \pm 0,1$ ,  $6,4 \pm 0,2$  kcal/mol). V profilu získaném metodou UP bylo vidět také malé lokální minimum v 1,95 nm s bariérou 0,5 kcal/mol. Energetická bariéra je v tomto místě vyšší než statistická odchylka, i když ta se nám zdá být podhodnocená. Jelikož se hloubka tohoto minima s přibývajícím simulačním časem snižuje a ve volné simulaci nebyl pozorován stav odpovídající tomuto minimu, je toto minimum dále považováno za artifiční.

Takové artifiční minimum může být systematickou chybou zatěžující výsledky, a tak jsme dále pátrali po příčinách tohoto chování. Hlavní příčinou se jeví být volba

startovních struktur vstupujících do simulací. V případě simulací UP a CP byly startovní struktury získány pulling simulací, která vytváří na povrchu membrány deformace, až nálevkovité prohnutí membrány způsobené vnikajícím solvatovaným kumarinem. Pulling tedy způsobuje, že kumarin je v membráně více hydratovaný než při jeho samovolném vniknutí do membrány (Obrázek 13). Tyto defekty (hydratovaný kumarin, prohnutí povrchu membrány) jsou odstraňovány v průběhu simulace, voda je vypuzována z hydrofobního prostředí a membrána získává opět neporušený povrch. Tato relaxace systému probíhá v hlubších vrstvách membrány řádově za stovky ps, ovšem relaxační čas roste se vzdáleností od středu membrány. V oblasti artificiálního minima ( $\sim 1,7 - 2,0$  nm) trvá eliminace těchto defektů řádově desítky ns. Velmi zajímavým (a pro další práci důležitým) jevem je, že relaxace systému probíhá výrazně rychleji při použití metody CP než při použití UP. Při použití startovních struktur získaných volnou simulací se toto artificiální minimum vůbec nevyskytuje.



Obrázek 13

*Startovní struktura z pullingu (a) a z volné simulace (b) v hloubce 1,9 nm. a struktury Struktury z pullingu jsou výrazně hydratovanější než z volné simulace, jelikož je kumarin při tažení do membrány i se svým solvatačním obalem. Po 10 ns simulace se ukazuje, že simulace constraint (CP) tento artefakt eliminuje rychleji než umbrella sampling (UP). Simulace se startovními strukturami z volné simulace vedou k podobným výsledkům metodou constraint (CF) i umbrella sampling (UF). Uhlíky jsou vyznačeny světle modře, kyslíky červeně, vodíky bíle. Dusíky a fosfory DOPC jsou zobrazeny jako hnědé a modré koule.*

### 4.1.3 Konvergence profilu volné energie v řízených simulacích

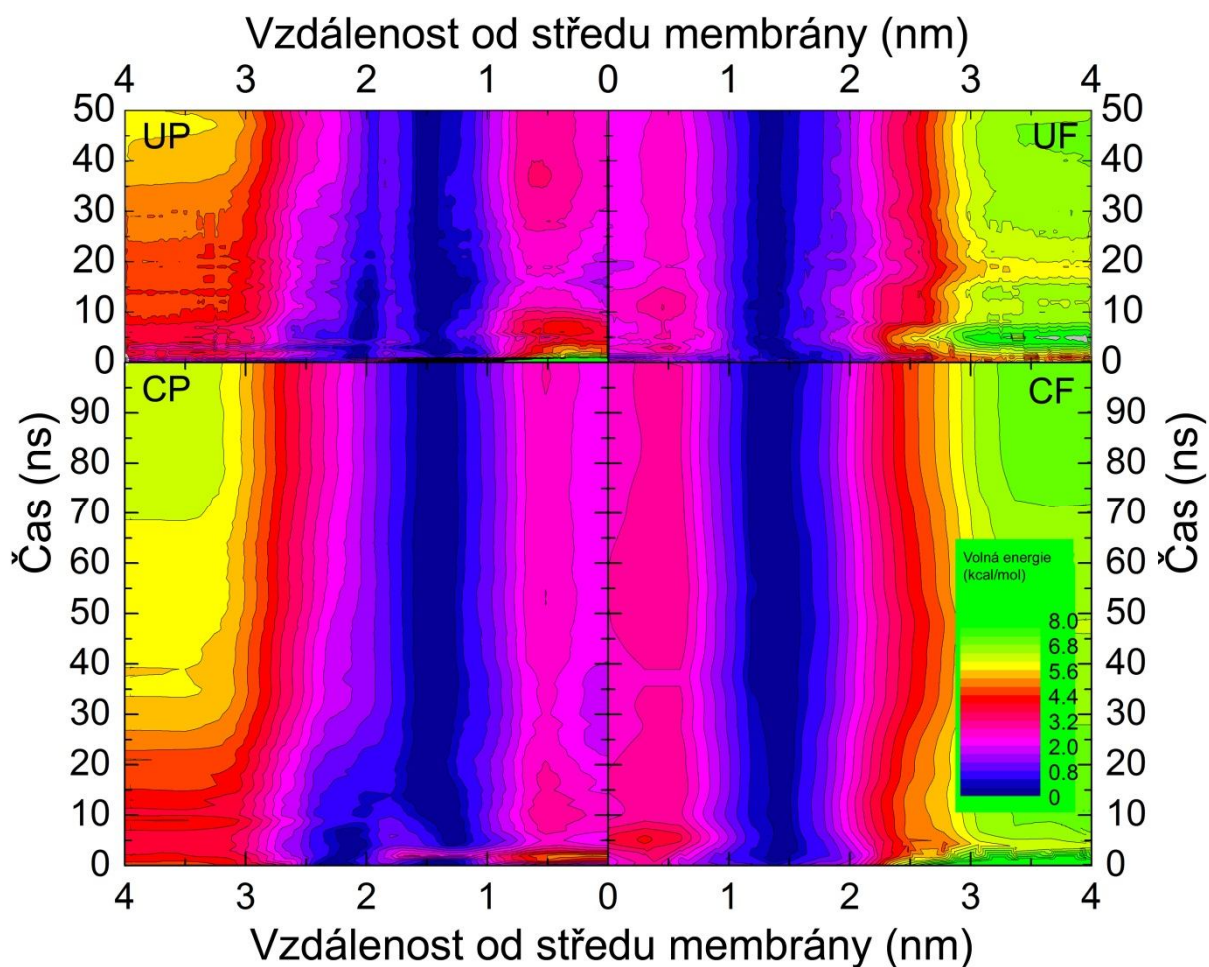
Pozice minima určená z profilů volné energie získaných metodami používajícími počáteční struktury z volné simulace (UF a CF) zkonvergovala výrazně rychleji než při použití startovních struktur získaných pullingem (UP a CP).

Profil volné energie získaný metodou UP se výrazně mění s přibývajícím simulačním časem (Obrázek 14). Při použití kratších simulačních časů (jednotky ns) se v profilu volné energie objevují dvě prakticky rovnocenná minima (jedno v  $\sim 1,5$  nm, druhé v  $\sim 2,0$  nm). Po 10 ns se z minima v  $\sim 1,5$  nm stává hlavní minimum, jehož poloha zkonverguje na pozici 1,53 nm, bariéra artificiálního minima se zmenšuje na 0,5 kcal/mol. Oblast tepelného pohybu ( $\Delta G_{\min} + RT$ ) se v průběhu prvních 16 ns simulace rozšiřovala z 0,90 nm (po 5 ns simulace) na 1,10 nm, poté se oblast tepelného pohybu opět postupně zmenšila až na 0,80 nm.  $\Delta G^{\text{wat}}$  v průběhu simulace pozvolna rostla, po 50 ns dosáhla hodnoty  $5,7 \pm 0,3$  kcal/mol.  $\Delta G^{\text{pen}}$  v průběhu prvních 16 ns klesala, do 30 opět mírně rostla a poté se pohybovala okolo hodnoty  $3,2 \pm 0,2$  kcal/mol. Profil volné energie získaný metodou CP byl na počátku simulace velmi podobný profilu UP, ovšem artificiální minimum ( $\sim 20$  nm) rychle zmizelo (do  $\sim 15$  ns simulace). Oblast tepelného pohybu se postupně zmenšovala od 1,38 nm (po 5 ns simulace) na 0,51 nm po 40 ns, poté již zůstávala konstantní.  $\Delta G^{\text{wat}}$  postupně rostla až k  $5,9 \pm 0,2$  kcal/mol.  $\Delta G^{\text{pen}}$  rostla v průběhu prvních 11 ns, do 20 ns mírně klesala ke  $2,8 \pm 0,1$  kcal/mol, kolem této hodnoty se pohybovala nadále i při prodloužené simulaci na 100 ns.  $\Delta G^{\text{wat}}$  do 100 ns nadále rostla až k  $6,2 \pm 0,2$  kcal/mol.

V průběhu simulace metodou UF byla pozice minima takřka konstantní (1,29 - 1,35 nm), oblast tepelného pohybu se postupně rozšiřovala z 0,44 nm na 0,66 nm.  $\Delta G^{\text{wat}}$  se v průběhu prvních 19 ns postupně snižovala, lehce rostla do 30 ns, její zkonvergovaná hodnota byla poté  $6,7 \pm 0,1$  kcal/mol.  $\Delta G^{\text{pen}}$  vykazovala zkonvergované hodnoty již po 20 ns, okolo  $2,6 \pm 0,1$  kcal/mol.

Simulace metodou CF také vedla k jednomu hlavnímu energetickému minimu (1,29 – 1,49 nm), oblast tepelného pohybu se postupně rozšiřovala od 0,41 nm do 0,70 nm.  $\Delta G^{\text{wat}}$  se v průběhu celé simulace pohybovala v rozmezí 6,4 – 7,0 kcal/mol,  $\Delta G^{\text{pen}}$  v prvních 10 ns klesala a poté se držela v rozmezí 2,9 – 3,3 kcal/mol. Prodloužená 100ns simulace vedla k podobným výsledkům – energetické minimum v 1,29 nm, oblast tepelného pohybu široká 0,60 nm,  $\Delta G^{\text{wat}}$  konstantní po 80 ns s hodnotou 7,0 kcal/mol a  $\Delta G^{\text{pen}}$  s hodnotou  $3,1 \pm 0,1$  kcal/mol.



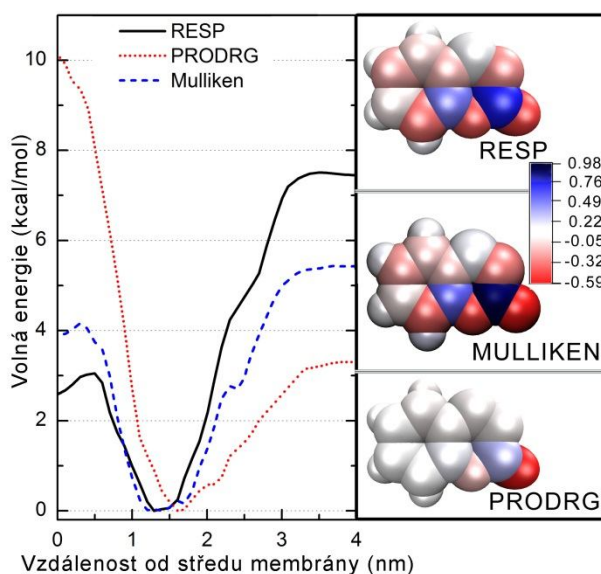


Obrázek 14 *Konvergence profilů volné energie získaného všemi čtyřmi metodami ukazuje pozice energetického minima i energetické bariéry. Všechna simulační okna byla simulována po dobu 30 ns, okna v oblasti 1,0 – 2,5 nm byla prodloužena na 50 ns v případě simulací UP a UF nebo 100 ns v případě simulací CP a CF. Prvních 5 ns je zatíženo velkou chybou způsobenou nedostatkem dat. Profily začínající z pullingu (vlevo) začínají s dvěma energeticky rovnocennými minim. Minimum v ~1,5 nm nabývá na významu a stává se hlavním minimem, minimum v ~2,0 nm je považováno za umělé a je postupně eliminováno. Simulace constraint (dole) eliminuje umělé minimum výrazně rychleji než simulace umbrella sampling. Profily se startovními strukturami z volné simulace ukazují stabilní výsledky po takřka celou dobu simulace..*

#### 4.1.4 Vliv volby parciálních nábojů

Jelikož si jsme vědomi toho, že volba parciálních nábojů může mít na výslednou simulaci výrazný vliv, byla provedena také 10ns CF simulace s nábojovými sety získanými ze serveru PRODRG a pomocí Mullikenovy populační analýzy a takto získané profily volné energie byly posléze porovnány. Kumarin s nábojovým setem ze serveru PRODRG měl dipólový moment 9,5 D, kumarin s Mullikenovými náboji 6,0 D a kumarin s náboji RESP 4,9 D. Dipólový moment kumarinu s náboji RESP blízké odpovídá dipólovému momentu kumarinu v plynné fázi (4,6 D), Mullikenovy náboje jsou kompromisem mezi dipólovým momentem ve vodě (s dielektrickou konstantou  $\epsilon_r = 78.39$ ) a heptanem ( $\epsilon_r = 1,92$ ), které byly

spočítány metodou CPCM/B3LYP/cc-pVDZ a odpovídají 6,7 a 5,4 D. Pokud uvážíme tyto hodnoty, jeví se dipólový moment s náboji PRODRG jako velmi nadhodnocený, což výrazně ovlivňuje výslednou simulaci. Hlavní energetické minimum kumarinu s RESP náboji je v 1,29 nm (po 10 ns CF simulace), s Mullikenovými náboji v 1,20 nm a s náboji PRODRG je kumarin posunut směrem do vodného prostředí do 1,62 nm (Obrázek 15). Hlavní minimum volné energie kumarinu s RESP náboji je také výrazně hlubší v porovnání s Mullikenovými nebo PRODRG náboji ( $\Delta G^{\text{wat}}$ : 7,5; 5,6 a 3,3 kcal/mol) a opačně se liší penetrační bariéry ( $\Delta G^{\text{pen}}$ : 3,1; 4,6 a 10,1 kcal/mol). Jak by se dalo očekávat, penetrační bariéra se vzrůstajícím dipólovým momentem roste, bariéra mezi vodou a lipidy klesá.



Obrázek 15 Vlevo: Profily volné energie pro kumarin s nábojovým setem z PRODRG (červená), Mullikenovy analýzy (modrá) a RESP (černá) získané pomocí 10 ns CF simulace. Kumarin s PRODRG náboji je posunut do vnějších částí membrány. Penetrační bariéra roste a bariéra mezi vodou a lipidy se snižuje se zvyšujícím se dipólovým momentem.

Vpravo: Parciální náboje na vdW povrchu atomů získané pomocí RESP, Mullikenovy analýzy jsou rozmístěny po celé molekule, zatímco náboje PRODRG jsou umístěny pouze na jedné straně molekuly.

#### 4.1.5 Srovnání s experimentálními daty

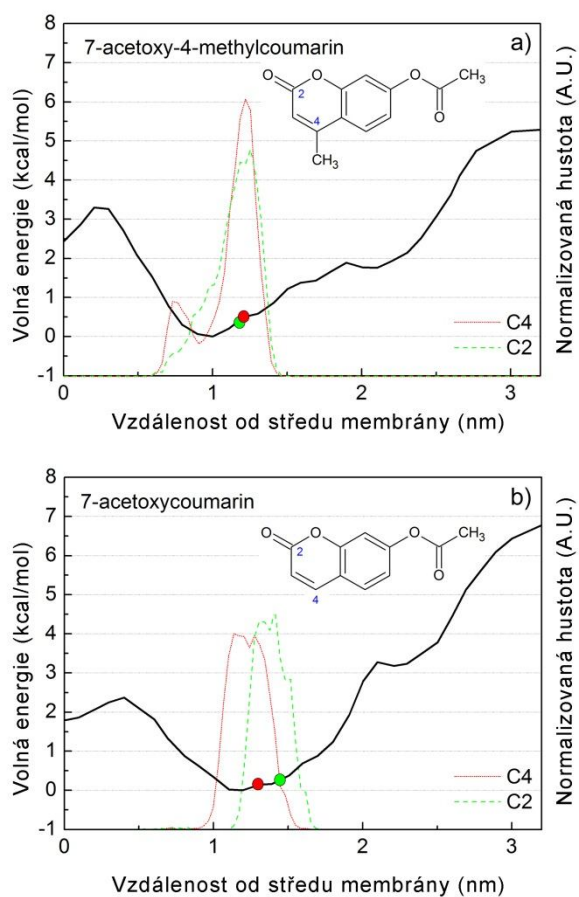
Podle našich znalostí nebyl ještě samotný kumarin na membráně DOPC studován experimentálně, avšak studovány byly jeho deriváty na DMPC. Několik derivátů kumarinu bylo studováno pomocí NMR spektroskopie. Chemický posun uhlíků  $^{13}\text{C}$  je totiž závislý na polaritě prostředí a ta je různá v různých hloubkách membrány. NMR experimenty ukazují, že 7-acetoxy-4-metylkumarin leží v membránách DMPC na hranici regionů 2 a 3 (0,7 nm od cholinových dusíků, což odpovídá cca 1,2 nm od středu membrány). Značené uhlíky (C2 a C4) jsou umístěny 0,72 a 0,70 nm od cholinových dusíků (1,18 a 1,20 nm od středu membrány). Další derivát kumarinu, 7-acetoxykumarin, se nacházel v regionu 2, blíže k vodnému prostředí.  $^{13}\text{C}$  uhlíky (C2 a C4) se nacházejí 0,44 a 0,59 nm od cholinového dusíku, tj. 1,46 a 1,31 nm od středu membrány (Obrázek 16). Původní vzdálenosti uhlíků od

povrchu membrány (které byly v citované studii použity) byly přepočítány na vzdálenosti od středu membrány, aby byla zachována konzistence se zde prezentovanými výsledky. Pro tento přepočet byla tloušťka jedné vrstvy membrány stanovena na 1,9 nm, což odpovídá tloušťce DMPC membrány ve zdejších MD simulacích.

Pro toto srovnání jsme použili nejvýhodnější simulační protokol (CF). Po volné simulaci kumarinových derivátů následoval krátký pulling a poté 10ns z-constraint simulace (viz Metody). Profil volné energie 7-acetoxy-4-methylkumarinu ukazuje pozici minima v 1,0 nm od středu DMPC membrány s oblastí tepelného pohybu 0,8 – 1,3 nm (Obrázek 16). Tato oblast souhlasí s oblastí, ve které se molekula vyskytuje dle NMR experimentu ( $1,2 \pm 0,1$  nm). Pozice značených uhlíků C2 a C4 ze simulací (1,25 a 1,21 nm) rozumně odpovídají pozicím těchto uhlíků pozorovaným v experimentu - 1,18 a 1,20 nm. Je ovšem nutno podotknout, že byl pozorován flip-flop uhlíku C4, který se vyskytuje převážně ve dvou pozicích – druhé maximum výskytu je v 0,76 nm (cca 14 % populace).

Pozice minima volné energie těžiště 7-acetoxykumarinu leží 1,2 nm od středu membrány, s tepelným pohybem při 310 K v rozmezí 0,75 – 1,35 nm. Vzdálenosti uhlíků C2 a C4 ze simulací (1,34 a 1,19 nm) opět odpovídají pozicím těchto značených uhlíků v NMR experimentu (1,46 a 1,31 nm).

Celkově vzato je možné říci, že výsledky MD simulací dobře odpovídají experimentálním datům, co se týče polohy jednotlivých značených uhlíků i při srovnání poloh obou derivátů kumarinu – 7-acetoxy-4-methylkumarin se nachází v membráně hlouběji než 7-acetoxykumarin.



**Obrázek 16**

*Profily volné energie a struktury kumarinových derivátů (7-acetoxy-4-metylkumarinu (a – nahoře) a 7-acetoxycoumarinu (b – dole)) podél osy kolmé na membránu DMPC získané pomocí CF simulace. Pozice značených  $^{13}\text{C}$  atomů pozorovaných NMR experimentem jsou vyznačeny jako červené (C4) a zelené (C2) body, pozice těchto atomů získané výpočtem jsou vyznačeny jako červené a zelené křivky a dobře odpovídají experimentu.*

## 5. Diskuze

### 5.1 Membrány

Na rozdíly ve výsledných vlastnostech použitých modelů biologických membrán má vliv primárně složení polárních hlav. Membrána POPG je výrazně užší než membrána DOPC. Na jeden lipid připadá v membráně POPG větší plocha než v případě DOPC, celková hustota hmoty v membráně je v případě POPG nižší. Tyto rozdíly není možné přičítat rozdílným lipidovým řetězcům, jelikož se vzrůstající nenasyčeností acylových řetězců vzrůstá i plocha povrchu membrány, což by mělo mít za následek větší plochu membrány DOPC. Ovšem větší plochu má POPG, za větší plochu membrány mohou tedy polární hlavy – jejich bližšímu seskupení mohou bránit jak jejich náboje, tak i jiný objem polárních hlav POPG oproti DOPC. V negativně nabitých hlavách membrány POPG se vyskytují hydrofilní i hydrofobní části, které se navzájem odpuzují, zatímco polární hlavy membrány DOPC obsahují pouze hydrofilní částice s kladnými i zápornými náboji, membrána je tak celkově elektroneutrální a zároveň hustěji uspořádaná. V průběhu simulace vstupuje voda do POPG hlouběji a častěji než do membrány DOPC, což lze vidět i z profilu hustot jednotlivých skupin (Obrázek 4) – zatímco v membráně DOPC je voda prakticky nezastoupená (průnik vody byl pozorován velmi zřídka), v membráně POPG tvoří voda v průměru cca 5% hmoty vnitřních částí membrány. Z těchto vlastností se dá předpokládat, že polární látky vstupují do membrány POPG snadněji než do DOPC.

### 5.2 Pozice molekul na membránách DOPC a POPG

Rychlost konvergence profilů volné energie výrazně klesá se vzrůstající polaritou molekul. Nabitě molekuly (ibuprofen a 3-hydroxyibuprofen) vyžadují delší simulační čas, jelikož i po 10 ns simulací pomocí metody umbrella sampling dochází stále k výrazným změnám výsledných sledovaných hodnot. Z nenabitých molekul byly prodlužovány převážně simulace molekul polárnějších (chlorzoxazon, 7-hydroxykumarin, paraxantin ...). Další vliv na nutnost prodlužování simulací umbrella sampling má způsob generování startovních struktur (viz kapitola 5.3).

Pro vyhodnocení volných simulací molekul na membránách je třeba dlouhý simulační čas. Volné simulace molekul byly dlouhé 20 ns, za tuto dobu již některé molekuly dosáhly oblasti svého energetického minima, další ovšem obtížněji a pomaleji prostupovaly oblastí polárních hlav. Volné simulace byly využity pouze pro generování startovních struktur a nebyly dále vyhodnocovány.

Profily volné energie molekul v membráně DOPC obvykle směřují k jednomu energetickému minimu v okolí polárních hlav (případně v regionu 3) a jednomu malému lokálnímu minimu uprostřed membrány (Obrázek 8), kde je celková hustota hmoty nižší. Zpočátku se v simulacích molekul na DOPC obvykle ukazují dvě minima v blízkosti povrchu membrány, z nichž jedno posléze zaniká (obvykle to vzdálenější od středu membrány, s výjimkou paraxantinu, kde vzdálenější minimum nabývá s časem naopak na důležitosti).



V simulacích molekul na POPG se na počátku simulace vyskytují dvě energetická minima velmi zřídka, také se zde ovšem zřídka vyskytuje lokální energetické minimum uprostřed membrány a energie potřebná k penetraci molekuly do středu membrány se blíží energii vytvoření vodného póru v membráně. Pokud molekula vstoupí hlouběji do membrány, následují ji molekuly vody, které (nejspíše díky nižší hustotě membrány POPG) poměrně volně vstupují i vystupují z membrány a tím zvyšují energii penetrace  $\Delta G^{\text{pen}}$  (Obrázek 8). Molekuly vnořených látek se nicméně v membráně POPG díky vodám vyskytují blíže polárnímu prostředí, což má za následek, že  $\Delta G^{\text{wat}}$  je v případě POPG výrazně nižší než u membrány DOPC (Obrázek 9 a Obrázek 10).

Přestože je membrána POPG užší, nelze spolehlivě pozorovat bližší vzdálenost molekul ke středu membrány. Při srovnání relativní polohy látek (v procentech vzdálenosti fosforů od středu membrány) se látky na membráně POPG vyskytují dále od středu membrány (Tabulka 5) nebo ve stejné relativní vzdálenosti (v případě chlorzoxazonu, kumarinu a paraxantinu). Při srovnání energetických bariér je možné pozorovat, že bariéry mezi vodou a membránou  $\Delta G^{\text{wat}}$  jsou v případě POPG výrazně nižší než u DOPC (s výjimkou 7-hydroxykumarinu a chlorzoxazonu).

Dále je možné sledovat, že zatímco v membráně DOPC je častým znakem lokální energetické minimum ve středu membrány, v membráně POPG se tak děje pouze v případě 7-hydroxykumarinu. Tento rozdíl je možné připisovat vyšší hustotě lipidů ve středu POPG membrány (region 4) v porovnání s DOPC membránou a naopak nižší hustotě POPG membrány v regionech 1 a 2 (Obrázek 4), kterými do membrány snadněji proniká voda (ta u DOPC z membrány v průběhu simulace postupně mizí).

Jednotlivé substráty se v membráně DOPC vyskytují hlouběji než jejich metabolity. Substráty byly vybírány tak, abychom je mohli porovnat s jejich metabolity vytvářené v CYP<sup>30</sup>. Výsledné produkty se jeví jako hydrofilnější molekuly. V průměru se substráty vyskytují cca o 0,4 nm hlouběji v membráně než příslušné metabolity (Obrázek 10). Tyto výsledky podporují hypotézu o selektivitě CYP a obzvláště o rozdílných pozicích vstupních a výstupních kanálech z CYP.<sup>31</sup>

Hydroxylace molekul (nebo demethylace v případě kofeinu) způsobuje nejen jiné umístění těžiště molekul, ale viditelně také jinou orientaci molekuly. Tím, že substráty mají obvykle jednu stranu molekuly polárnější (a tedy mají větší dipólový moment), jsou často orientované svou nejdelsí osou rovnoběžně s lipidovými řetězci, přičemž jejich polární skupiny jsou natočené k polárním hlavám lipidů (Obrázek 10). Hydroxylace molekul pak většinou probíhá na jiné straně molekul než u původních polárních skupin, naboje jsou tudíž více rozložené, a proto jsou metabolity orientovány většinou rovnoběžně s povrchem membrány, aby se obě polární části molekul vystavily do vodného prostředí.

V případě substrátů a metabolitů na membráně POPG je rozdíl v umístění molekul výrazně menší, substráty se v průměru vyskytují o 0,2 nm hlouběji v membráně, ale v případě kofeinu a ibuprofenu (-1) se metabolity dokonce vyskytují v membráně hlouběji než příslušné substráty (Obrázek 9). Na rozdíl v chování látek na membránách má zřejmě vliv snadnější prostupnost polárních molekul (vody) polárními hlavami POPG membrány.

Membrány DOPC a POPG se liší také v rozdílech energetických bariér mezi substráty a metabolity. Na membráně DOPC je  $\Delta G^{\text{wat}}$  substrátů v průměru o 1,4 kcal/mol větší než  $\Delta G^{\text{wat}}$  metabolitů, zatímco na membráně POPG je  $\Delta G^{\text{wat}}$  substrátů v průměru o 0,6 kcal/mol větší než metabolitů.  $\Delta G^{\text{pen}}$  je o 1,4 kcal/mol menší než  $\Delta G^{\text{pen}}$  metabolitů v případě membrány DOPC, v případě membrány POPG je  $\Delta G^{\text{pen}}$  substrátů je o 0,6 kcal/mol menší než  $\Delta G^{\text{pen}}$  metabolitů (Obrázek 8 a Tabulka 5).

### 5.3 Konvergence profilů volné energie u kumarinu

Abychom zjistili, jak dlouhá simulace je pro určení reálných pozic a energetických bariér zapotřebí, byl důkladně prostudován systém kumarin – DOPC, na kterém byl studován vliv startovních struktur a volba simulační metody na konvergenci profilů volné energie a určení pozice látky v membráně.

#### 5.3.1 Ve volné simulaci zůstává kumarin převážně mezi regiony 2 a 3

V průběhu 5 volných simulací s celkovou délkou 3  $\mu\text{s}$  kumarin preferoval oblast lipidů před oblastí vody (Obrázek 11). V průběhu prvních 10 ns vnikl do membrány a již ji dále neopustil. Kumarin se nejčastěji vyskytoval ve vzdálenosti  $1,4 \pm 0,1$  nm od středu membrány – tj. na rozhraní regionů 2 a 3. Molekula byla obvykle orientována svými kyslíky k vodě. Kumarin bez větších obtíží procházel z jedné strany membrány na druhou, v oblastech energetických minim (v obou vrstvách membrány) zůstával řádově stovky ns, ve středu membrány (v lokálním minimu volné energie) zůstával krátce – jednotky ns. Celková doba přechodu mezi vrstvami membrány byla rychlá – řádově několik (<20) ns.

Z grafu partičních koeficientů (tedy z relativní průměrné hustoty výskytu kumarinu) lze vyčíst vlastnosti penetrace kumarinu – konkrétněji pozice energetických minim, kvalitativní srovnání výšky energetických bariér – penetrační ( $\Delta G^{\text{pen}}$ ) a mezi vodou a membránou ( $\Delta G^{\text{wat}}$ ).  $\Delta G^{\text{wat}}$  vypadá na první pohled vyšší než  $\Delta G^{\text{pen}}$ , jelikož kumarin neopustil prostředí membrány, zato však vícekrát překonal penetrační bariéru  $\Delta G^{\text{pen}}$  a přešel do druhé vrstvy membrány. Jelikož bylo vnitřní prostředí membrány poměrně dobře prozkoumáno, bylo možné odhadnout výšku penetrační bariéry: cca 2,1 kcal/mol. Je třeba zdůraznit, že tuto hodnotu je nutno brát s rezervou, jelikož přechodů mezi vrstvami nebylo tolik, aby vytvořily vhodný statistický vzorek. Hodnota  $\Delta G^{\text{wat}}$  nemůže být odhadnuta, jelikož nedošlo k žádnému spontánnímu přechodu z membrány do vodného prostředí, počáteční vniknutí kumarinu do membrány ovšem poukazuje na absenci energetické bariéry pro kumarin při vstupu do membrány.

#### 5.3.2 Kvalitativní srovnání profilů volné energie

Výsledné profily volné energie z řízených simulací (UP, CP, UF a CF) si navzájem odpovídají, ale simulace se strukturami z volné (neřízené) simulace dávají přesnější informace. Hlavní energetické minimum kumarinu se nachází v  $1,44 \pm 0,09$  nm, lokální energetické minimum je také ve středu membrány (Obrázek 12). Tato skutečnost je v souladu s dřívějšími zjištěními Bemporada a kol.,<sup>44</sup> který podobná minima uprostřed membrány pozoroval v případě malých molekul jako např. voda nebo acetamid. Penetrační bariéra potřebná pro přechod středu membrány  $\Delta G^{\text{pen}}$  získaná řízenými simulacemi (2,6 - 3,3 kcal/mol) byla blízko hodnotě zhruba odhadnuté pomocí volných simulací

(2,1 kcal/mol). Ovšem energetická bariéra mezi vodou a lipidy už spadala v případě řízených simulací do výrazně širší oblasti (a pomocí volné simulace nemohla být určena vůbec). Pomocí metody CF (která je použita jako referenční, jelikož případné artefakty odstraňuje rychleji, viz dále) byla určena  $\Delta G^{\text{wat}}$  jako  $6,4 \pm 0,2$  kcal/mol. Kvalitativní srovnání velikostí bariér získaných řízenými simulacemi sedí s předpokladem stanoveným z volných simulací, že  $\Delta G^{\text{pen}}$  je nižší než  $\Delta G^{\text{wat}}$ .

### 5.3.3 Konvergence profilů volné energie

Ukázali jsme zde, že profily volné energie jsou velmi výrazně ovlivňovány volbou startovních struktur i následnou volbou řízených simulací. Simulace, které vycházely ze startovních struktur z pullingu (CP a UP) obsahovaly deformace membrány, které byly způsobeny právě tažením kumarinu z vodného prostředí (Obrázek 13). Podobné deformace již byly v literatuře několikrát popsány a jsou považovány za systematické chybové zatížení výpočtů pomocí řízených simulací. Např. Neale et al.<sup>17</sup> pozoroval deformace povrchu membrány, když do ní byla vkládána nabitá molekula. My jsme pozorovali nálevkovité prohnutí povrchu membrány, které bylo způsobenou vodou hydratující polární částí molekuly kumarinu. Tato hydratace byla u kumarinu taženého do membrány výrazně vyšší, než u kumarinu samovolně do membrány vstupujícího. Membránové deformace způsobovaly umělé minimum (okolo 2,0 nm – region 2) v profilu volné energie (Obrázek 13). Ve volné simulaci se ovšem kumarin v tomto „minimu“ nikdy nezdržel a ani nic jiného nepoukázalo na přítomnost lokálního energetického minima (Obrázek 11).

Toto umělé minimum bylo nejviditelnější při krátkých simulačních časech (<5 ns pro jedno simulační okno), s postupujícím simulačním časem mizelo (Obrázek 13). Hlavním důvodem pomalé konvergence (a tedy i časové náročnosti výpočtů profilů volné energie) bylo pomalé odstraňování přebytečných molekul vody z regionu 2. Přítomnost energetického minima (a jeho bariéry) měla také za následek podcenění  $\Delta G^{\text{wat}}$  při simulacích se startovními strukturami z pullingu (CP a UP). Zatímco bariéry mezi vodou a lipidy  $\Delta G^{\text{wat}}$  z volných simulací CF a UF se jeví již konvergované, v případě puding simulací nedosáhla  $\Delta G^{\text{wat}}$  rovnovážných hodnot ani za 50 ns v případě UP a dokonce ani za 100 ns v CP simulacích. Za tento simulační čas se ovšem už výšky energetických bariér získané všemi čtyřmi metodami (CP, UP, CF a UF) navzájem výrazně přiblížily (Obrázek 12).

V tomto světle se z-constraint simulace jeví jako efektivnější, jelikož při jejím použití bylo umělé minimum eliminováno již za 15 ns simulací (pro jedno simulační okno), zatímco v simulacích UP bylo toto minimum přítomno ještě po 50 ns simulací. Je velmi pravděpodobné, že pro polárnější (případně nabitě) molekuly bude potřeba ještě delší simulační čas, na což poukázali např. MacCallum<sup>51</sup> nebo Neale,<sup>17</sup> který potřeboval 80 – 205 ns pro jedno simulační okno, když studoval nabitě molekuly pomocí metody umbrella sampling. nicméně pro nepolární molekuly byla v některých případech konvergence dosažena již po 20 ns. Tyto vodní defekty se objevují, pokud jsou použity nevyrovnané startovní struktury. Vyšší účinnost simulací constraint (v porovnání s umbrella sampling) jsou také v souladu s nedávnými zjištěními van Gunsterena,<sup>74</sup> že metoda constraint (využívající průměrnou použitou sílu) je nejefektivnější metodou výpočtu profilu volné energie při proměnné vzdálenosti molekuly vůči jiné skupině či poloze.

### 5.3.4 Parciální náboje

I kdybychom použili ideální řízenou simulacemi s ideálními startovními strukturami, bez vhodné volby parciálních nábojů bychom nezískali přesné informace o systému. Silové pole pro lipidy Berger (které využívá Mullikenovy náboje spočítané metodou HF/6-31G\* v plynné fázi) podává vlastnosti lipidů blízké experimentálním hodnotám (jako plocha potřebná pro jeden lipid, objem jednoho lipidu atp.). Parciální náboje kumarinu (nebo ostatních malých molekul) je ovšem nutné stanovit zvlášť, jelikož nejsou součástí standardního silového pole. Všeobecně by se dalo říci, že atomové typy silového pole mohou být použity vcelku bez obtíží, ale samotný nábojový set musí být pečlivě stanoven, jelikož může do výpočtu vnést nezanedbatelnou systematickou chybu.

Pro test parciálních nábojů jsme použili tři nábojové sety (se stejnými atomovými typy i ostatními parametry silového pole): jeden vygenerován pomocí serveru PRODRG2Beta, druhý přiřazenými pomocí Mullikenovy populační analýzy a třetí pomocí metody RESP na elektrostatickém potenciálu vypočítaném metodou B3LYP/cc-pVDZ v plynné fázi. Při pohledu na výsledky je možné říci, že zvýšením dipólového momentu (použitím PRODRG nebo Mullikenových nábojů) se snižuje  $\Delta G^{\text{wat}}$  a zvyšuje  $\Delta G^{\text{pen}}$  (Obrázek 15). Tato zjištění souhlasí s předpokladem, že polárnější molekuly (s PRODRG nebo Mullikenovými náboji ve srovnání s RESP náboji) budou více preferovat vodné prostředí.

To samo o sobě ještě neodpovídá na otázku, které náboje jsou vhodnější pro použití při membránových simulacích. Každopádně použití PRODRG nábojů vede k přecenění dipólového momentu, použití těchto nábojů vede také k nerealistickému rozdělení látek na rozhraní cyklohexan/voda, jak ukázal Lemkul et al.<sup>72</sup> Tato preference vodného prostředí u nábojového setu PRODRG je v souladu i s naším pozorováním. Celkově vzato náboje získané metodou RESP se jeví jako vhodnější pro membránové simulace malých molekul než náboje získané se serveru PRODRG. Otázkou ovšem nadále zůstává, zdali by náboje měly být generovány v plynné fázi či v implicitním solventu, případně zda mohou být bez potíží kombinovatelné se silovým polem Berger a atomovými typy v něm obsaženými.

## 6. Závěr

V této práci byly prostudovány profily volné energie substrátů lidských cytochromů P450 (CYP) a jejich metabolitů na membránách dioleoylfosfatidylcholinu (DOPC) a palmitoyloleoylfosfatidylglycerolu (POPG). Bylo zjištěno, že substráty CYP jsou v membránách umístěné v průměru hlouběji než jejich příslušné metabolity. Toto zjištění podporuje hypotézu, že pro vstup substrátu a výstup metabolitu z CYP jsou používány jiné tunely a jejich umístění může mít vliv na selektivitu CYP. Dále bylo zjištěno, že se molekuly v membráně orientují přednostně svými polárními skupinami k polárním hlavám lipidů. Molekuly se dále liší průchodností různými membránami, jak bylo ukázáno na srovnání DOPC a POPG, což může mít výrazný vliv na cílení léčiv na konkrétní orgán, organelu či organismus – např. bakterie.

V druhé části práce byly analyzovány artefakty vznikající generováním startovních struktur pomocí tažení molekuly do membrány (pullingu). Tento proces vede k dvěma minimům energie v oblasti polárních hlav, které se ve výsledném profilu nevyskytují, použijeme-li pro generování startovních struktur volnou simulaci. Tento artefakt byl ovšem výrazně rychleji odstraněn, pokud byla jako řízená simulace použita metoda z-constraint. Pro další práci tudíž navrhujeme následující simulační protokol:

- Výpočet parciálních nábojů molekuly pomocí metody RESP
- Volná simulace molekuly v okolí membrány (nevnikne-li molekula dostatečně hluboko do membrány, je vhodné použít pomalý pulling ( $\leq 1 \text{ nm}\cdot\text{ns}^{-1}$ ) se slabou silovou konstantou ( $\leq 500 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ ))
- Simulace constraint s alespoň 10 ns pro každé simulační okno
  - Pro hrubý odhad profilu volné energie lze použít simulační okna se vzájemnou vzdáleností až 0,4 nm.
  - Pro přesný popis profilu volné energie je vhodnější použít vzájemnou vzdálenost 0,1 nm mezi simulačními okny

## 7. Použité zdroje

- (1) Iversen, T.-G.; Skotland, T.; Sandvig, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **2011**, *6*, 176-185.
- (2) Cooper, G. M. *The Cell: A Molecular Approach, 2nd ed.*; Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
- (3) Yeagle, P. L. Cell Membrane Features. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*; Joh Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2009.
- (4) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of THE CELL*; Anderson, M.; Granum, S., Eds.; 5th ed.; New York: Garland Science, 2008.
- (5) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science* **1972**, *175*, 720 - 730.
- (6) Biology 1A - Lecture 5: The structure of biological membranes. [http://www.youtube.com/watch?v=eOxIWZrEwu0&list=PL1BA6A674738B5ECB&feature=mh\\_lolz](http://www.youtube.com/watch?v=eOxIWZrEwu0&list=PL1BA6A674738B5ECB&feature=mh_lolz) (accessed Apr 23, 2012).
- (7) Cooper, G. M. *The Cell, A Molecular Approach*; Sinauer Associates, 2000.
- (8) Krylov, A. V.; Pohl, P.; Zeidel, M. L.; Hill, W. G. Water permeability of asymmetric planar lipid bilayers: leaflets of different composition offer independent and additive resistances to permeation. *J. Gen. Physiol.* **2001**, *118*, 333-40.
- (9) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids : Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112-124.
- (10) Kucerka, N.; Marquardt, D.; Harroun, T. a; Nieh, M.-P.; Wassall, S. R.; Katsaras, J. The functional significance of lipid diversity: orientation of cholesterol in bilayers is determined by lipid species. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16358-16359.
- (11) Brown, D. a; London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17221-17224.
- (12) Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Marsudaira, P. *Molecular Cell Biology*; 6th ed.; Freeman, W. H., 2008.
- (13) Hoopes, M. I.; Noro, M. G.; Longo, M. L.; Faller, R. Bilayer structure and lipid dynamics in a model stratum corneum with oleic acid. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 3164-3171.
- (14) Brown, R. E. Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 1-9.
- (15) Marrink, S. J.; de Vries, A. H.; Harroun, T. a; Katsaras, J.; Wassall, S. R. Cholesterol Shows Preference for the Interior of Polyunsaturated Lipid Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10-1.
- (16) Marrink, S.-J.; Berendsen, H. J. C. Simulation of Water Transport through a Lipid Membrane. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4155-4168.

- (17) Neale, C.; Bennett, W. F. D.; Tieleman, D. P.; Pomès, R. Statistical Convergence of Equilibrium Properties in Simulations of Molecular Solutes Embedded in Lipid Bilayers. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 4175-4188.
- (18) Orsi, M.; Essex, J. W. Permeability of Drugs and Hormones through a Lipid Bilayer: Insights from Dual-Resolution Molecular Dynamics. *Soft Matter* **2010**, *6*, 3797-3808.
- (19) Bemporad, D.; Luttmann, C.; Essex, J. W. Behaviour of Small Solutes and Large Drugs in a Lipid Bilayer from Computer Simulations. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1718*, 1-21.
- (20) Xiang, T.-X.; Anderson, B. D. Liposomal Drug Transport: a Molecular Perspective from Molecular Dynamics Simulations in Lipid Bilayers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1357-1378.
- (21) Sprong, H.; Sluijs, P. V. D.; Meer, G. V. How Proteins Move Lipids and Lipids Move Proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 504-513.
- (22) Müller, D. J.; Wu, N.; Palczewski, K. Vertebrae Membrane Proteins: Structure, Function, and Insights from Biophysical Approaches. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60*, 43-78.
- (23) Pandit, S. a; Chiu, S.-W.; Jakobsson, E.; Grama, A.; Scott, H. L. Cholesterol Packing around Lipids with Saturated and Unsaturated Chains: a Simulation Study. *Langmuir* **2008**, *24*, 6858-6865.
- (24) Coster, H. G. L. The Physics of Cell Membranes. *J. Biol. Phys.* **2003**, *29*, 363-399.
- (25) Zhang, M.-Q.; Wilkinson, B. Drug Discovery Beyond the “Rule-of-five”. *Current Opinion in Biotechnology* **2007**, *18*, 478-88.
- (26) Lipinski, C. a; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- (27) Finnin, B. C.; Morgan, T. M. Transdermal Penetration Enhancers : Applications , Limitations , and Potential. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 955-958.
- (28) Bolzinger, M.-A.; Briançon, S.; Pelletier, J.; Chevalier, Y. Penetration of Drugs through Skin, a Complex Rate-controlling Membrane. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, 1-10.
- (29) Eddershaw, P. J.; Beresford, A. P.; Bayliss, M. K. ADME / PK as Part of a Rational Approach to Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 409-414.
- (30) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cellular and Molecular Life Sciences Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 737- 747.
- (31) Berka, K.; Hendrychová, T.; Anzenbacher, P.; Otyepka, M. Membrane Position of Ibuprofen Agrees with Suggested Access Path Entrance to Cytochrome P450 2C9 Active Site. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 11248-11255.
- (32) Cojocaru, V.; Winn, P. J.; Wade, R. C. The Ins and Outs of Cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1770*, 390-401.

- (33) Lewis, D. F. V.; Ito, Y.; Lake, B. G. Metabolism of Coumarin by Human P450s: a Molecular Modelling Study. *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 256-64.
- (34) Marrink, S. J.; Vries, A. H. D.; Mark, A. E. Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 750-760.
- (35) Rouse, S.; Carpenter, T.; Sansom, M. S. P. Coarse-grained Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins. In *Molecular Simulations and Biomembranes 1st Ed.*; RSC, 2010; pp. 56-75.
- (36) van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Feenstra, K. A.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. GROMACS, User manual, Version 4.5.4.
- (37) Malijeviský, A. *Lekce ze statistické termodynamiky*; 3rd ed.; Praha : VŠCHT Praha, 2009.
- (38) Marrink, S. J.; Berendsen, H. J. C. Permeation Process of Small Molecules across Lipid Membranes Studied by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16729-16738.
- (39) Kumar, S.; Rosenberg, J.; Bouzida, D.; Swensen, R. H.; Kollman, P. A. The Weighted Histogram Analysis Method for Free Energy Calculations on Biomolecules. I. The Method. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 1011-1021.
- (40) Torrie, G. M.; Calleau, J. P. Nonphysical Sampling Distribution in Monte Carlo Free Energy Estimation: Umbrella Sampling. *J. Comput. Phys.* **1997**, *23*, 187-199.
- (41) Boggara, M. B.; Krishnamoorti, R. Partitioning of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Lipid Membranes: a Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 586-595.
- (42) Bemporad, D.; Luttmann, C.; Essex, J. W. Computer Simulation of Small Molecule Permeation across a Lipid Bilayer: Dependence on Bilayer Properties and Solute Volume, Size, and Cross-Sectional Area. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1-13.
- (43) Orsi, M.; Sanderson, W. E.; Essex, J. W. Permeability of Small Molecules through a Lipid Bilayer: a Multiscale Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12019-12029.
- (44) Bemporad, D.; Essex, J. W.; Luttmann, C. Permeation of Small Molecules through a Lipid Bilayer: A Computer Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 4875-4884.
- (45) Zhang, Y.; Voth, G. A. Combined Metadynamics and Umbrella Sampling Method for the Calculation of Ion Permeation Free Energy Profiles. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2277-2283.
- (46) Laio, A.; Parrinello, M. Escaping Free-Energy Minima. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12562-12566.
- (47) Wei, C.; Pohorille, A. Permeation of Membranes by Ribose and Its Diastereomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10237-10245.
- (48) Darve, E.; Pohorille, A. Calculating Free Energies Using Average Force. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 9169.



- (49) Tai, K. Conformational Sampling for the Impatient. *Biophys. Chem.* **2004**, *107*, 213-220.
- (50) Roux, B. The Calculation of the Potential of Mean Force Using Computer Simulations. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 275-282.
- (51) MacCallum, J. L.; Bennett, W. F. D.; Tieleman, D. P. Distribution of Amino Acids in a Lipid Bilayer from Computer Simulations. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 3393-3404.
- (52) Kandt, C.; Ash, W. L.; Tieleman, D. P. Setting up and Running Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins. *Methods* **2007**, *41*, 475-488.
- (53) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics* **1996**, *14*, 33-38.
- (54) Tejwani, R. W.; Davis, M. E.; Anderson, B. D.; Stouch, T. R. Functional Group Dependence of Solute Partitioning to Various Locations within a DOPC Bilayer : A Comparison of Molecular Dynamics Simulations with Experiment. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 2136-2146.
- (55) Palonc'ová, M.; Berka, K.; Otyepka, M. Convergence of Free Energy Profile of Coumarin in Lipid Bilayer. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 1200 - 1211.
- (56) Domański, J.; Stansfeld, P. J.; Sansom, M. S. P.; Beckstein, O. Lipidbook: a Public Repository for Force-Field Parameters Used in Membrane Simulations. *J. Membr. Biol.* **2010**, *236*, 255-258.
- (57) Siu, S.; Vácha, R.; Jungwirth, P.; Böckmann, R. A. Biomolecular Simulation of Membranes: Physical Properties from Different Force Fields. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 125103.
- (58) Kukol, A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 615-626.
- (59) 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.
- (60) Berger, O.; Edholm, O.; Jahnig, F. Molecular Dynamics Simulations of a Fluid Bilayer of Dipalmitoylphosphatidylcholine at Full Hydration, Constant Pressure, and Constant Temperature. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2002-2013.
- (61) Shinoda, W.; Mikami, M.; Baba, T.; Hato, M. Molecular Dynamics Study on the Effects of Chain Branching on the Physical Properties of Lipid Bilayers: 2. Permeability. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9346-9356.
- (62) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N.log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089-10092.
- (63) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463-1472.
- (64) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical Sampling Through Velocity Rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101.

- (65) Berendsen, H.; Postma, J.; Vangunsteren, W.; Dinola, A.; Haak, J. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.
- (66) Schüttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F. PRODRG: a Tool for High-Throughput Crystallography of Protein-Ligand Complexes. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1355-1363.
- (67) Oostenbrink, C.; Soares, T. A.; van der Vegt, N. F. A.; van Gunsteren, W. F. Validation of the 53A6 GROMOS Force Field. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34*, 273-284.
- (68) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; 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.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision E.01, Gaussian, Inc. Wallingford CT **2004**.
- (69) Cieplak, P.; Caldwell, J.; Kollman, P. Molecular Mechanical Models for Organic and Biological Systems Going Beyond the Atom Centered Two Body Additive Approximation: Aqueous Solution Free Energies of Methanol and N-Methyl Acetamide, Nucleic Acid Base, and Amide Hydrogen Bonding and Chloroform/. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 1048-1057.
- (70) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E., 3rd; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. AMBER 11, University of California, San Francisco **2010**.
- (71) Hub, J. S.; Groot, B. L. D.; Spoel, D. V. D. g\_wham-A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 3713-3720.
- (72) Lemkul, J. A.; Allen, W. J.; Bevan, D. R. Practical Considerations for Guiding GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 2221-2235.
- (73) Biocomputing at the University Of Calgary, <http://people.ucalgary.ca/~tieleman/download.html> (accessed Oct 12, 2011).
- (74) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Gunsteren, W. F. van; Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In *Intermolecular Forces*; Pullman, B., Ed.; Reidel Publishing Company, 1981; pp. 331-338.

## 8. Přílohy

Jako přílohy přikládám komentované parametry jednotlivých simulací a publikaci s výsledky pro konvergenci zanoření kumarinu v membráně.

### 8.1 Parametry simulací (mdp)

#### 8.1.1 Volná simulace

; Základní parametry simulace

```
integrator      = md           ; Metoda - molekulová dynamika; leap-frog algoritmus
tinit          = 0             ; Počáteční čas
dt             = 0.002         ; Simulační krok = 2 fs
nsteps         = 10000000      ; Celková délka simulace v počtech kroků = 20 ns
comm-mode      = Linear        ; Odstraňuje posun těžiště v osách x, y, z
nstcomm        = 500          ; Frekvence odstraňování posunu těžiště = 1 ps
```

; Parametry výstupních souborů

; do \*.trr trajektorie se nezapisují polohy, rychlosti ani síly

```
nstxout        = 0
nstvout        = 0
nstfout        = 0
```

; Zápis energie

```
nstlog         = 500          ; Energie se do *.log souboru zapisuje každou 1 ps
nstenergy      = 500          ; Energie se do *.edr souboru zapisuje každou 1 ps
```

; Zápis souboru \*.xtc

```
nstxtcout      = 500          ; Do xtc trajektorie se zapisují polohy každou 1 ps
xtc-precision  = 1000         ; Přesnost xtc trajektorie = 1 pm
```

; Parametry hledání sousedních atomů pro výpočet nekovalentních interakcí

```
nstlist        = 10           ; Každých 10 kroků je provedeno hledání sousedních atomů
ns_type        = grid         ; Sousední atomy jsou hledány dle mřížky
pbc            = xyz          ; Periodické okrajové podmínky ve všech směrech
periodic_molecules = no      ; Systém neobsahuje periodické molekuly
rlist          = 0.9          ; Jako blízké sousední atomy jsou uvažovány atomy do vzdálenosti 0,9 nm
```

; Elektrostatika a vdW interakce

```
coulombtype    = PME          ; Particle-Mesh Ewaldova metoda výpočtu elektrostatiky
rcoulomb       = 0.9          ; Coulombický cut-off ve vzdálenosti 0,9 nm
vdw-type       = Cut-off
rvdw           = 1.0          ; Lennardův-Jonesův potenciál uvažován do 1 nm
```

; Parametry výpočtu elektrostatických interakcí

```
pme_order      = 4            ; Řád Ewaldovy sumace
ewald_rtol     = 1e-05        ; Tolerance Ewaldovy sumace
optimize_fft    = yes         ; Optimalizace Fourierovy transformace pro výpočet Ewaldovy sumace
```

; Termostat udržuje teplotu systému 300 K pomocí škálování rychlostí

```

tcoupl          = V-rescale
tc-grps        = system      ; Teplota udržovaná pro celý systém dohromady
tau_t          = 0.1         ; Každých 0,1 ps je aktualizován termostat
ref_t          = 300         ; Referenční teplota v Kelvinech

; Anizotropický Berendsenův barostat je aktualizován každých 10 ps
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = anisotropic
tau_p          = 10
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5 0 0 0 ; Kompresibilita (1/bar)
ref_p          = 1.0 1.0 1.0 0 0 0 ; Tlak (bar) v osách x, y, z, xy, xz, yz

; Na počátku simulace jsou náhodně vygenerovány rychlosti při teplotě 300 K
gen_vel        = yes
gen_temp       = 300
gen_seed       = 173529

; Na všechny vazby je použit LINCS algoritmus
constraints    = all-bonds
constraint-algorithm = Lincs

```

## 8.1.2 Pulling

```

; Základní parametry simulace
integrator      = md          ; Metoda - molekulová dynamika; leap-frog algoritmus
dt              = 0.002      ; Simulační krok = 2 fs
tinit          = 0           ; Počáteční čas
nsteps         = 3000000     ; Délka simulace = 6 ns
nstcomm        = 1           ; Frekvence odstraňování posunu těžiště
comm_mode      = Linear      ; Odstraňuje posun těžiště

; Parametry výstupních souborů
; frekvence zápisu poloh (x), rychlostí (v) a sil (f) do *.trr
nstxout        = 10000      ; Každých 20 ps
nstvout        = 10000
nstfout        = 500        ; Každou 1 ps

; Zápis souboru *.xtc a *.edr
Nstxtcout      = 500        ; Do xtc trajektorie se zapisují polohy každou 1 ps
nstenergy      = 500        ; Energie se do *.edr soubory zapisují každou 1 ps

; Vazebné parametry
constraints     = all-bonds

; Parametry hledání sousedních atomů
nstlist        = 5          ; Každých 5 kroků je provedeno hledání sousedních atomů
ns_type        = grid       ; Sousední atomy jsou hledány dle mřížky
rlist          = 1.4        ; Blízcí sousedé jsou uvažováni do vzdálenosti 1,4 nm

; Elektrostatika a vdW interakce
coulombtype    = PME        ; Particle-Mesh Ewaldova elektrostatika
rcoulomb       = 1.4        ; Coulombický cut-off v 1,4 nm
vdw-type       = Cut-off
rvdw           = 1.4        ; LJ potenciál uvažován do 1,4 nm

```

```

; Parametry výpočtu elektrostatických interakcí
pme_order      = 4           ; Řád Ewaldovy sumace
ewald_rtol     = 1e-05      ; Tolerance Ewaldovy sumace
optimize_fft   = yes        ; Optimalizace Fourierovy transformace pro výpočet
                                Ewaldovy sumace

```

```

; Termostat udržuje teplotu systému 310 K pomocí škálování rychlostí
tcoupl        = V-rescale
tc-grps       = system      ; Teplota udržovaná pro celý systém dohromady
tau_t         = 0.1         ; Každých 0,1 ps je aktualizován termostat
ref_t         = 310

```

```

; Anizotropický Berendsenův barostat je aktualizován každých 10 ps
Pcoupl        = berendsen
Pcoupltype    = anisotropic
tau_p         = 10
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5 0 0 0 ; Kompresibilita (1/bar)
ref_p         = 1.0 1.0 1.0 0 0 0           ; Tlak (bar)

```

```

; Na počátku simulace jsou náhodně vygenerovány rychlosti při teplotě 300 K
gen_vel       = yes
gen_temp      = 300
gen_seed      = 173529

```

```

; Pull code
pull          = umbrella    ; Použit harmonický potenciál
pull_geometry = position    ; Aplikováno tažení podél pull_vec1
pull_vec1     = 0 0 -1     ; Vektor podél osy z (+1 nebo -1)
pull_start    = yes        ; Počátek harmonického potenciálu ve vzdálenosti při t=0
pull_ngroups  = 1          ; Potenciál je aplikován na jednu skupinu
pull_group0   = DOPC       ; Referenční skupina
pull_group1   = DRG        ; Skupina, na kterou je aplikován potenciál
pull_rate1    = 0.001      ; 0.001 nm/ps = 1 nm/ns
pull_k1       = 10000      ; Silová konstanta = 10 000 kJ mol-1 nm-1

```

### 8.1.3 Umbrella sampling

```

; Základní parametry simulace
integrator     = md         ; Metoda - molekulová dynamika; leap-frog algoritmus
dt            = 0.002      ; Simulační krok = 2 fs
tinit         = 0          ; Počáteční čas
nsteps        = 2625000    ; Simulační čas = 5.250 ns - 250 ps na ekvilibraci
nstcomm       = 1          ; Frekvence odstraňování posunu těžiště
comm_mode     = Linear     ; Odstraňuje posun těžiště

```

```

; Parametry výstupních souborů
; do *.trr trajektorie se nezapisují polohy, rychlosti ani síly
nstxout       = 0
nstvout       = 0
nstfout       = 0

```

```

; Zápis souboru *.xtc a *.edr
nstxtcout     = 500        ; Do xtc trajektorie se zapisují polohy každou 1 ps
nstenergy     = 500        ; Energie se do *.edr soubory zapisují každou 1 ps

```

```

; Vazebné parametry
constraints = all-bonds

; Parametry hledání sousedů
nstlist = 5 ; Každých 5 kroků je provedeno hledání sousedů
ns_type = grid ; Sousedé jsou hledány dle mřížky
rlist = 1.4 ; Blízcí sousedé jsou uvažovány do 1,4 nm

; Elektrostatika a vdW interakce
coulombtype = PME ; Particle-Mesh Ewaldova elektrostatika
rcoulomb = 1.4 ; Coulombický cut-off v 1,4 nm
vdw-type = Cut-off
rvdw = 1.4 ; LJ potenciál uvažován do 1,4 nm

; Parametry výpočtu elektrostatických interakcí
pme_order = 4 ; Řád Ewaldovy sumace
ewald_rtol = 1e-05 ; Tolerance Ewaldovy sumace
optimize_fft = yes ; Optimalizace Fourierovy transformace pro výpočet Ewaldovy sumace

; Termostat udržuje teplotu systému 310 K pomocí škálování rychlostí
tcoupl = V-rescale
tc-grps = system ; Teplota udržovaná pro celý systém dohromady
tau_t = 0.1 ; Každých 0,1 ps je aktualizován termostat
ref_t = 310

; Anizotropický Berendsenův barostat je aktualizován každých 10 ps
Pcoupl = berendsen
Pcoupltype = anisotropic
tau_p = 10
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5 0 0 0 ; Kompresibilita (1/bar)
ref_p = 1.0 1.0 1.0 0 0 0 ; Tlak (bar)

; Na počátku simulace jsou náhodně vygenerovány rychlosti při teplotě 300 K
gen_vel = yes
gen_temp = 300
gen_seed = 173529

; Pull code
pull = umbrella ; Je použit harmonický potenciál
pull_geometry = distance ; Je uvažována vzdálenost mezi dvěma skupinami
pull_dim = N N Y ; Potenciál je aplikován v ose z
pull_start = yes ; Počátek harmonického potenciálu ve vzdálenosti při t=0
pull_ngroups = 1 ; Potenciál je aplikován na jednu skupinu
pull_group0 = DOPC ; Referenční skupina
pull_group1 = DRG ; Skupina, na kterou je aplikován potenciál
pull_k1 = 2000 ; Harmonická konstanta = 2 000 kJ mol-1 nm-2

```

### 8.1.4 Z-constraint

```

; Základní parametry simulace
integrator = md ; Metoda - molekulová dynamika; leap-frog algoritmus
dt = 0.002 ; Simulační krok = 2 fs
tinit = 0 ; Počáteční čas

```

```

nsteps          = 2625000      ; Simulační čas = 5.250 ns - 250 ps na ekvilibraci
nstcomm        = 1            ; Frekvence odstraňování posunu těžiště
comm_mode      = Linear       ; Odstraňuje posun těžiště

; Parametry výstupních souborů
; do *.trr trajektorie se nezapisují polohy, rychlosti ani síly
nstxout        = 0
nstvout        = 0
nstfout        = 0

; Zápis souboru *.xtc a *.edr
nstxtcout      = 500          ; Do xtc trajektorie se zapisují polohy každou 1 ps
nstenergy      = 500          ; Energie se do *.edr soubory zapisují každou 1 ps

; Vazebné parametry
constraints     = all-bonds

; Parametry hledání sousedů
nstlist        = 5            ; Každých 5 kroků je provedeno hledání sousedů
ns_type        = grid         ; Sousedé jsou hledáni dle mřížky
rlist          = 1.4          ; Blízcí sousedé jsou uvažovány do 1,4 nm

; Elektrostatika a vdW interakce
coulombtype    = PME          ; Particle-Mesh Ewaldova elektrostatika
rcoulomb       = 1.4          ; Coulombický cut-off v 1,4 nm
vdw-type       = Cut-off
rvdw           = 1.4          ; LJ potenciál uvažován do 1,4 nm

; Parametry výpočtu elektrostatických interakcí
pme_order      = 4            ; Řád Ewaldovy sumace
ewald_rtol     = 1e-05        ; Tolerance Ewaldovy sumace
optimize_fft   = yes          ; Optimalizace Fourierovy transformace pro výpočet
                                Ewaldovy sumace

; Termostat udržuje teplotu systému 310 K pomocí škálování rychlostí
tcoupl        = V-rescale
tc-grps       = system        ; Teplota udržovaná pro celý systém dohromady
tau_t         = 0.1           ; Každých 0,1 ps je aktualizován termostat
ref_t         = 310

; Anizotropický Berendsenův barostat je aktualizován každých 10 ps
Pcoupl        = berendsen
Pcoupltype    = anisotropic
tau_p         = 10
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 4.5e-5 0 0 0 ; Kompresibilita (1/bar)
ref_p         = 1.0 1.0 1.0 0 0 0 ; Tlak (bar)

; Na počátku simulace jsou náhodně vygenerovány rychlosti při teplotě 300 K
gen_vel       = yes
gen_temp      = 300
gen_seed      = 173529

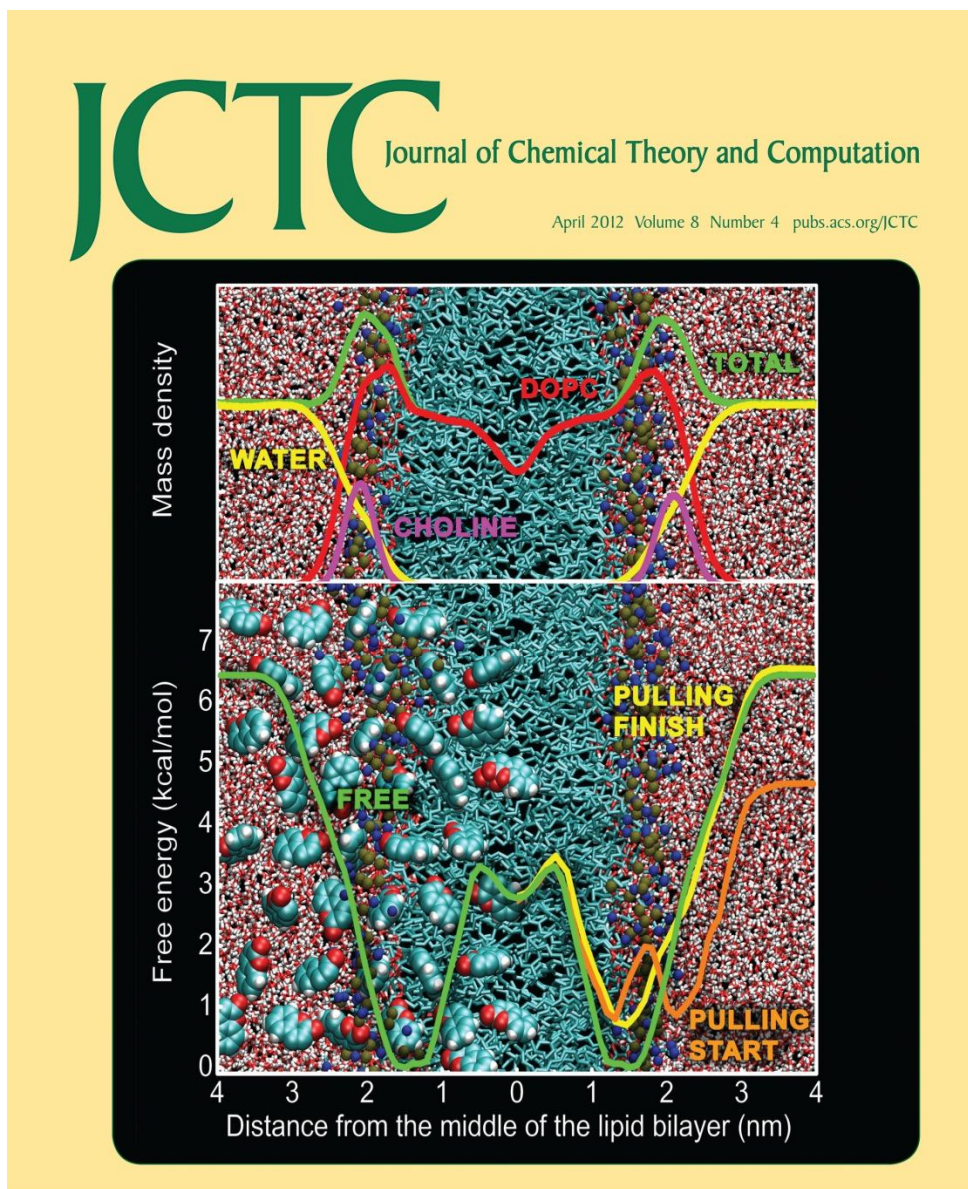
; Pull code
pull          = constraint     ; Je použita simulace z-constraint
pull_geometry = distance       ; Je uvažována vzdálenost mezi dvěma skupinami

```

pull_dim	= N N Y	; Vzdálenost je zafixována podél osy z ...
pull_start	= yes	; ... ve vzdálenosti v čase t=0
pull_ngroups	= 1	; Vzdálenost je fixována pro jednu skupinu
pull_group0	= DOPC	; Referenční skupina
pull_group1	= DRG	; Skupina, která je zkoumána metodou z-constraint

## 8.2 Článek

- Paloncyoova M, Berka K, Otyepka M: Convergence of Free Energy Profile of Coumarin in Lipid Bilayer. *J. Chem. Theory Comput.*, 8(4), 1200-1211, **2012**





# Convergence of Free Energy Profile of Coumarin in Lipid Bilayer

Markéta Paloncýová,<sup>†</sup> Karel Berka,<sup>\*,†</sup> and Michal Otyepka<sup>\*,†</sup><sup>†</sup>Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, tr. 17 listopadu 12, 771 46, Olomouc, Czech Republic

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** Atomistic molecular dynamics (MD) simulations of druglike molecules embedded in lipid bilayers are of considerable interest as models for drug penetration and positioning in biological membranes. Here we analyze partitioning of coumarin in dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) bilayer, based on both multiple, unbiased 3  $\mu$ s MD simulations (total length) and free energy profiles along the bilayer normal calculated by biased MD simulations ( $\sim 7 \mu$ s in total). The convergences in time of free energy profiles calculated by both umbrella sampling and z-constraint techniques are thoroughly analyzed. Two sets of starting structures are also considered, one from unbiased MD simulation and the other from “pulling” coumarin along the bilayer normal. The structures obtained by pulling simulation contain water defects on the lipid bilayer surface, while those acquired from unbiased simulation have no membrane defects. The free energy profiles converge more rapidly when starting frames from unbiased simulations are used. In addition, z-constraint simulation leads to more rapid convergence than umbrella sampling, due to quicker relaxation of membrane defects. Furthermore, we show that the choice of RESP, PRODRG, or Mulliken charges considerably affects the resulting free energy profile of our model drug along the bilayer normal. We recommend using z-constraint biased MD simulations based on starting geometries acquired from unbiased MD simulations for efficient calculation of convergent free energy profiles of druglike molecules along bilayer normals. The calculation of free energy profile should start with an unbiased simulation, though the polar molecules might need a slow pulling afterward. Results obtained with the recommended simulation protocol agree well with available experimental data for two coumarin derivatives.

## INTRODUCTION

Passive transport of drugs through membranes is the main process limiting their penetration into cells (in the absence of a specific active transporter) and thus a key step in their administration to the bodies of humans (and animals). Diffusion through membrane and partitioning between water and membrane phases are the key properties for this passive transport affecting kinetics and thermodynamics of permeation process,<sup>1,2</sup> respectively. Further, the equilibrium position of specific drugs in target membranes also affects their metabolism and transport (both active and passive).<sup>3–5</sup>

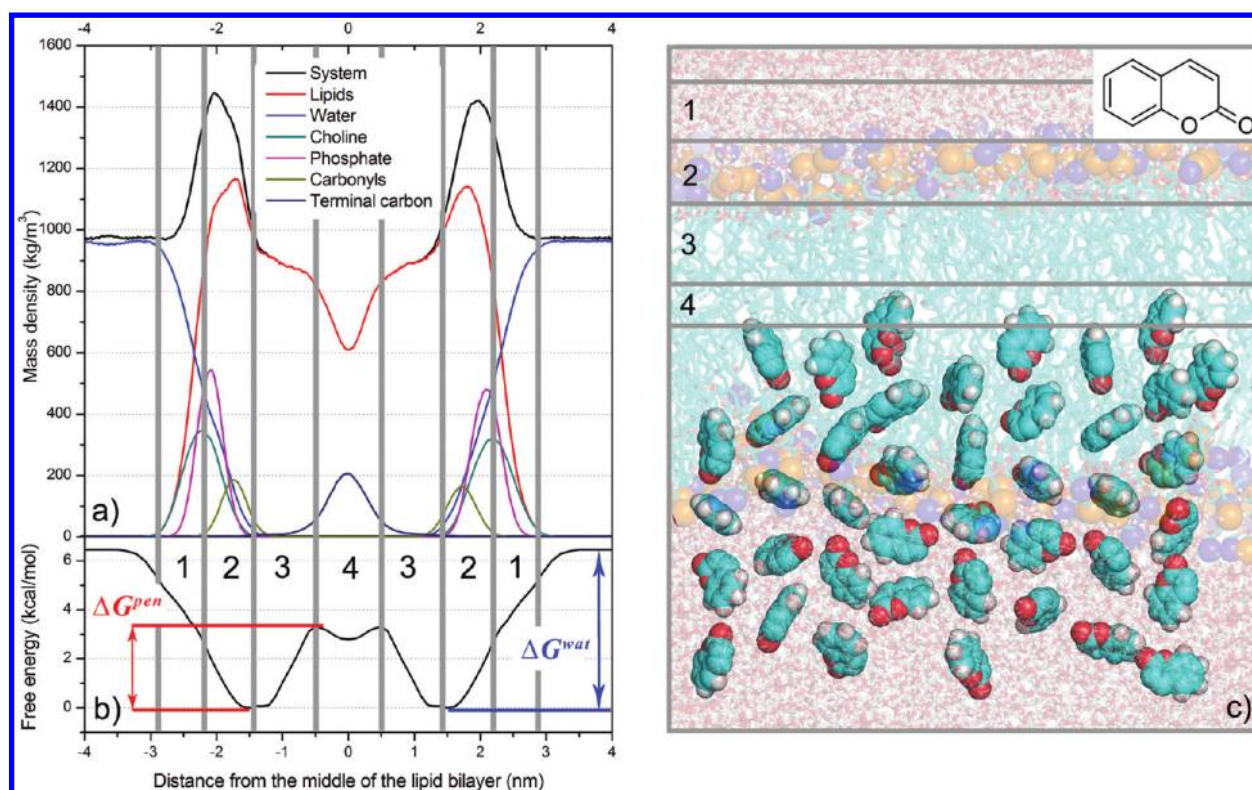
The composition of biological membranes is complex and diverse, varying substantially among the outer and inner leaflets of both organelles and organs.<sup>6,7</sup> They consist of proteins and lipids, in approximately equal mass proportions.<sup>8</sup> While proteins are responsible for active transport and signaling, lipids pose the main barrier to passive membrane transport. The most important membrane for drug administration is the plasma membrane, through which drugs must penetrate to reach the internal milieu of target cells. However, mitochondrial and endoplasmic reticulum membranes are also involved in drug metabolism because they accommodate various drug-metabolizing enzymes (e.g., cytochromes P450 and UDP-glucuronosyltransferases).<sup>5,9,10</sup> The most abundant lipids in mammalian membranes are phosphatidylcholines (PC), although phosphatidylserines, phosphatidylethanolamines, sphingomyelins, and cholesterol are also present,<sup>11</sup> thus PC bilayers are commonly used as simple membrane models. However, it must be remembered that in vivo membranes are much more complex, so results obtained using such simple models should be interpreted cautiously.

Several structural frameworks of lipid bilayers have been proposed, including the four-region model of Marrink and Berendsen<sup>12</sup> and others presented by Neale et al.<sup>13</sup> and Orsi et al.<sup>14</sup> The four-region model, applied in the study presented here, describes the physicochemical properties and densities of lipids in the following four regions along a bilayer's normal axis (Figure 1):

- (i) The *low headgroup density* region (hereafter region 1), a polar zone with similar transport conditions to water, from the point where head groups are first encountered (at minimal density) and ending where the densities of head groups and water are comparable.
- (ii) The highly structured *high headgroup density* region (region 2), from the point where region 1 ends to the point closer to the bilayer center where the density of water decreases to below 1% and bulklike water disappears. Strong Coulombic interactions between polar groups keep polar molecules in the first two regions.<sup>15</sup>
- (iii) The *high density of acyl chains* region (region 3) is hydrophobic. Double bonds of unsaturated lipids are typically localized in this region.
- (iv) The fourth, *low density of acyl chains* region (region 4), resides in the middle of the bilayer and terminal methyl groups are primarily located in this region. Here, movement of all molecules is faster due to its low density. The two hydrophobic acyl chain regions are

Received: December 22, 2011

Published: February 24, 2012



**Figure 1.** Upper left panel (a): density profile of DOPC bilayer along the normal to the lipid bilayer plane showing densities of the complete system (black), water (blue), DOPC (red), phosphates (magenta), cholines (cyan), carbonyls (green), and terminal carbons (dark blue). Lower left panel (b): free energy profile of coumarin along the DOPC bilayer normal calculated from constraint simulation with initial structures obtained by free simulation (CF). The calculated bilayer center penetration barrier,  $\Delta G^{pen}$ , and water/lipids barrier,  $\Delta G^{wat}$ , are labeled. The free energy profile was calculated for one bilayer leaflet and was symmetrized to the other one, the densities of the system were symmetrized along the middle of the bilayer. The vertical bins labeled by numbers denote four bilayer regions: 1 – low density of head groups (2.2–2.9 nm), 2 – high density of head groups (1.45–2.2 nm), 3 – high density of acyl chains (0.5–1.45 nm), and 4 – low density of acyl chains (0–0.5 nm). Right panel (c): structure of DOPC bilayer, together with snapshots of coumarin initial structures. Carbons are colored in cyan, oxygens red, and hydrogens white. The olive and blue balls represent DOPC phosphate and nitrogen atoms.

believed to form the main barrier for most druglike molecules, which are often water-soluble.<sup>4,16</sup>

Molecular dynamics (MD) simulations can be used to estimate the equilibrium position of a drug in a lipid bilayer, its partition coefficients and diffusion coefficients simultaneously at subpicosecond and atomic resolution.<sup>4,15,17,18</sup> The partitioning and mean position can be well described by a free energy ( $\Delta G$ ) profile along the normal to the lipid bilayer,<sup>5,13,18,19</sup> also known as a potential of mean force (PMF). In principle, such free energy profiles can be calculated from partitioning values obtained by long unbiased simulation. However, this approach only provides reliable free energy profiles when all states along the  $\Delta G$  profile are thoroughly sampled. This is challenging for unbiased MD simulations, because they usually do not sample adequately at the available simulation time scales. The sampling problem is based on the dependence of probability of drug crossing a membrane on the energy barrier for this phenomenon. The probability of membrane crossing decreases exponentially with the energy barrier (Eq. S1 in the Supporting Information). If a barrier for a drug crossing a membrane is higher than  $\sim 10$  kcal/mol, the statistical probability of spontaneous membrane crossing is very low within typical time scales (hundreds of nanoseconds) accessible by unbiased atomistic MD simulations. Therefore during unbiased MD simulations, the polar molecules do not usually enter freely the

deeper parts of bilayer and the nonpolar molecules do not sample enough of the area of bulk water.

Free energy profiles can also be calculated by biased MD simulations. Great advances have been made in this field in recent years, and numerous methods for obtaining free energy profiles have been developed, including umbrella sampling,<sup>18,19</sup> z-constraint method,<sup>12,14,15,17,18,22,23</sup> metadynamics,<sup>24,25</sup> adaptive biasing force,<sup>26,27</sup> particle insertion,<sup>22</sup> and others.<sup>28,29</sup> However, although these techniques undoubtedly enhance sampling, all of them have drawbacks for estimating free energy profiles along bilayer normals. For example, in an analysis of interactions between charged and neutral forms of ibuprofen and aspirin with a dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayer, Boggara and Krishnamoorti<sup>18</sup> noted that the drugs (especially charged forms) caused deformations of the lipid bilayer in z-constraint simulations. Similarly, MacCallum et al.<sup>30</sup> observed “water defects” at the water–lipid interface in umbrella simulations applied for calculating free energy profiles of amino acids along the normal of a dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) bilayer. Such deformation of lipid bilayer in simulations was recently analyzed by Neale et al., who identified it as a systematic sampling error of considerable interest. Neale and co-workers stressed that this systematic sampling error complicated the convergence of free energy profiles of druglike molecules along lipid bilayer normals, especially for charged molecules.

As this systematic error may also originate during the generation of starting structure sets used for biased MD simulations, this issue has been addressed in several previous studies using various strategies. Neale et al.<sup>13</sup> used an inflatogro procedure,<sup>31</sup> in which (briefly) a pre-equilibrated bilayer is expanded, a molecule of interest is inserted, and the bilayer is compressed and re-equilibrated. Boggara and Krishnamoorti<sup>18</sup> inserted molecules into a lipid bilayer manually using the VMD visualization program.<sup>32</sup> Other approaches for generating starting structures have included growing the molecule inside the bilayer from zero size,<sup>14</sup> pulling simulation,<sup>5</sup> snapshots from unbiased simulation,<sup>33</sup> and estimation of reaction coordinates using metadynamics.<sup>24</sup> However, no methodological analyses of this problem have been previously published.

Here, based on an examination of the embedding of a nonpolar druglike molecule (coumarin; 1,2-benzopyrone) in DOPC bilayer, we show that systematic sampling error is difficult to avoid, but it can be reduced by using appropriate biased simulation and initial structure set generation method. Coumarin naturally occurs in diverse plants, including tonka beans (*Dipteryx odorata*), vanilla grass (*Anthoxanthum odoratum*), sweet woodruff (*Galium odoratum*), sweet clover (*Melilotus* L.), sweet grass (*Hierochloe odorata*), and cassia cinnamon (*Cinnamomum aromaticum*). It is absorbed by humans both orally from food and through the skin from perfumes. Further, it is a valuable test substance because it is a small, planar, rather rigid, nonpolar ( $\log P_{\text{oct/wat}} 1.39^{34}$ ), biologically significant druglike molecule, as its skeleton can be recognized in many drugs (e.g., the anticoagulant warfarin and antispasmodic/insecticide hycromone<sup>35</sup>) and other biologically active compounds (e.g., scopolin). Therefore, coumarin is an ideal model for assessing the quality of various methods for calculating  $\Delta G$  profiles of small low-polar druglike molecules along normals of lipid bilayers. DOPC bilayer has been previously used as a model of endoplasmic reticulum membrane, in which coumarin is metabolized by membrane-anchored Cytochrome P450 2A6.<sup>36,37</sup>

The main aim of the study was to identify the mean position of coumarin in DOPC bilayer from calculations of free energy profiles using different biased MD simulations and different sets of initial structures. We also discuss convergence, advantages and disadvantages of  $z$ -constraint, and umbrella sampling methods using starting structures obtained by pulling and unbiased simulations. We focus on the systematic bias caused by choice of the initial structure set and the possibilities of avoiding this bias. The effect of choice of partial charges is also analyzed and results of biased and unbiased MD simulations (3  $\mu\text{s}$  in total) are compared. Finally, a robust simulation protocol for obtaining a convergent free energy profile along a bilayer normal is suggested and tested against available experimental data for two coumarin derivatives embedded in dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) bilayer.

## METHODS

The structure and topology of coumarin (1,2-benzopyrone; CAS number 91-64-5) was generated by the PRODRG2 Beta server<sup>38</sup> using the GROMOS 53a6 forcefield.<sup>39</sup> However, partial charges assigned by PRODRG have been found to lead to unrealistic partitioning between water and cyclohexane phases.<sup>40</sup> As the partial charges used can introduce another systematic error into free energy calculations, we addressed this problem by also using Mulliken partial charges and restrained fit of electrostatic potential (RESP) partial charges. The RESP

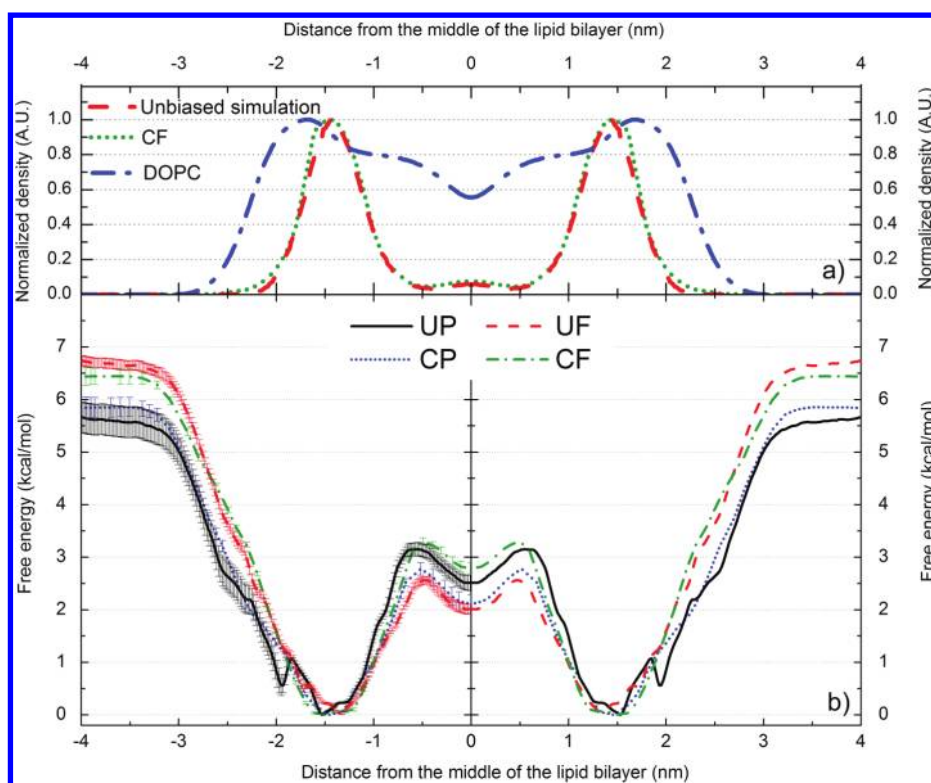
partial charges were successfully adopted by the second generation of AMBER family force fields. The electrostatic potential (ESP) and ESP partial charges were calculated by applying B3LYP/cc-pVDZ method to coumarin geometry optimized at the same level of theory in Gaussian 03.<sup>41</sup> RESP fit<sup>42</sup> was implemented by Antechamber from the AMBER 11 software package.<sup>43</sup> Mulliken partial charges, that were adopted by Berger lipid force field,<sup>44</sup> were calculated at the HF/6-31G\* level in gas phase. Hereafter, all mentioned coumarin charges are RESP charges, except those explicitly named as PRODRG or Mulliken charges.

The lipid bilayer, as prepared and equilibrated by Siu et al.,<sup>45</sup> contained 128 DOPC molecules, 64 in each leaflet, with a structure generated by the Lipidbook server.<sup>46</sup> The bilayer was oriented perpendicularly to the  $z$ -axis of the simulation box and equilibrated for another 10 ns by a free MD simulation. Water and salt (NaCl) were added to give a physiological concentration, of 0.154 M, of salt in the aqueous phase (excluding the lipid bilayer from the volume calculation). The equilibrated box contained 5,188 molecules of Flexible Simple Point Charge (SPC) water,<sup>47</sup> 19  $\text{Na}^+$  and 19  $\text{Cl}^-$  ions. The equilibrated surface area per lipid was 0.638  $\text{nm}^2$ , and the start of the  $z$ -axis was set in the middle of the bilayer.

The GROMACS 4.0.7 package<sup>48</sup> and united atom Berger lipid force field<sup>44</sup> were used for MD simulations. The latter reduces the number of atoms in simulations, as it merges nonaromatic and nonpolar hydrogens with their carbons. This simplification likely results in higher diffusion coefficients than those observed in all-atom model simulations.<sup>49</sup> Berger lipid force field<sup>44</sup> uses the Mulliken partial charges calculated at the HF/6-31G\* level (in gas phase).<sup>50</sup> Simulations were taken with 2-fs integration time steps under periodic boundary conditions in all directions, with particle-mesh Ewald (PME) electrostatics,<sup>51</sup> a van der Waals cutoff at 1 nm, bond constraints determined by the LINCS algorithm,<sup>52</sup> V-rescale temperature coupling<sup>53</sup> to 310 K, and Berendsen anisotropic pressure coupling<sup>54</sup> to 1 bar with 10 ps time constant and compressibility of  $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ .

A coumarin molecule was placed at the top of the simulation box, a 0.5 ns MD simulation was executed to pre-equilibrate the system, then five independent MD simulations with a total time of 3  $\mu\text{s}$  were generated. From the pre-equilibrated simulation two sets of starting frames for biased MD simulations were generated: one by pulling coumarin to the bilayer center and the other from unbiased MD simulation. The first set of starting frames for biased MD simulations was obtained by pulling the center-of-mass (COM) of coumarin against that of the lipid bilayer (in its center). Coumarin was pulled along the bilayer normal (the  $z$ -axis) for 6 ns using a pulling force constant of  $10,000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$  ( $2,390 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ ) and pulling rate of  $1 \text{ nm}\cdot\text{ns}^{-1}$ . Pulling applies a harmonic potential on molecule and moves the center of this potential with a given pull rate. Starting positions were collected as snapshots from the pulling simulation, spaced  $0.1 \pm 0.02 \text{ nm}$  apart along the  $z$ -axis from the area of bulk water (4 nm from the bilayer center) to the middle of the bilayer. From the structures at one distance bin, the structure with the lowest potential energy was chosen as the starting frame for biased MD simulations at a given distance from the center of the lipid bilayer. Hereafter, constraint and umbrella simulations with initial structures generated by pulling simulations are referred to as constraint-pulling (CP) and umbrella-pulling (UP), respectively.





**Figure 2.** Density profiles of DOPC (blue dash-dotted curves) and coumarin calculated from unbiased MD simulations (3  $\mu$ s in total; red dashed curves) and from the free energy profile acquired by the CF method (green dotted curve). The density profiles of coumarin obtained from both methods match each other well (upper panel – a). Free energy profiles obtained from biased simulations (lower panel – b). Both umbrella (UP – black curve and UF – red curve) and constraint (CP – dotted blue curve and CF – dotted green curve) simulations provide free energy minima positions for coumarin that overlap well with the maximum density calculated from the free simulation (cf. upper panel – a). The free energy profiles were calculated for one bilayer leaflet and were symmetrized to the other one; the density was symmetrized along the middle of the bilayer. UP and UF refer to umbrella simulations with initial structures obtained by pulling and free unbiased simulation, respectively; CP and CF refer to constraint simulation with pulling and free initial structures, respectively.

In the other approach for generating starting frames, in which free unbiased simulation (20 ns long) was applied, spontaneous coumarin penetration through the DOPC bilayer was observed. Starting frames (spaced  $0.1 \pm 0.02$  nm apart along the  $z$ -axis with the lowest potential energy of the structure at the respective points) for umbrella and constraint simulations were chosen as described above. Simulations with these starting structures are henceforth referred to as umbrella-free (UF) and constraint-free (CF), respectively.

With both sets of starting frames, umbrella sampling and constraint simulations (164 simulation windows in total) were carried out as described below for 30 ns per simulation window, except for simulation bins in the 1.0–2.5 nm  $z$ -axis region (for which simulation was prolonged for 50 ns, or up to 100 ns for CP and CF simulations, giving in the latter cases up to 6.9  $\mu$ s of biased simulation in total).

In umbrella sampling a harmonic potential is applied between COMs of two groups of molecules, here the drug coumarin and DOPC lipid bilayer. The distance between COMs of coumarin and DOPC was restrained by a harmonic force constant of  $2,000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$  ( $477.9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ ). The force applied on coumarin was proportional to the square of the displacement from its original position, and a free energy profile was calculated from eq 1<sup>4,55</sup>

$$\Delta G(z) = -RT \ln P(z) + U(z) \quad (1)$$

where  $P(z)$  and  $U(z)$  are the coumarin distribution and biasing potential along the bilayer normal, respectively. The force

constant and distance between simulation windows were chosen to achieve equal sampling, as the presence of regions with low sampling density increases the error of umbrella sampling. Forces acting on coumarin were analyzed, and the free energy profile was reconstructed by the weighted histogram analysis method (WHAM)<sup>20</sup> using the *g\_wham* program.<sup>56</sup>

We also calculated a free energy profile from constraint simulations.<sup>14,15,18</sup> In this approach, the distance between COMs of the drug and lipid bilayer was constrained, and the constraint force was monitored. Free energy was then calculated from eq 2<sup>4,16,17,57</sup>

$$\Delta G(z) = - \int_{\text{outside}}^z \langle \vec{F}(z') \rangle_t dz' \quad (2)$$

where the mean force applied on the molecule  $\langle \vec{F}(z') \rangle_t$  in certain bilayer depth  $z'$  is integrated along the bilayer normal axis beginning in water until the certain bilayer depth  $z$ .

Part of the free energy profile was also calculated from the partitioning displayed in an unbiased simulation using eq 3<sup>15</sup>

$$\Delta G(z) = -RT \ln K(z) \quad (3)$$

where  $K(z)$  is a partition coefficient estimated for a 0.02 nm bin in bilayer depth  $z$ , symmetrized for both leaflets. The partition coefficient is calculated from average mass density of coumarin in certain bin and by normalizing this density – the reference state is set to have  $K(z) = 1$ .

The minimum free energy ( $\Delta G = 0$  kcal/mol) of coumarin along the bilayer normal was considered the reference state in all profiles. All free energy profiles were calculated for one lipid leaflet and have been symmetrized for the other one. Error estimates of free energy were calculated as integrated standard deviations of the mean calculated either over the bins of 100 bootstraps generated by Bayesian bootstrap analysis by the *g\_wham* program<sup>56</sup> in umbrella sampling or over the force distribution in 0.1 nm-spaced positions along the *z*-axis in constraint simulations.

For comparison with experimental data (see later) free energy profiles of 7-acetoxy-4-methylcoumarin and 7-acetoxycoumarin along the normal of a DMPC bilayer were calculated (using a DMPC bilayer structure with 128 DMPC molecules and 3,655 water molecules taken from Tieleman's Web site,<sup>58</sup> after replacing 20 molecules of water by 10 Na<sup>+</sup> and 10 Cl<sup>-</sup> ions). The lipid bilayer was equilibrated for 200 ns. 7-Acetoxy-4-methylcoumarin topology was prepared by the simulation protocol described above for coumarin (including the use of RESP partial charges). Initial structure was generated from a 20 ns unbiased free simulation. During this simulation, 7-acetoxy-4-methylcoumarin penetrated to 1.8 nm from the middle of the bilayer and was then pulled into the bilayer for 4 ns with a pulling rate of 1 nm·ns<sup>-1</sup> and a pulling force constant of 500 kJ·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup> (119.5 kcal·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup>). The mild force constant was chosen to avoid water artifacts, as the molecule did not penetrate into region 3 freely during the unbiased simulation and was still in touch with water molecules. A 10 ns constraint simulation was performed with the same simulation protocol as applied in the coumarin CF simulation, but the simulation near the equilibrium position (0.8–1.7 nm) was prolonged to 15 ns per simulation bin.

A free energy profile of 7-acetoxycoumarin was obtained by the same protocol as for 7-acetoxy-4-methylcoumarin, except the free simulation lasted 60 ns and during this time 7-acetoxycoumarin penetrated to 0.5 nm from the center of the lipid bilayer, then the molecule was pulled further into the bilayer for 1 ns with a pulling rate of 1 nm·ns<sup>-1</sup> and force constant of 2,000 kJ·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup> (477.9 kcal·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup>). The molecule freely penetrated close to the bilayer center and thus was pulled with a higher force constant than in the previous case. A free energy profile was obtained by *z*-constraint simulation, which yielded a very large minimum energy zone, with substantial variation in mean forces, so the simulation was prolonged to 15 ns in the interval between 1.0 and 2.0 nm and more frames were added (so the distance between simulation windows was 0.05 nm in the zone between 1.0 and 2.0 nm).

## RESULTS

**Unbiased MD Simulations.** Five independent unbiased simulations starting from coumarin in water, 3  $\mu$ s long in total (2  $\times$  1  $\mu$ s, 600 ns, 2  $\times$  200 ns), showed a tendency for coumarin to stay at the boundary between regions 2 and 3, as coumarin was most frequently located 1.4  $\pm$  0.1 nm from the bilayer center (see Supporting Information, Figure S1). Once a coumarin molecule entered the bilayer during the first 10 ns of the simulation, it did not leave the lipid bilayer during the rest of simulation (Figure S1). Coumarin occurred in both leaflets because it can transverse the bilayer center spontaneously. Twelve successful (and ten unsuccessful) transitions between leaflets were observed during the 3  $\mu$ s of simulations (Figure S1). The transition between both leaflets took place on a 100+ ns time scale, but the transition process itself was rapid

and lasted several nanoseconds. The unbiased simulations also identified a metastable state of coumarin in the bilayer center (Figure 2), where coumarin stayed up to 10 ns. The transition between the bilayer center and one leaflet occurred on time scales of ps up to ns (Figure S1). The bilayer center penetration barrier calculated from the partition coefficient profile (cf. Equation 3) was 2.1 kcal/mol, but the water/lipids barrier could not be calculated, as the distribution of coumarin in water was not properly sampled (Figure S1 and Figure 2).

**Biased Simulations.** The free energy profiles of coumarin in DOPC lipid bilayer reconstructed from four types of biased (UP, CP, UF, and CF) simulations showed similar trends (Figure 2). Typically, the free energy dropped as coumarin entered region 1 (cf. Figure 1). As it moved deeper into the bilayer, the free energy decreased and the global free energy minimum was reached at the border between regions 2 and 3. When coumarin moved deeper into the bilayer center, the free energy rose. A small local minimum was located in the bilayer center (region 4). So, one global minimum at 1.35–1.53 nm (with a thermally accessible region within 1.05–1.95 nm at 310 K – by thermally accessible region we mean an area with energy barrier of RT (0.616 kcal/mol at 310 K) from the energy minimum) and one local minimum in the middle of the lipid bilayer were common features of all free energy profiles (Figure 2).

The bilayer center penetration barriers ( $\Delta G^{\text{pen}}$ ) obtained from the free energy profiles fitted a narrow interval, varying between 2.6–3.3 kcal/mol (Table 1, Figure 2). The water/

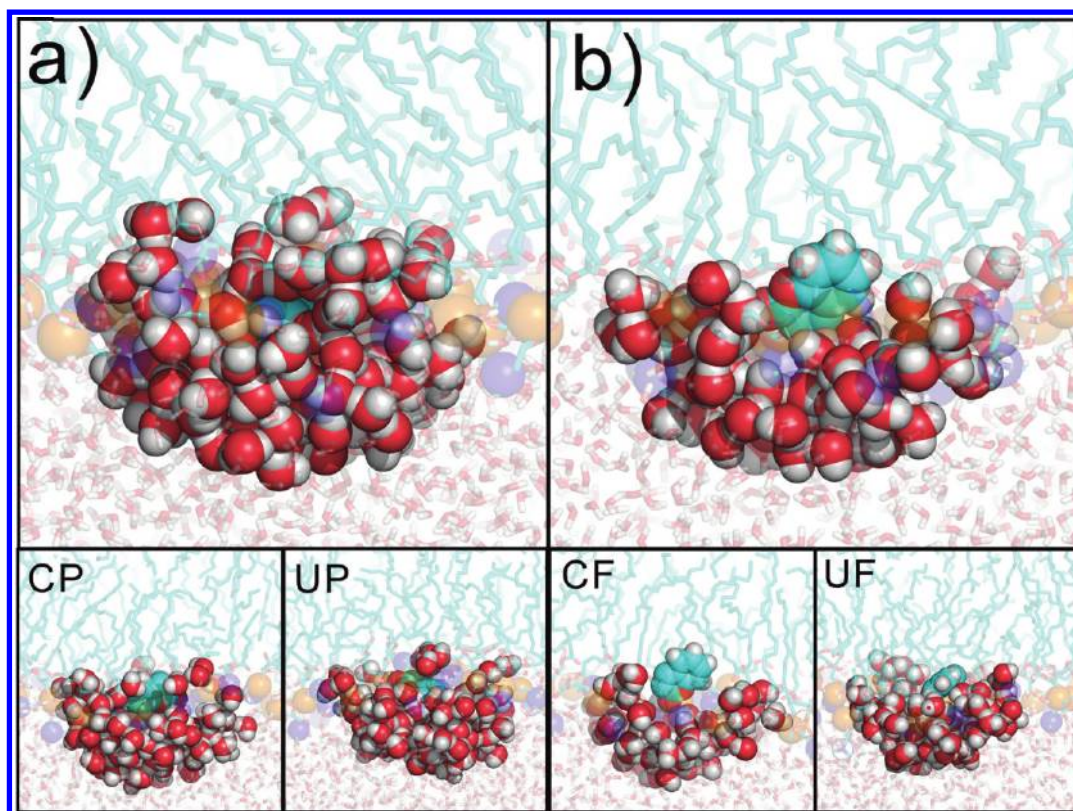
**Table 1. Properties Extracted from the Free Energy Profiles Calculated by Four Different Simulation Protocols with 50 ns of Biased Simulation Per Window<sup>a</sup>**

simulation protocol	position of minimum (nm)	area within a reach of a thermal motion at 310 K (nm)		$\Delta G^{\text{wat}}$ (kcal/mol)	$\Delta G^{\text{pen}}$ (kcal/mol)
UP	1.53	1.15	1.95	5.7 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.2
UF	1.35	1.09	1.75	6.7 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1
CP	1.47	1.20	1.71	5.9 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.1
CF	1.49	1.10	1.80	6.4 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup>UP and UF refer to umbrella simulations with initial structures obtained by pulling and free unbiased simulation, respectively; CP and CF refer to constraint simulation with pulling and free initial structures, respectively.  $\Delta G^{\text{wat}}$  and  $\Delta G^{\text{pen}}$  are water/lipid and bilayer center penetration barriers, respectively. Area within reach of a thermal motion is considered to be the area surrounded by an energy barrier of RT (0.616 kcal/mol, *T* = 310 K).

lipids barrier ( $\Delta G^{\text{wat}}$ ) fitted an interval of 5.7–6.7 kcal/mol, and the values calculated with pulling initial structures were lower than those calculated in simulations with initial structures from unbiased simulations ( $\Delta G^{\text{wat}}$  values derived from UP, CP, UF, and CF simulations were 5.7  $\pm$  0.3, 5.9  $\pm$  0.2, 6.7  $\pm$  0.1, and 6.4  $\pm$  0.2 kcal/mol, respectively; Table 1 and Figure 2). The UP free energy profile also showed a very shallow local minimum at 1.95 nm with an energy barrier of 0.5 kcal/mol (Figure 2). The free energy barrier of this minimum was higher than the free energy error bar estimated by statistical bootstrap analysis (0.1 kcal/mol), but the error seemed to be underestimated. As the depth of the shallow minimum declined with increasing duration of simulation windows (see the following paragraph “Convergence of Biased Simulations”) and no state





**Figure 3.** Initial structures (at 1.9 nm from the bilayer center) obtained by pulling (a) and free simulation (b) show a difference in coumarin hydration. The structure generated by pulling simulations indicates that coumarin is pulled to the lipid bilayer with its solvation shell, which causes funnel-like bilayer deformation. Snapshots taken at 10 ns indicate that CP eliminates coumarin hydration more rapidly than UP. Both CF and UF simulations lead to similarly solvated coumarin structures. Carbons are colored in cyan, oxygens red, and hydrogens white. The olive and blue balls represent DOPC phosphate and nitrogen atoms, respectively. Waters surrounding coumarin are colored as red/white balls. UP and UF refer to umbrella simulations with initial structures obtained by pulling and free unbiased simulation, respectively; CP and CF refer to constraint simulation with pulling and free initial structures, respectively.

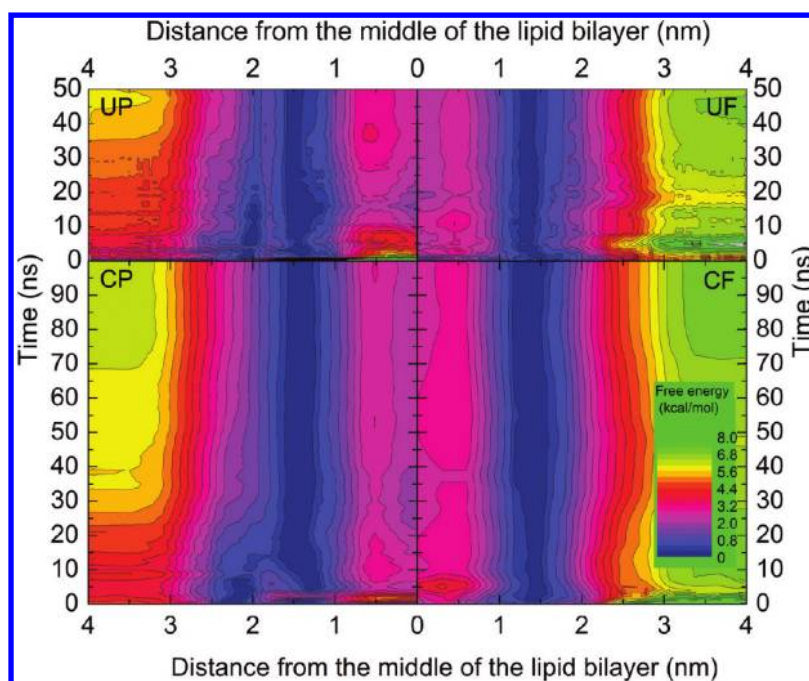
corresponding to this minimum was observed in the unbiased simulation (Figure S1 in the Supporting Information), we considered this minimum to be an artifact and called it “the artificial minimum”.

As such “artificial minima” may be due to systematic sampling errors, it was of considerable interest to determine the reasons for such behavior. The primary reason lay in the starting structures, which were generated by pulling coumarin along the bilayer normal in the UP and CP simulations. The pulling caused deformation of the lipid bilayer,<sup>13,18</sup> leading to a funnel-shaped bilayer surface depression (see Supporting Information, Figure S2) induced by solvated coumarin (Figure 3a). In other words, the pulling procedure produced structures in which coumarin embedded in the bilayer was hydrated by a few water molecules. The defects, namely these which were deeper in lipid bilayer, were eliminated during biased MD simulations, as water was expelled from the hydrophobic bilayer interior and bilayer relaxed rapidly on hundreds of picoseconds time scale. The relaxation time grew with increasing distance from the bilayer center. In the area of the artificial minimum ( $\sim 1.7\text{--}2.0$  nm), close to the bilayer surface, the water defects were eliminated on a tens of nanoseconds time scale. It is of considerable interest that relaxation occurred significantly more rapidly in the CP than in UP simulations, and thus the membrane deformation was eliminated more rapidly (Figure 3 and Figure 4). The lipid bilayer depression was not observed during a spontaneous embedment of coumarin in the lipid

bilayer in the unbiased simulations, hence the starting structures for biased simulations based on the snapshots from the unbiased simulation were free of this artifact (Figure 3b).

**Convergence of Biased Simulations.** The position of the global minimum converged more rapidly in biased simulations starting from free (unbiased) simulations (UF and CF) than in simulations starting from pulling (UP and CP) simulations (Figure 4). The free energy profile obtained from UP simulation depended strongly on the length of the simulation windows, and two energetically similar minima in region 2 (one at  $\sim 1.5$  and the other at  $\sim 2.0$  nm) were observed during the beginning of this simulation (Figure 4). After 10 ns the minimum at  $\sim 1.5$  nm became the global minimum and its position converged to 1.53 nm, while the energy barrier of the artificial minimum decreased to 0.5 kcal/mol. During the first 16 ns of UP simulation the area accessible by thermal motion ( $\Delta G_{\text{min}} + RT$ ) gradually widened from 0.90 nm after 5 ns to 1.10 nm, and the region accessible by thermal motion thereafter declined to 0.80 nm.  $\Delta G^{\text{wat}}$  gradually rose throughout the simulation, to a final value (at 50 ns) of  $5.7 \pm 0.3$  kcal/mol, while  $\Delta G^{\text{pen}}$  dropped within the first 16 ns of simulation, slowly rose until 30 ns, and then fluctuated around a final value of  $3.2 \pm 0.2$  kcal/mol (cf. Figure 4).

The free energy profile obtained from CP simulation also displayed two minima initially, while the artificial minimum (at  $\sim 2.0$  nm) quickly vanished, and after  $\sim 15$  ns there was no sign of this minimum. The area within reach of thermal motion



**Figure 4.** Convergence of free energy profiles, positions of energy minima and energy barriers. The simulation windows within 1.0–2.5 nm have been simulated for 50 and 100 ns in case of UP and UF simulations of CP and CF simulations, respectively; the rest of each profile is calculated from 30 ns of simulation. Free energy profiles calculated from short simulation times (<5 ns) are biased by high error, because of small data set and nonequilibrium starting structures. Free energy profiles obtained by UP and CP simulations (left) show slow elimination of an artificial minimum (~2.0 nm) and deepening of the global minimum (~1.5 nm). Free energy profiles obtained from UF and CF simulation are consistent in coumarin positioning and have deeper energy minima than those obtained from UP and CP simulations. The global minimum energy is considered as reference. UP and UF refer to umbrella simulations with initial structures obtained by pulling and free unbiased simulation, respectively; CP and CF refer to constraint simulation with pulling and free initial structures, respectively.

gradually narrowed from 1.38 nm after 5 ns of simulation to 0.51 nm after 40 ns and thereafter remained constant.  $\Delta G^{\text{wat}}$  gradually rose throughout the simulation, to  $5.9 \pm 0.2$  kcal/mol, while  $\Delta G^{\text{pen}}$  grew during the first 11 ns of simulation, until 20 ns of simulation it gradually declined to  $2.8 \pm 0.1$  kcal/mol and then fluctuated around this value. In the last 50 ns of the simulation prolonged to 100 ns the position of the energy minimum remained constant;  $\Delta G^{\text{pen}}$  fluctuated around  $2.8 \pm 0.1$  kcal/mol and  $\Delta G^{\text{wat}}$  continued to rise, to  $6.2 \pm 0.2$  kcal/mol.

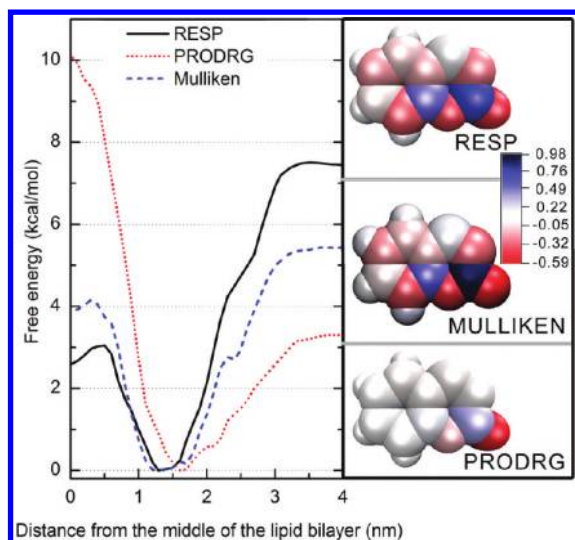
The position of the minimum in the UF free energy profile was almost constant (within 1.29–1.35 nm) during the whole simulation time, with the area accessible by thermal motion slowly widening from 0.44 to 0.66 nm.  $\Delta G^{\text{wat}}$  slowly decreased during the first 19 ns of simulation, then very slowly increased, and after 30 ns  $\Delta G^{\text{wat}}$  converged to  $6.7 \pm 0.1$  kcal/mol, while  $\Delta G^{\text{pen}}$  became convergent after 20 ns, fluctuating within  $2.6 \pm 0.1$  kcal/mol.

The CF free energy profile showed a minimum position within 1.29–1.49 nm, and the area of thermal motion slowly widened from 0.41 to 0.70 nm.  $\Delta G^{\text{wat}}$  fluctuated around 6.4–7.0 kcal/mol during the whole simulation time, while  $\Delta G^{\text{pen}}$  decreased during the first 10 ns of simulation and then fluctuated around 2.9–3.3 kcal/mol. The prolonged simulation to 100 ns showed similar trends – a free energy minimum at 1.29 nm, thermal motion within 0.6 nm, a constant  $\Delta G^{\text{wat}}$  value of 7.0 kcal/mol after 80 ns, and  $\Delta G^{\text{pen}}$  already convergent with a final value of  $3.1 \pm 0.1$  kcal/mol.

**Effect of Coumarin Partial Charges.** As assignment of partial charges might introduce another systematic sampling error into free energy calculations, we carried out 10 ns long CF

simulations with PRODRG and Mulliken charges (assigned partial charges are listed in Supporting Information Table S1), to assess the extent to which the partial charges affected the free energy profiles. Coumarin with partial charges assigned by PRODRG bore a dipole moment of 9.5 D, assignment of Mulliken partial charges led to 6.0 D, and RESP partial charges resulted in a dipole moment of 4.9 D (Figure 5). The dipole moment based on RESP charges was close to that of coumarin in the gas phase calculated by the hybrid DFT method (B3LYP/cc-pvDZ) of 4.6 D, Mulliken partial charges represent a compromise between the dipole moment in water (represented by continuum dielectrics with  $\epsilon_r = 78.39$ ) and heptane ( $\epsilon_r = 1.92$ ), which we calculated by the CPCM/B3LYP/cc-pVDZ method and that resulted in 6.7 and 5.4 D, respectively. Considering these values, the dipole moment stemming from PRODRG charges seemed to be unreliably overestimated, which could systematically bias free energy profiles based on PRODRG charges. The global minimum of the  $\Delta G$  profile of coumarin bearing RESP partial charges was located at 1.29 nm (CF with a 10 ns sampling window), energy minimum of coumarin bearing Mulliken partial charges was localized at 1.20 nm, and the minimum for PRODRG-charged coumarin was shifted toward the bilayer/water interface, at 1.62 nm. The global free energy minimum for RESP-charged coumarin was also considerably deeper than for Mulliken-charged or PRODRG-charged coumarin ( $\Delta G^{\text{wat}}$ : 7.5, 5.6, and 3.3 kcal/mol, respectively), and the bilayer center penetration barriers of the systems also differed ( $\Delta G^{\text{pen}}$ : 3.1, 4.6, and 10.1 kcal/mol, respectively) (Figure 5). As expected, the energy cost of bilayer center penetration grows with the increasing

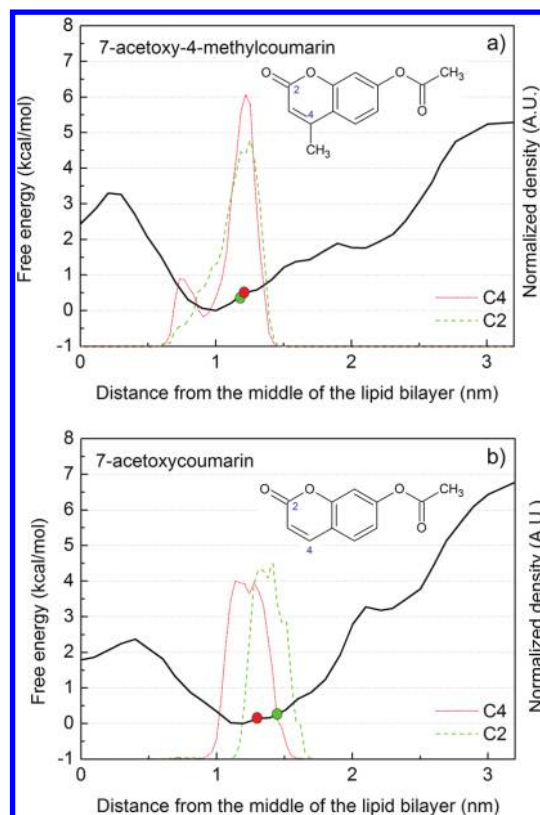




**Figure 5.** Left panel: free energy profiles calculated for coumarin with PRODRG (red dotted curve), Mulliken (blue dashed curve), and RESP charges (black curve) by constraint simulation (CF) with initial structures obtained by free simulation using 10 ns windows. Coumarin with PRODRG partial charges is shifted to the outer part of the lipid bilayer. The bilayer center penetration barriers grow and the water/lipids barriers decrease with increasing dipole moment. The right panel shows that the partial charges (mapped on the vdW surface) calculated by RESP (upper part) and Mulliken population analysis (middle) are spread along the whole molecule, while partial charges assigned by PRODRG (lower part) are localized close to coumarin oxygens.

dipole moment, and reversely the energy barrier between lipid bilayer and water decreases with the growing dipole moment.

**Comparison with Experimental Data.** To our knowledge, the precise positioning of bare coumarin in a DOPC bilayer has not yet been studied experimentally; therefore, we compared the results of our theoretical calculations to data obtained in experiments with coumarin derivatives. Depths of several coumarin derivatives in dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) bilayer have been studied in NMR investigations,<sup>2,46,47</sup> in which chemical shifts of <sup>13</sup>C-labeled derivatives were used to assess the polarity of the surroundings of <sup>13</sup>C atoms and hence estimate their depth in the lipid bilayer. Results of the cited experiments indicate that the mean position of 7-acetoxy-4-methylcoumarin is at the border of regions 2 and 3 in DMPC lipid bilayer (0.7 nm from the DMPC choline nitrogens, corresponding to 1.2 nm from the center of the bilayer); <sup>13</sup>C-labeled carbons of the derivative (C2 and C4, see Figure 6) appeared to be located 0.72 and 0.70 nm from the choline nitrogens, corresponding to 1.18 and 1.20 nm from the bilayer center, respectively. Another coumarin derivative, 7-acetoxycoumarin, was apparently located closer to the bilayer interface in region 2, with its <sup>13</sup>C-labeled (C2 and C4) carbons 0.44 and 0.59 nm from the choline nitrogen, corresponding to 1.46 and 1.31 nm from the bilayer center, respectively. We recalculated the experimental positions (originally expressed as distances from the bilayer surface) as distances from the bilayer center to facilitate direct comparison with results of this study. In this recalculation, the distance between the DMPC bilayer surface and center was set at 1.9 nm: the mean distance between the bilayer center and maximum density of nitrogens (regarded as the membrane surface in the cited NMR experiments) in corresponding MD simulations.



**Figure 6.** Free energy profiles and structures of coumarin derivatives (7-acetoxy-4-methylcoumarin, upper panel (a), and 7-acetoxycoumarin, lower panel (b)) along a DMPC lipid bilayer normal calculated from constraint simulation with initial structures obtained by free simulation (CF). NMR-observed positions of <sup>13</sup>C-labeled carbons (C2 and C4) are displayed as red and green circles, respectively, and the positions of C2 and C4 carbons calculated from simulation are depicted as green and red curves, respectively. The positions of marked carbons of both coumarin derivatives are in good agreement with the positions observed by NMR.

For the comparison we employed the most effective simulation protocol of those considered here to calculate the free energy profiles of the coumarin derivatives described above, briefly comprising unbiased simulation followed by constraint simulation with 10 ns simulation bins (see Methods for details). The profile obtained for 7-acetoxy-4-methylcoumarin indicated the free energy minimum position of its COM to be 1.0 nm from the center of the DMPC bilayer (Figure 6), with a thermally accessible region between 0.8 and 1.3 nm. The thermally accessible region estimated from the simulation (0.8–1.3 nm) matched that acquired from NMR experiments, where 7-acetoxy-4-methylcoumarin was located  $1.2 \pm 0.1$  nm from the bilayer center. In addition, the positions of its C2 and C4 carbons calculated from simulations (1.25 and 1.21 nm, respectively) agreed well with those estimated from experiments (1.18 and 1.20 nm, respectively), although the C4 carbon seems to flip-flop between two positions in the bilayer (the other at 0.76 nm, with ca. 14% population, see Figure 6 up).

The free energy minimum position of the COM of 7-acetoxycoumarin in the simulation was located 1.2 nm from the bilayer center, with a thermally accessible region between 0.75 and 1.35 nm. The simulated distances of the C2 and C4 carbons from the bilayer center at this point (1.34 and 1.19 nm, respectively) again matched those obtained from the NMR data



reasonably well (1.46 and 1.31 nm, respectively, see Figure 6 down).

In summary, the MD results for both coumarin derivatives agreed reasonably well with the experimental results, notably 7-acetoxy-4-methylcoumarin was located deeper in the bilayer than 7-acetoxycoumarin, and the carbon atoms' positions calculated from simulations matched those deduced from experiments.

## DISCUSSION

**Coumarin Preferentially Stays in Bilayer Regions 2 and 3 in Unbiased Simulations.** During the five independent unbiased simulations (3  $\mu$ s long in total) coumarin preferred the lipid bilayer phase rather than the aqueous phase, because it quickly (within <10 ns) entered the lipid bilayer and remained there for the rest of the simulation time (Figure S1 in the Supporting Information). The preferentially occupied position was at  $1.4 \pm 0.1$  nm, at the border of regions 2 and 3, and the molecule was oriented mainly with its oxygens pointing toward the water phase (data not shown). In addition, coumarin penetrated the lipid bilayer spontaneously, i.e., moved from one leaflet to the other, remaining at the preferentially occupied positions in both leaflets for several hundreds of nanoseconds between brief (a few ns) visits to the lipid bilayer center (Figure S1 in the Supporting Information). Similarly, the transition movements were quite rapid, generally occurring within several nanoseconds.

Some key penetration properties were identified from the unbiased simulations, namely positions of local and global free energy minima and qualitative estimates of the height of energy barriers (Figure 2). The water/lipids barrier,  $\Delta G^{\text{wat}}$ , seemed to be higher than the bilayer center penetration barrier,  $\Delta G^{\text{pen}}$ . The number of penetration events allowed us to roughly estimate the absolute value of the bilayer center penetration barrier, at 2.1 kcal/mol (eq 3). However, the estimated  $\Delta G^{\text{pen}}$  value should be interpreted with care, due to the limited sampling as only a small number of transitions between the minima were observed, and  $\Delta G^{\text{wat}}$  could not be calculated as the water phase was not sampled adequately (Figure 2). Nevertheless, the spontaneous embedding of coumarin in DOPC bilayer strongly indicates that this is a barrierless process and that coumarin prefers the bilayer phase, in accordance with expectations based on coumarin's  $\log P_{\text{oct/wat}}$  value.

**Free Energy Profiles Obtained by Biased and Unbiased Simulation Agree.** The final free energy profiles obtained by all simulation protocols (UP, CP, UF, and CF) were in accord (Figure 2), but those obtained from the unbiased simulations provided more accurate information. The global energy minimum was found at  $1.44 \pm 0.09$  nm, while a local energy minimum was localized in the membrane center. The presence of a local energy minimum in the lipid bilayer center agrees with previous findings presented by Bemporad et al.,<sup>23</sup> of such local minima for some other small solutes, e.g. water and acetamide. In our case, the bilayer center penetration barrier ( $\Delta G^{\text{pen}}$ ) of coumarin spanned 2.6–3.3 kcal/mol (Table 1, Figure 2), close to the  $\Delta G^{\text{pen}}$  estimated roughly from the unbiased simulation (2.1 kcal/mol). In contrast, the water/lipids barrier ( $\Delta G^{\text{wat}}$ ) varied significantly with time and method used (see below). The estimated  $\Delta G^{\text{wat}}$  from CF simulation (which is taken as reference, as constraint biasing eliminates possible artificial errors quicker) was  $6.4 \pm 0.2$  kcal/mol (Figure 2). The free energy profiles therefore confirmed that

coumarin more readily penetrates the bilayer than escapes to the water phase.

**Partial Charges – The Force Field Issue.** Neither accurate unbiased simulation, nor accurate free energy profile calculation, is possible without a careful choice of force field. The Berger force field (using Mulliken partial charges calculated at HF/6-31G\* level (in gas phase)<sup>50</sup>) used for lipids<sup>39,44</sup> was tested and shown to provide area per lipid and volume per lipid values that correspond well with experimental values.<sup>44</sup>

Further, as coumarin parameters were not available in standard data sets for lipid simulations, they had to be acquired separately. Generally, atom types and corresponding parameters can be adopted for a nonlipid molecule from the standard data sets quite safely, but the set of partial charges had to be carefully considered, as it may introduce a serious systematic sampling error in lipid bilayer-guest molecule simulations. We addressed this issue by using three sets of partial charges (Figure 5, Table S1 in the Supporting Information): one generated by the PRODRG server, one assigned by Mulliken population analysis, and the third generated by applying the RESP procedure in B3LYP/cc-pVDZ calculations of electrostatic potential in gas phase. Generally, increasing the dipole moment of a molecule (by use of PRODRG or Mulliken partial charges) resulted in a lower  $\Delta G^{\text{wat}}$  and higher  $\Delta G^{\text{pen}}$ , in accordance with expectations, given the higher polarity of coumarin bearing PRODRG or Mulliken charges in comparison with RESP partial charges (Figure 5). With only these profiles it would be difficult to decide which partial charges provided more reliable results. However, PRODRG charges led to overestimation of the dipole moment of coumarin and (as mentioned above) partial charges assigned by the PRODRG server lead to unrealistically strong partitioning in water in cyclohexane/water systems as found by Lemkul et al.<sup>40</sup> The latter finding agrees with the trends observed in our lipid bilayer simulations. In summary, RESP charges seem to provide more accurate models for simulations of lipid bilayer-guest molecule systems than PRODRG charges (although whether the RESP charges should ideally be based on gas phase or solvent-polarized ESP, and if they can be robustly combined with the Berger force field for lipids, remains to be determined).

**Convergence of Free Energy Profiles – The Artificial Minimum Issue.** We have shown here that the convergence of free energy profiles was significantly influenced by the generation of initial structures when followed by the biasing method. The biased simulations starting from the pulling simulations (UP and CP) suffered from bilayer deformation induced by pulling coumarin from the water phase toward the bilayer center (Figure 3). Similar bilayer deformations have been repeatedly previously observed<sup>13,18,30</sup> and identified as a systematic sampling artifact in biased lipid bilayer simulations. For example, Neale et al.<sup>13</sup> observed bilayer deformations when a charged molecule was embedded in the bilayer. We observed a funnel-shape bilayer surface depression (Figure S2 in the Supporting Information), caused by water hydrating the polar parts of coumarin penetrating the lipid bilayer more deeply and thereby exacerbating bilayer deformation during the pulling simulations. The bilayer deformation caused an artificial minimum ( $\sim 2.0$  nm) in the free energy profiles in region 2 (Figure 2), whereas in unbiased simulation coumarin never stayed longer in this position, and its behavior showed no sign of reaching a local energy minimum.

This artificial minimum was most profound when short simulation times (<5 ns) for each sampling bin were applied, and it slowly disappeared when the simulation time was prolonged (Figure 4). The main reason for the slow convergence and need for longer simulation times was the slow coumarin water shell elimination in region 2. Furthermore, the presence of the artificial minimum led to underestimation of  $\Delta G^{\text{wat}}$  in simulations using the initial structure set generated by pulling simulation (CP and UP). While  $\Delta G^{\text{wat}}$  values obtained by CF and UF simulations seemed to reach convergence, they did not reach convergence in UP and CP simulations during 50 ns of simulation (or even during 100 ns of CP simulation), although both UP and CP yielded  $\Delta G^{\text{wat}}$  values close to those obtained from CF and UF simulations.

In this respect, constraint biasing was more effective, as the artificial minimum was eliminated within 15 ns per bin (in CP), while there were signs of the artificial minimum in UP simulation even after 50 ns per bin (Figure 4). Even longer times may be needed in simulations of polar or charged residues, as previously shown by MacCallum et al.<sup>30</sup> and Neale et al.,<sup>13</sup> who found that 80 to 205 ns per bin may be required to achieve convergence in umbrella simulations with charged solutes. In contrast, for nonpolar solutes Neale et al. achieved convergence more rapidly (in some cases after 20 ns per bin). These water artifacts seem to be present when nonequilibrated initial structures are used for biased simulation. The higher efficiency of constraint over umbrella biasing is also consistent with the recent observation by Gunsteren et al.,<sup>61</sup> that constraint-biased simulation using force averaging is the most effective method for calculating potential of mean force with respect to a distance from a given reference point.

Convergence of the free energy profiles was clearly achieved more rapidly when using starting structures acquired from unbiased (UF and CF) simulations in comparison with the pulling simulation (UP and CP), since in cases of UF and CF simulation the free energy profiles changed only marginally with increases in the length of the simulation bins (Figure 4). Therefore we recommend starting the calculation of free energy profile with an unbiased simulation for all molecules, in a case of more polar molecules a slow pulling simulation (pulling force constant <500 kJ·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup> (119.5 kcal·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup>) and a pulling rate <1 nm·ns<sup>-1</sup>) from the deepest position in the lipid bilayer should follow. Thus, this approach was used for comparing the calculated results with experimental data, and the calculated positions of 7-acetoxy-4-methylcoumarin and 7-acetoxycoumarin in DMPC bilayer agreed well with positions derived from NMR experiments (Figure 6). In summary, whenever possible biased simulations should start from geometries acquired from unbiased MD simulations, and constraint biasing is the recommended and quickly converging method.

## CONCLUSION

The convergence in time of free energy profiles of coumarin along a DOPC bilayer normal, calculated by both umbrella sampling and z-constraint techniques, was thoroughly analyzed. Two sets of starting structures were also considered: one based on unbiased MD simulation and the other on “pulling” coumarin along the bilayer normal. Water defects on the lipid bilayer surface were identified in the structures obtained by pulling simulation but not in structures acquired from unbiased simulation. Consequently, the free energy profiles converged more rapidly when starting frames from unbiased simulations

were used. The used methods for free energy profile calculation (umbrella and constraint simulation) are quite equivalent when applied on an error-free set of starting structures. However, if the membrane defects are present, the z-constraint simulation leads to more rapid convergence than umbrella sampling. In summary, for efficient calculation of convergent free energy profiles of druglike molecules along bilayer normals, we recommend using z-constraint biased MD simulations based on as much starting geometries acquired from unbiased MD simulations as possible, otherwise when pulling simulation is employed, the biased simulation might need far longer time to reach convergence.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Details of the recommended simulation protocol, used partial charges, four supplemental figures, and one equation. Table S1: Partial charges on coumarin atoms used in the paper. Figure S1: Position of coumarin in unbiased simulations. Figure S2: Funnel shape water defect caused by pulling coumarin into the membrane. Figure S3: Effect of window spacing in constraint and umbrella simulations. Figure S4: Atom labels as used in Table S1. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [karel.berka@upol.cz](mailto:karel.berka@upol.cz) (K.B.), [michal.otyepka@upol.cz](mailto:michal.otyepka@upol.cz) (M.O.).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

Support through GACR grants 303/09/1001 and P208/12/G016 and Student Project PrF\_2011\_020 provided by Palacky University is gratefully acknowledged. This work was also supported by the Operational Program Research and Development for Innovations – European Regional Development Fund (CZ.1.05/2.1.00/03.0058) and European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0017).

## REFERENCES

- (1) Orsi, M.; Essex, J. W. Passive Permeation Across Lipid Bilayers: a Literature Review. In *Molecular Simulations and Biomembranes*, 1st ed.; Sansom, M. S. P., Biggin, P. C., Eds.; Royal Society of Chemistry: 2010; pp 76–90.
- (2) Balaz, S. Modeling Kinetics of Subcellular Disposition of Chemicals. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1793–1899.
- (3) Afri, M.; Gottlieb, H. E.; Frimer, A. A. Superoxide Organic Chemistry within the Liposomal Bilayer, part II: a Correlation between Location and Chemistry. *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *32*, 605–618.
- (4) Xiang, T.-X.; Anderson, B. D. Liposomal Drug Transport: a Molecular Perspective from Molecular Dynamics Simulations in Lipid Bilayers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1357–1378.
- (5) Berka, K.; Hendrychová, T.; Anzenbacher, P.; Otyepka, M. Membrane Position of Ibuprofen Agrees with Suggested Access Path Entrance to Cytochrome P450 2C9 Active Site. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 11248–11255.
- (6) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science: New York, 2002.
- (7) Cooper, G. M. *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed.; Sinauer Associates: Sunderland MA, 2000.

- (8) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112–124.
- (9) Black, S. D. Membrane Topology of the Mammalian P450 Cytochromes. *FASEB J.* **1992**, *6*, 680–685.
- (10) Ishii, Y.; Takeda, S.; Yamada, H. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase Activity by Protein-Protein Association. *Drug Metab. Rev.* **2010**, *42*, 145–158.
- (11) Wu, N. A. N.; Palczewski, K.; Mu, D. J. Vertebrate Membrane Proteins: Structure, Function, and Insights from Biophysical Approaches. *Pharmacol. Rev.* **2008**, *60*, 43–78.
- (12) Marrink, S.-J.; Berendsen, H. J. C. Simulation of Water Transport through a Lipid Membrane. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4155–4168.
- (13) Neale, C.; Bennett, W. F. D.; Tieleman, D. P.; Pomès, R. Statistical Convergence of Equilibrium Properties in Simulations of Molecular Solutes Embedded in Lipid Bilayers. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 4175–4188.
- (14) Orsi, M.; Essex, J. W. Permeability of Drugs and Hormones through a Lipid Bilayer: Insights from Dual-Resolution Molecular Dynamics. *Soft Matter* **2010**, *6*, 3797–3808.
- (15) Bemporad, D.; Luttmann, C.; Essex, J. W. Computer Simulation of Small Molecule Permeation across a Lipid Bilayer: Dependence on Bilayer Properties and Solute Volume, Size, and Cross-Sectional Area. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1–13.
- (16) Bemporad, D.; Luttmann, C.; Essex, J. W. Behaviour of Small Solutes and Large Drugs in a Lipid Bilayer from Computer Simulations. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1718*, 1–21.
- (17) Orsi, M.; Sanderson, W. E.; Essex, J. W. Permeability of Small Molecules through a Lipid Bilayer: a Multiscale Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12019–12029.
- (18) Boggara, M. B.; Krishnamoorti, R. Partitioning of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Lipid Membranes: a Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 586–595.
- (19) MacCallum, J. L.; Tieleman, D. P. Computer Simulation of the Distribution of Hexane in a Lipid Bilayer: Spatially Resolved Free Energy, Entropy, and Enthalpy Profiles. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 125–130.
- (20) Kumar, S.; Rosenberg, J.; Bouzida, D.; Swensen, R. H.; Kollman, P. A. The Weighted Histogram Analysis Method for Free Energy Calculations on Biomolecules. I. The Method. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 1011–1021.
- (21) Torrie, G. M.; Calleau, J. P. Nonphysical Sampling Distribution in Monte Carlo Free Energy Estimation: Umbrella Sampling. *J. Comput. Phys.* **1997**, *23*, 187–199.
- (22) Marrink, S. J.; Berendsen, H. J. C. Permeation Process of Small Molecules across Lipid Membranes Studied by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16729–16738.
- (23) Bemporad, D.; Essex, J. W.; Luttmann, C. Permeation of Small Molecules through a Lipid Bilayer: A Computer Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 4875–4884.
- (24) Zhang, Y.; Voth, G. A. Combined Metadynamics and Umbrella Sampling Method for the Calculation of Ion Permeation Free Energy Profiles. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2277–2283.
- (25) Laio, A.; Parrinello, M. Escaping Free-Energy Minima. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12562–12566.
- (26) Wei, C.; Pohorille, A. Permeation of Membranes by Ribose and Its Diastereomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10237–10245.
- (27) Darve, E.; Pohorille, A. Calculating Free Energies Using Average Force. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 9169.
- (28) Tai, K. Conformational Sampling for the Impatient. *Biophys. Chem.* **2004**, *107*, 213–220.
- (29) Roux, B. The Calculation of the Potential of Mean Force Using Computer Simulations. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 275–282.
- (30) MacCallum, J. L.; Bennett, W. F. D.; Tieleman, D. P. Distribution of Amino Acids in a Lipid Bilayer from Computer Simulations. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 3393–3404.
- (31) Kandt, C.; Ash, W. L.; Tieleman, D. P. Setting up and Running Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins. *Methods* **2007**, *41*, 475–488.
- (32) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 33–38.
- (33) Tejwani, R. W.; Davis, M. E.; Anderson, B. D.; Stouch, T. R. Functional Group Dependence of Solute Partitioning to Various Locations within a DOPC Bilayer: A Comparison of Molecular Dynamics Simulations with Experiment. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 2136–2146.
- (34) Verschuere, K. *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*, 3rd ed.; Van Nostrand Reinhold: New York, 1996; pp 541–542.
- (35) Gutiérrez-Sánchez, C.; Calvino-Casilda, V.; Pérez-Mayoral, E.; Martín-Aranda, R. M.; López-Peinado, A. J.; Bejblova, M.; Čejka, J. Coumarins Preparation by Pechmann Reaction under Ultrasound Irradiation. Synthesis of Hymecromone as Insecticide Intermediate. *Cat. Lett.* **2008**, *128*, 318–322.
- (36) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cellular and Molecular Life Sciences Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 737–747.
- (37) Pelkonen, O.; Rautio, A.; Raunio, H.; Pasanen, M. CYP2A6: a Human Coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* **2000**, *144*, 139–147.
- (38) Schüttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F. PRODRG: a Tool for High-Throughput Crystallography of Protein-Ligand Complexes. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1355–1363.
- (39) Oostenbrink, C.; Soares, T. A.; van der Vegt, N. F. A.; van Gunsteren, W. F. Validation of the 53A6 GROMOS Force Field. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34*, 273–284.
- (40) Lemkul, J. A.; Allen, W. J.; Bevan, D. R. Practical Considerations for Guiding GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 2221–2235.
- (41) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; 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.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision E.01; Gassuian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- (42) Cieplak, P.; Caldwell, J.; Kollman, P. Molecular Mechanical Models for Organic and Biological Systems Going Beyond the Atom Centered Two Body Additive Approximation: Aqueous Solution Free Energies of Methanol and N-Methyl Acetamide, Nucleic Acid Base, and Amide Hydrogen Bonding and Chloroform/ Water Partition Coefficients of the Nucleic Acid Bases. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 1048–1057.
- (43) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E., III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossvary, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. *AMBER 11*; University of California: San Francisco, 2010.
- (44) Berger, O.; Edholm, O.; Jahnig, F. Molecular Dynamics Simulations of a Fluid Bilayer of Dipalmitoylphosphatidylcholine at Full Hydration, Constant Pressure, and Constant Temperature. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2002–2013.



- (45) Siu, S.; Vácha, R.; Jungwirth, P.; Böckmann, R. A. Biomolecular Simulation of Membranes: Physical Properties from Different Force Fields. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 125103.
- (46) Domański, J.; Stansfeld, P. J.; Sansom, M. S. P.; Beckstein, O. Lipidbook: a Public Repository for Force-Field Parameters Used in Membrane Simulations. *J. Membr. Biol.* **2010**, *236*, 255–258.
- (47) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Gunsteren, W. F. van; Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In *Intermol. Forces*; Pullman, B., Ed.; Reidel Publishing Company: 1981; pp 331–338.
- (48) 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.
- (49) Shinoda, W.; Mikami, M.; Baba, T.; Hato, M. Molecular Dynamics Study on the Effects of Chain Branching on the Physical Properties of Lipid Bilayers: 2. Permeability. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9346–9356.
- (50) Chiu, S. W.; Clark, M.; Balaji, V.; Subramaniam, S.; Scott, H. L.; Jakobsson, E. Incorporation of Surface Tension into Molecular Dynamics Simulation of an Interface: a Fluid Phase Lipid Bilayer Membrane. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1230–1245.
- (51) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An  $N \log(N)$  Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- (52) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472.
- (53) Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical Sampling Through Velocity Rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 014101.
- (54) Berendsen, H.; Postma, J.; Vangunsteren, W.; Dinola, A.; Haak, J. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- (55) Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–1718.
- (56) Hub, J. S.; Groot, B. L. D.; Spoel, D. V. D. g\_wham-A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 3713–3720.
- (57) Eriksson, E. S. E.; Eriksson, L. A. The Influence of Cholesterol on the Properties and Permeability of Hypericin Derivatives in Lipid Membranes. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 560–574.
- (58) Biocomputing at the University Of Calgary. <http://people.ucalgary.ca/~tieleman/download.html> (accessed Oct. 12, 2011).
- (59) Cohen, Y.; Afri, M.; Frimer, A. A. NMR-Based Molecular Ruler for Determining the Depth of Intercalants within the Lipid Bilayer Part II. The Preparation of a Molecular Ruler. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *155*, 114–119.
- (60) Cohen, Y.; Bodner, E.; Richman, M.; Afri, M.; Frimer, A. A. NMR-Based Molecular Ruler for Determining the Depth of Intercalants within the Lipid Bilayer Part I. Discovering the Guidelines. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *155*, 98–113.
- (61) Trzesniak, D.; Kunz, A.-P. E.; van Gunsteren, W. F. A Comparison of Methods to Compute the Potential of Mean Force. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 162–169.

# Supporting Information

for

## Convergence of Free Energy Profile of Coumarin in Lipid Bilayer

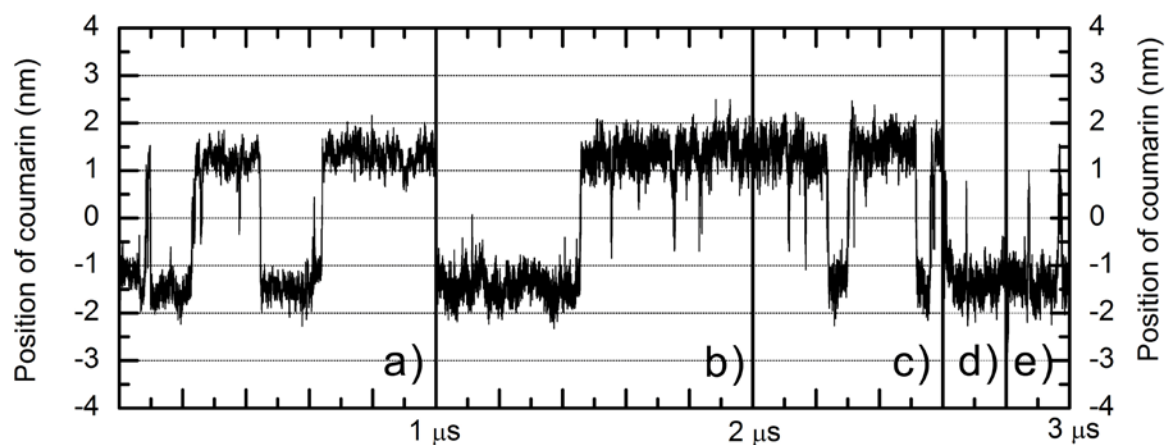
*Markéta Paloncýová, † Karel Berka, †\* and Michal Otyepka †\**

†Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, tř. 17 listopadu 12, 771 46, Olomouc, Czech Republic.

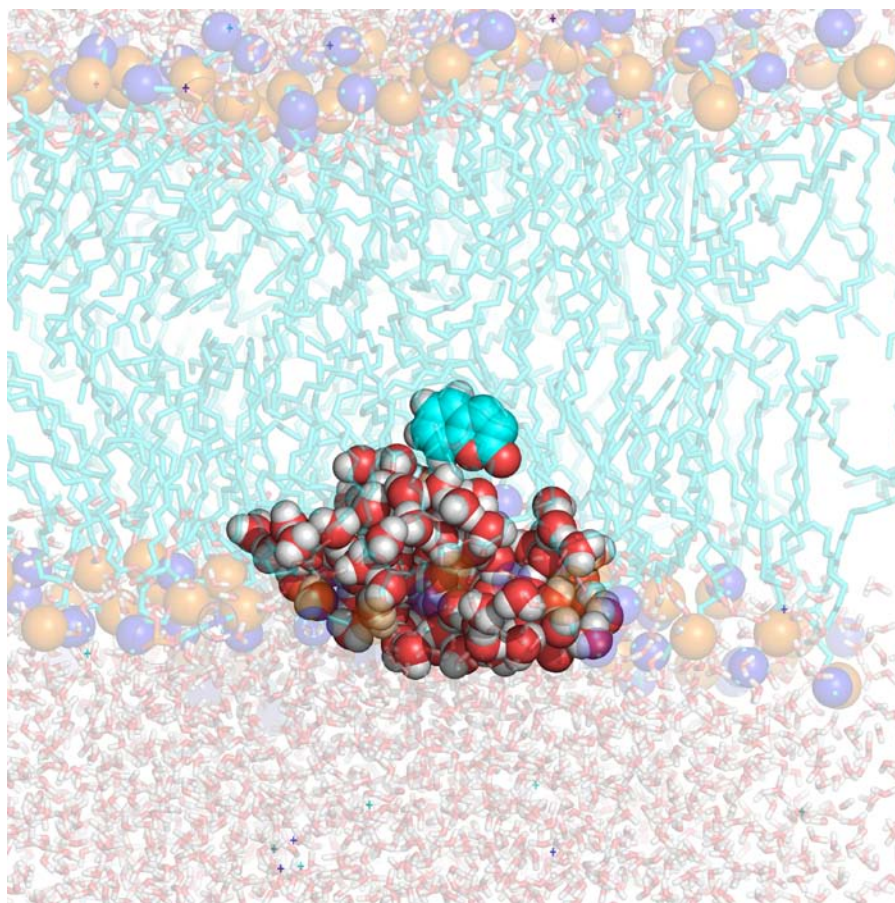
### ***Recommended Simulation Protocol***

Based on our results, we recommend the following simulation protocol:

1. Calculate RESP partial charges of the guest molecule
2. Run unbiased simulation to collect initial structures (this can be supplemented with very slow pulling simulation from a deepest position of drug in the bilayer, at most  $1 \text{ nm}\cdot\text{ns}^{-1}$ , with a pulling force constant of at most  $500 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ )
3. Run constraint simulation with at least 10 ns bins
  - a. For a rough initial screening use bins spaced  $4 \text{ \AA}$  apart
  - b. For fine results use bins spaced  $1 \text{ \AA}$  apart

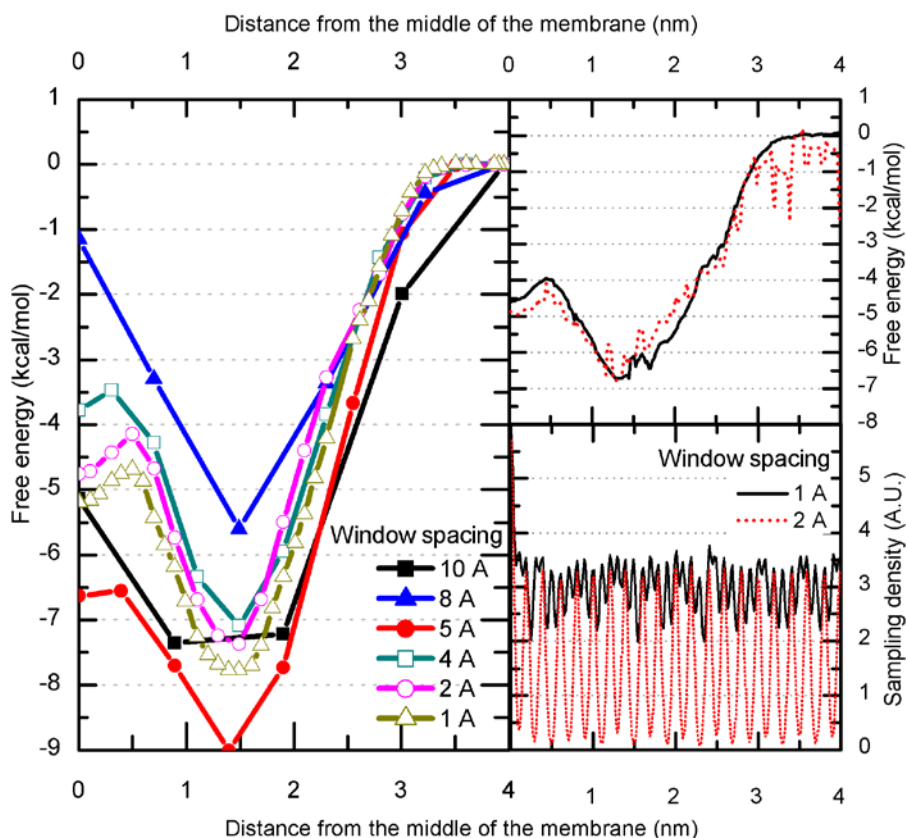


**Figure S1:** Position of coumarin in unbiased simulations, total time 3  $\mu\text{s}$ . Coumarin preferentially stays at  $\sim 14\text{\AA}$ , while it penetrates the bilayer freely with short stays in the middle of the bilayer. Coumarin enters the bilayer during a very short period of maximum 10 ns of each simulation.



**Figure S2:** Funnel shape water defect caused by pulling coumarin into the membrane. The solvation shell follows coumarin and disturbs the bilayer surface, which leads to water artifacts in the free energy profile.

### Window spacing effects on the free energy profiles



**Figure S3:** Effect of window spacing in constraint (CF, left) and umbrella (UF, right) simulations with initial structures obtained from free simulation. With 4 Å between windows in constraint simulation the positions of minima can be still recognized, but when using umbrella simulation the area is not thoroughly sampled and the free energy profile cannot be plotted. Significant errors in the profile with 2 Å distance between simulation windows can be observed (upper right panel), as the sampling density is very low with a force constant of 2,000  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$  (lower right panel).

The number of simulation windows along the z-axis significantly affects the quality and cost of the free energy profile calculation. The effect of window spacing in umbrella simulation has been previously studied, and too wide spacing has been found to lead to higher errors or even prohibit free energy profile plotting. Constraint simulation allows a wider windows spacing, especially in the areas of small changes in constraint force. The free energy profile can be plotted with any windows spacing, although its quality is dependent on this variable. It is possible (and recommended) to calculate a rough free energy profile at the beginning of simulation (with 4 Å between simulation windows) and then add more simulation windows in the areas of local minima and maxima. This approach leads to more efficient use of computer time, as attention is focused precisely on the areas of interest.

**Table S1:** Partial charges on coumarin atoms calculated by restraint electrostatic potential fit (RESP calculated at B3LYP/cc-pVDZ level), by PRODRG2Beta Server (PRODRG) and from Mulliken population analysis (MULLIKEN) calculated at HF/6-31G\* level (in gas phase). Atom labels are shown on Figure S4.

Atom label	RESP	PRODRG	MULLIKEN
OAA	-0.48	-0.59	-0.61
CAI	0.76	0.33	0.98
OAH	-0.42	-0.14	-0.52
CAK	0.50	0.18	0.56
CAF	-0.35	0.02	-0.40
HAF	0.18	0.06	0.22
CAC	-0.02	0.02	-0.04
HAC	0.12	0.06	0.15
CAB	-0.20	0.02	-0.24
HAB	0.14	0.06	0.17
CAE	-0.08	0.00	-0.13
HAE	0.12	0.00	0.16
CAJ	-0.16	0.00	-0.14
CAG	0.16	0.00	0.17
CAD	-0.26	0.00	-0.32



**Figure S4:** Atom labels of coumarin united atoms as used in Table S1.

Probability of a spontaneous transition  $p(A \rightarrow B)$  from state A to B in time  $\Delta t$  via a barrier of  $\Delta G^\ddagger$  can be estimated from the equation (Eq. S1)

$$p(A \rightarrow B) = 1 - \exp\left(-\frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \Delta t\right), \quad \text{Eq. S1}$$

where  $k_B$  refers to Boltzmann constant,  $h$  to Planck constant,  $R$  to the universal gas constant, and  $T$  is temperature.